



Universidad
Zaragoza

Proyecto Fin de Carrera

DESARROLLO DE PROTOCOLO DE CONFINAMIENTO DE HIDROGELES PARA CULTIVO CELULAR 3D EN SISTEMAS MICROFLUÍDICOS

Marco Alejandro Moreno Mínguez

Director: José María Ayuso

Ponente: Luis José Fernandez Ledesma

Escuela de Ingeniería y Arquitectura
2014

RESUMEN

Este proyecto fin de carrera forma parte de un proyecto muy amplio cuyo objetivo final es el desarrollo de un sistema microfluídico para el cultivo celular en entorno tridimensional (3D). En la investigación biomédica el cultivo celular convencional tiene lugar en placas de plástico, llamadas placas Petri. Los sistemas microfluídicos suponen una mejora importante con respecto a estas placas Petri, ya que, en primer lugar, permiten una reducción drástica de los reactivos empleados. Por otro lado, estos sistemas microfluídicos permiten recrear con mayor acierto las condiciones fisiológicas que se dan en los tejidos biológicos. El objetivo concreto para este proyecto es la generación de un cultivo celular 3D sometido a un gradiente de concentración de nutrientes y oxígeno. En los tejidos biológicos dichas condiciones se dan con frecuencia durante el desarrollo tumoral.

Mediante fotolitografía se fabricarán chips microfluídicos destinados al cultivo celular 3D. Estos chips microfluídicos poseen una microcámara central dónde se alojarán las células, que estarán embebidas en un hidrogel 3D de colágeno. Por los laterales de esta microcámara central se encuentran dos microcanales laterales, quedando separados de la microcámara por una serie de pilares. A través de estos laterales se podrá hacer fluir el medio de cultivo que se desee. Para generar el gradiente de oxígeno y nutrientes se pretende bloquear un microcanal, mientras que por el otro se perfundirá continuamente medio de cultivo nuevo. De este modo, las células al consumir oxígeno y nutrientes generarán un gradiente de los mismos en la microcámara central.

Sin embargo, para lograr las condiciones antes mencionadas debe garantizarse que el hidrogel queda confinado en la microcámara central y que no invade los microcanales laterales, ya que bloquearía el paso del medio de cultivo. Una vez desarrollado un protocolo de confinamiento eficaz, se pasó a comprobar la biocompatibilidad del chip microfluídico y determinar las condiciones óptimas de cultivo. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de cultivo celular 3D bajo un gradiente de oxígeno y nutrientes.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
Índice de figuras	3
MEMORIA	5
CAPÍTULO 1. Introducción	6
CAPÍTULO 2. Sistema microfluídico	9
2.1 Chip microfluídico	11
2.2 Encapsulado.....	13
2.3 Reservorio	13
2.4 Manorreductor	14
2.5 Llaves de paso	15
2.6 Sensor de flujo	15
CAPÍTULO 3. Confinamiento del hidrogel de colágeno en microchips prefundidos	17
3.1 Montaje del sistema para el confinamiento	18
3.2 Elección del sistema de inyección del hidrogel	19
3.2.1 Inyección con jeringuilla	20
3.2.2 Inyección con micropipeta	21
3.2.3 Inyección por presión hidrostática	21
3.3 Testeo del protocolo de confinamiento en ensayos de cultivo celular 3D	23
CAPÍTULO 4. Confinamiento del hidrogel de colágeno en microchips secos..	26
CAPÍTULO 5. Modelización del proceso de confinado	30
5.1 Fundamento teórico del proceso de confinamiento	30
5.2 Análisis del proceso de confinamiento	33
CAPÍTULO 6. Desarrollo de un protocolo alternativo para confinamiento	36
6.1 Principios físicos del protocolo alternativo	36
6.2 Protoclo alternativo	39
6.3 Conclusión	40

CAPÍTULO 7. Formación de gradientes bioquímicos dentro del chip	
microfluídico	41
7.1 Protocolo para la formación de gradientes	42
7.2 Inestabilidad en la formación de gradientes	43
CAPÍTULO 8. Desarrollo de cultivo celular 3D en chips microfluídicos	47
8.1 Resultados de viabilidad en hidrogeles de colágeno	
macroscópicos	48
8.2 Método y resultados de cultivo celular 3D en chips microfluídicos en	
estático	52
8.3 Bioestadística de viabilidad celular en microchips en estático	56
8.4 Ensayos de cultivo celular 3D en microchips con paso de flujo	
continuo	58
8.5 Resultados del cultivo celular 3D en flujo	61
CAPÍTULO 9. Conclusiones y trabajo futuro	63
ANEXOS	66
ANEXO A. Protocolo de preparación del hidrogel de colágeno	66
ANEXO B. Protocolo de preparación de ensayos de cultivo celular 3D	
macroscópicos en placa petri	69
ANEXO C. Protocolo de tripsinización de células	70
ANEXO D. Protocolo de conteo celular	72
ANEXO E. Protocolo de tinción de células	73
BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sistema microfluídico	10
Figura 2: Chip microfluídico	12
Figura 3: Encapsulado	13
Figura 4: Reservorio	14
Figura 5: Manorreductor	14
Figura 6: Llaves de paso	15
Figura 7: Sensor de flujo	16
Figura 8: Encapsulado y llaves de tres vías unidas a los tubos	19
Figura 9: Fuga del hidrogel a los microcanales laterales por inyección con jeringuilla	20
Figura 10: Sistema de inyección por presión hidrostática	22
Figura 11: Confinado del microchip de un hidrogel por presión hidrostática ...	23
Figura 12: Confinamiento mediante inyección con presión hidrostática	24
Figura 13: Pérdida por sedimentación celular debido a la lenta velocidad de inyección	25
Figura 14: Confinamiento del hidrogel en la microcámara central en microchip seco	27
Figura 15: Problemática en la salida microfluídica	28
Figura 16: Sucesión de imágenes de la retracción del gel	29
Figura 17: Comportamiento físico del hidrogel mientras se confinan en la cámara central	31
Figura 18: Gráfica que representa la diferencia de presión entre columnas y ancho de la microcámara central	33
Figura 19: Gráfica que representa la diferencia de presión frente al espacio entre columnas variando el ángulo de contacto	34
Figura 20: Simulación confinado de hidrogel mediante el nuevo protocolo ..	38
Figura 21: Resultados del nuevo protocolo de confinado	40
Figura 22: Gradiente de color en la microcámara central del microchip	43
Figura 23: Esquema del microchip	44
Figura 24: Esquema de los ensayos que se llevarán a cabo en el microchip de cultivo celular 3D	48

Figura 25: : Cultivo celular 3D macro a densidad de 1 millón de células/ml y una concentración de hidrogel de 1,2 mg/ml	49
Figura 26: : Cultivo celular 3D macro a densidad de 3 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 1,2 mg/ml	50
Figura 27: Cultivo celular 3D macro a densidad de 10 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 1,2 mg/ml	50
Figura 28: Cultivo celular 3D macro a densidad de 1 millón de células/ml y una concentración de hidrogel de 2,4 mg/ml	50
Figura 29: Cultivo celular 3D macro a densidad de 3 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 2.4 mg/ml	51
Figura 30: Cultivo celular 3D macro a densidad de 10 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 2.4 mg/ml	51
Figura 31: Cultivo celular 3D en estático a densidad de 1 millón de células/ml y una concentración de hidrogel de 1.2 mg/ml	54
Figura 32: Cultivo celular 3D en estático a densidad de 3 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 1.2 mg/ml	54
Figura 33: Cultivo celular 3D en estático a densidad de 10 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 1.2 mg/ml	54
Figura 34: Cultivo celular 3D en estático a densidad de 1 millón de células/ml y una concentración de hidrogel de 2.4 mg/ml	55
Figura 35: Cultivo celular 3D en estático a densidad de 3 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 2.4 mg/ml	55
Figura 36: Cultivo celular 3D en estático a densidad de 10 millones de células/ml y una concentración de hidrogel de 2.4 mg/ml	55
Figura 37: Diagrama del % de la viabilidad en microchips en estático	57
Figura 38: Cultivo celular 3D en chip microfluídico con flujo	61
Figura 39: Hemocitómetro	71
Figura 40: Esquema de las 4 celdas del hemocitómetro	72

MEMORIA

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto fin de carrera se enmarca dentro un proyecto de mayor envergadura, cuyo objetivo final es el desarrollo de nuevas herramientas microfluídicas dedicadas al cultivo celular.

El rápido avance de la investigación biomédica durante las últimas décadas ha sido posible, en gran medida, gracias a la implantación de técnicas de cultivo celular. Dichas técnicas también han ido evolucionando para tratar de reproducir con mayor fidelidad la fisiología de los organismos vivos. En su expresión más básica el cultivo celular consiste en crecer células en placas de plástico, estando las células adheridas a la base de la misma. Sin embargo, y a pesar de su probada utilidad, estos sistemas no reproducen el ambiente tridimensional en el que se encuentran las células dentro del tejido vivo. En este contexto, los sistemas de cultivo tridimensionales son de gran importancia, ya que numerosas evidencias han demostrado que el comportamiento celular entre sistemas bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D) es considerablemente diferente (Ref.1-2-3).

Para estudiar el comportamiento celular en tres dimensiones se recurre al empleo de hidrogeles: soluciones proteicas que ante determinadas condiciones polimerizan y forman una matriz de soporte que mantiene a las células en un ambiente 3D. Estos modelos celulares 3D “in vitro” proporcionan una mejora, ya que permiten estudiar la migración celular en tres dimensiones y también las

interacciones no solo entre las células sino también con la propia matriz extracelular (Ref.4).

Por otro lado en los tejidos biológicos, la comunicación intercelular está, comúnmente, mediada por gradientes bioquímicos: el crecimiento de las terminaciones nerviosas, la generación de nuevos vasos sanguíneos o la respuesta inflamatoria, son procesos guiados por un gradiente bioquímico. Entre las diferentes moléculas que median procesos de señalización, el oxígeno y los nutrientes constituyen uno de los más potentes inductores de respuesta celular. Ante un gradiente de oxígeno y nutrientes las células desencadenan diferentes respuestas, tanto metabólicas como migratorias (Ref 5-6).

Los sistemas microfluídicos permiten reproducir con gran acierto estos gradientes. En estos sistemas, debido a su reducido tamaño el flujo de un líquido puede considerarse laminar, y por lo tanto el mezclado entre dos flujos paralelos depende casi exclusivamente de la difusión. Esto permite la generación de estos gradientes bioquímicos dentro de los dispositivos microfluídicos mediante técnicas sencillas (Ref. 7).

Por otro lado, la miniaturización de sistemas de cultivo 3D proporciona una mejora en la eficiencia y funcionalidad frente a los sistemas de cultivo convencionales 2D. El uso de sistemas microfluídicos podría ser beneficioso para examinar los procesos biológicos en menor tiempo y con un menor gasto de reactivos y medios de cultivo. La mayoría de estos dispositivos microfluídicos están fabricados en polidimetilsiloxano (PDMS), un material de bajo coste y con buenas propiedades ópticas y biocompatible. Sin embargo este material es permeable al oxígeno, lo que hace muy difícil generar gradientes de oxígeno dentro de estos dispositivos (Ref. 8-9).

Para este proyecto de fin de carrera se ha fabricado un chip microfluídico basado en SU-8, un material impermeable al oxígeno y con buenas propiedades mecánicas. Este dispositivo está dotado de una microcámara central, en la que se localizará el cultivo 3D, y dos microcanales laterales, que se emplearán para hacer fluir el medio de cultivo. Los nutrientes y el oxígeno

difundirán desde los microcanales laterales hacia la cámara central, permitiendo así crear un gradiente. Para el correcto funcionamiento de este sistema, debe garantizarse que el hidrogel, con las células embebidas, no bloquea los microcanales laterales, lo que impediría el flujo de medio de cultivo. Por lo tanto, en el presente proyecto fin de carrera, se ha desarrollado un protocolo de confinamiento que garantice que el hidrogel queda localizado exclusivamente en la cámara central, mientras los canales laterales quedan libres para la perfusión de medio.

El sistema microfluídico para el cultivo celular, no debe tener unas dimensiones muy grandes, ya que se debe cumplir unas condiciones de portabilidad. Esto es debido a que no todas las fases del cultivo celular 3D, se desarrollan en el mismo lugar.

Siguiendo los citados principios, se ha desarrollado un sistema microfluídico de cultivo celular 3D sometido a condiciones de gradiente.

En el **capítulo 2** se hace una descripción general del sistema microfluídico y de los elementos principales que lo componen. En el **capítulo 3** se detalla el desarrollo de un primer protocolo de confinamiento del hidrogel de colágeno en chip microfluídico perfundido. Mientras que en el **capítulo 4** se desarrolla un protocolo de confinamiento de hidrogel de colágeno en chip seco. En los **capítulos 5 y 6** se analiza en detalle el desarrollo del protocolo final de confinamiento del hidrogel. En el **capítulo 7** se desarrolla la formación de gradientes en chip microfluídico. Finalmente, Los ensayos de cultivo celular se plasman en el **capítulo 8**, donde se desarrollan los diferentes cultivos celulares 3D, estático y en flujo, y en el **capítulo 9** en donde se exponen las conclusiones finales y expectativas futuras del proyecto.

CAPÍTULO 2

SISTEMA MICROFLUÍDICO

El sistema está compuesto por una serie de elementos que en conjunto permiten el cultivo celular en 3D en flujo: un reservorio de medio de cultivo, un manorreductor para aplicar una presión controlada al sistema y generar flujo dentro del mismo, un sensor de flujo con el que se mide este flujo, un encapsulado y llaves de tres vías para abrir y cerrar el paso del flujo. Todos estos elementos se comunican mediante tubos de diferentes diámetros y diferentes materiales. Entre ellos está el tubo de FEP (Propileno etileno fluorado) de 0.13 mm de diámetro que sale del reservorio al sensor y de FEP de 0.5 mm de diámetro que sale del manorreductor al reservorio. Las conexiones al encapsulado se hacen con tubo de silicona 0.5 mm de diámetro mediante llaves de tres vías. En cuanto a la largura utilizada, se escoge la más cómoda para trabajar con el sistema microfluídico y facilitar su portabilidad en la mejor medida posible.

El aporte de flujo al sistema se hace mediante un sistema neumático. Este sistema de impulsión se basa en la inyección de aire a presión en el reservorio de medio, provocando así un aumento de la presión dentro del mismo. Este aumento de presión impulsa el medio a través del sistema, y controlando la presión del aire inyectado se regula fácilmente el flujo. Este sistema permite alcanzar flujos de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ de forma muy estable a lo largo de los experimentos. Este modelo neumático es diseñado por el grupo GEMM, adecuando las condiciones de trabajo lo mejor posible a los ensayos de cultivo celular 3D.

En la **figura 1** se puede ver un sistema microfluídico que integra todos estos elementos y el sistema neumático en conjunto.

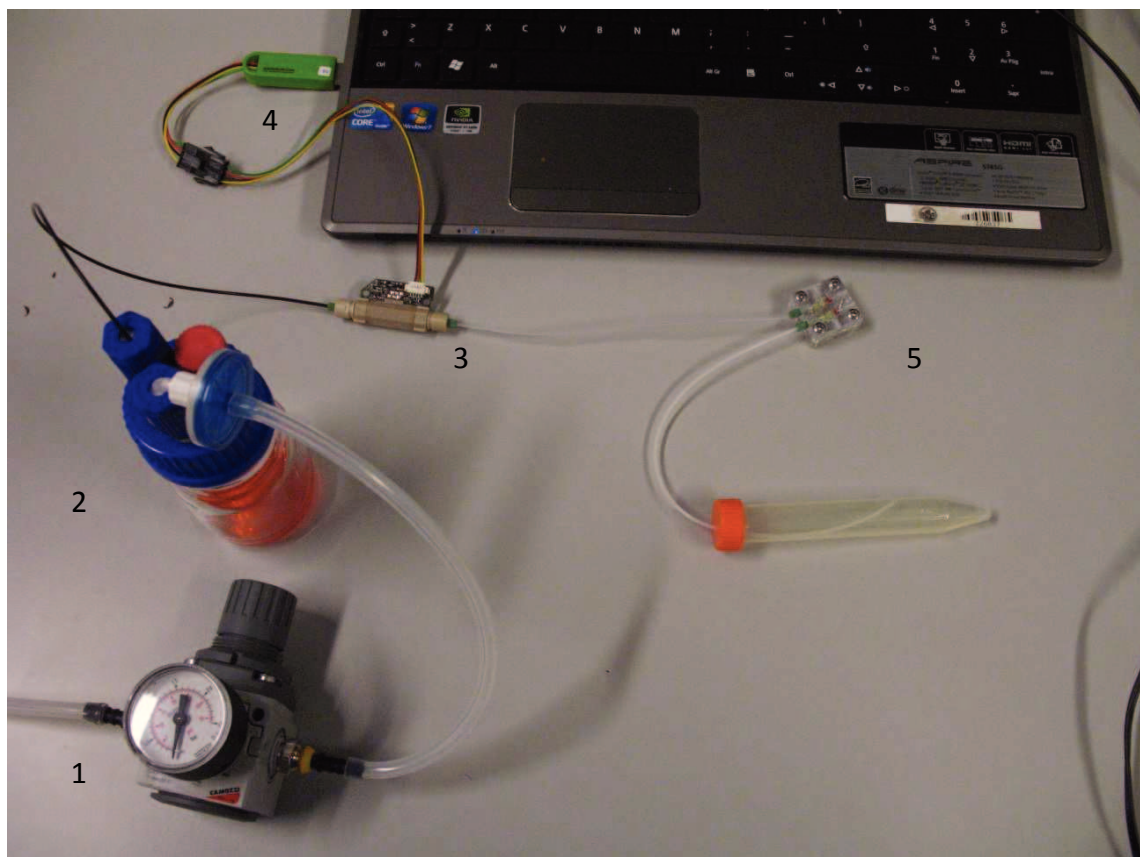


FIGURA 1: SISTEMA MICROFLUÍDICO. 1- Manorreductor para regular la presión aplicada dentro del sistema. 2- Reservorio de medio de cultivo. 3- Sensor de flujo. 4- Ordenador para monitorizar el flujo durante los ensayos. 5- Encapsulado. 6- Colector de desechos.

El sistema neumático consta de un tubo negro de FEP de un diámetro de 0.13 mm y una largura cómoda para trabajar. Este tubo va conectado al tubo que sale del manómetro con un conector, en este caso, es un conector de diferente diámetro y un tubo de silicona de 0.5 mm para que no vayan holgados ningún tubo y se escape la presión. Este tubo negro que va a ofrecer resistencia al sistema y por lo tanto un mejor control de la presión, es conectado al tubo de silicona del canal lateral de 0.5 mm colocado en el encapsulado.

El flujo se monitoriza en un PC convencional mediante el programa aportado por la casa Sensirion. El rango de flujo que es capaz de medir el sensor varía entre **(flujos negativos)** y 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Sin embargo, este sistema mantiene una presión constante, por lo que si la resistencia fluídica del sistema cambia, el flujo se verá afectado y será necesario que el experimentador vuelva a reajustar la presión. Esto obliga a tener un confinamiento del gel muy preciso, ya que fibras de gel en los canales laterales, apoden generar un tapón de gel en dicho canal. Además, el sistema debe encontrarse libre de burbujas, ya que estas al moverse a través del sistema alteran la resistencia fluídica y por lo tanto el flujo variará durante el experimento.

Finalmente, a pesar de sus limitaciones, el sistema neumático es idóneo para proporcionar flujos de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, ya que el flujo es prácticamente constante en el tiempo. Además, es un sistema económico y muy sensible.

Otros dispositivos de impulsión como una bomba peristáltica o una bomba de membrana fueron probados, pero su principal problema es que el flujo no es constante en el tiempo, sino que es un flujo pulsátil en el caso de la bomba peristáltica o bien no permite proporcionar flujos bajos como es el caso de la bomba de membrana.

Ahora se procede a detallar cada elemento del sistema:

2.1 CHIP MICROFLUÍDICO

La fabricación de los chips es llevada a cabo mediante fotolitografía en SU-8, método de fabricación de microchips que utiliza luz en vez de tinta para dibujar. Los chips microfluídicos tienen una microcámara central, que es la zona dónde se realizará el sembrado celular, y unos microcanales laterales, a través de los cuales se hace fluir el medio de cultivo. Los microcanales laterales se encuentran separados de la cámara central por una serie de pilares. A través

de los espacios entre estos pilares, los nutrientes del medio difundirán hacia la cámara central. De esta forma se simula el microambiente que se da en los tejidos de un ser vivo, dónde las células del tejido se encuentran inmersas en una matriz extracelular y reciben el aporte de nutrientes por difusión desde los capilares sanguíneos cercanos

El chip microfluídico tiene forma cuadrada, con unas dimensiones de 1 x 1 cm. En la **figura 2A** se muestra una imagen a tamaño natural y en **2B** se muestran las dimensiones tanto de la microcámara central como de los canales y pilares de difusión.

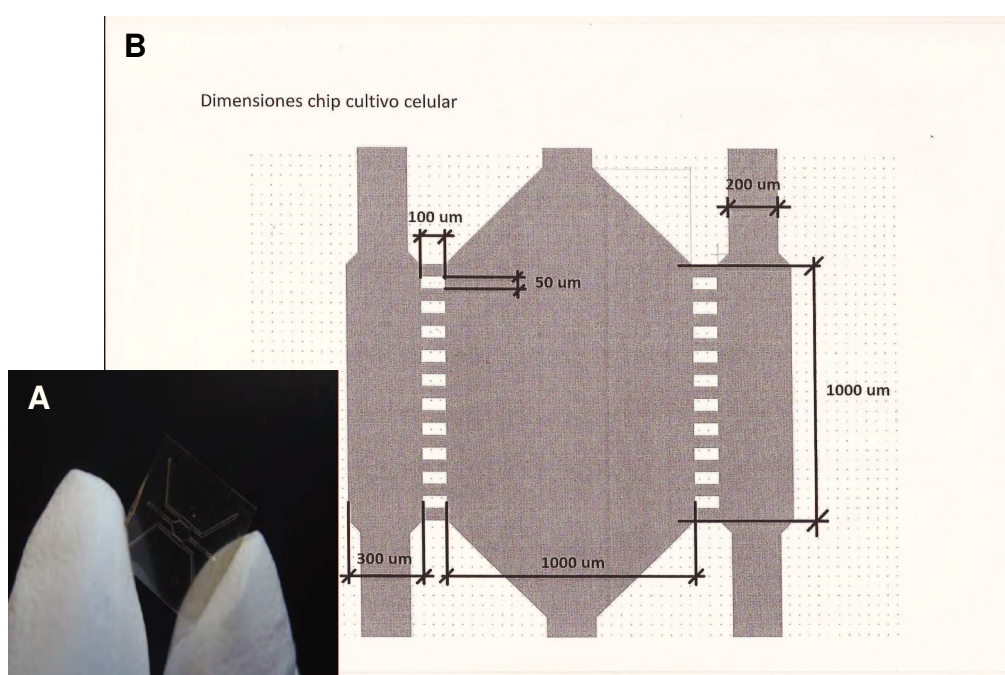


FIGURA 2: CHIP MICROFLUÍDICO. (A) Tamaño natural, (B) Dimensiones internas del chip microfluídico.

El medio debe llegar a las células en unas condiciones determinadas, ya que, para conseguir buenos resultados de viabilidad en los ensayos, los niveles de flujo deben ser aproximadamente de un 1 µl/min. Si los niveles de flujo no son los adecuados, las células pueden sufrir daños debido al rozamiento, podría llegar a rasgarse el hidrogel y por lo tanto taponar las salidas microfluídicas.

2.2 ENCAPSULADO

Debido a sus reducidas dimensiones el manejo del chip microfluídico es complicado, por lo que se diseñó un encapsulado cuyo objetivo es alojar al chip microfluídico y permitir así una fácil manipulación. El encapsulado está dotado de una serie de canales internos que permiten el perfecto acoplamiento con las entradas microfluídicas del chip, facilitando al usuario establecer el flujo a través de todo el sistema. La conexión entre los canales del encapsulado y las entradas del chip se sella mediante juntas tóricas (“*o-rings*”) de silicona, asegurando la estanqueidad del sistema.

En la **figura 3** se puede ver la imagen de dos encapsulados de diferente diseño fabricados por el grupo GEMM y utilizados en el proyecto.

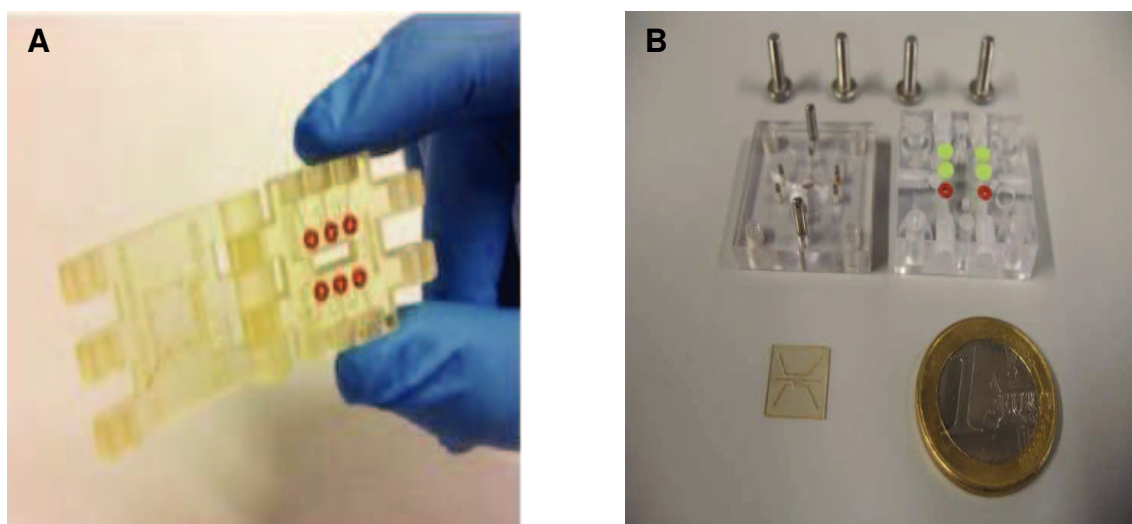


FIGURA 3: ENCAPSULADOS. (A) Encapsulado fabricado por prototipado rápido empleando “FULLCURE 720”, (B) Encapsulado fabricado por inyección empleando poliuretano.

2.3 EL RESERVORIO

El reservorio es una botella de “pyrex” de 250 ml de volumen con tapón de plástico, modelo GL45, con diferentes conexiones en él. Estas conexiones se emplearán para introducir una serie de tubos y conectar el reservorio con el resto del sistema. La función del reservorio es almacenar el medio de cultivo que se hará fluir a través del sistema. Este reservorio debe estar cerrado

completamente para evitar escapes de aire o la contaminación biológica del medio. En la **figura 4** se observa una imagen de este elemento.



FIGURA 4: RESERVORIO.

2.4 MANORREDUCTOR

Es el dispositivo que tiene como función regular la presión aplicada al reservorio para generar el flujo de medio dentro del chip microfluídico. En la **figura 5** se muestra una imagen de este elemento.



FIGURA 5: MANORREDUCTOR.

2.5 Llaves de paso

Por otro lado, en caso de ser necesarias se acoplaron llaves de tres vías a algunos de los tubos del sistema. Estas llaves de tres vías, o de “todo o nada”, permiten la conexión entre los distintos tubos en el sistema. En la **figura 6** se muestra en (A) la llave de tres vías al natural y (B) el sistema con las llaves incorporadas al encapsulado mediante tubos.

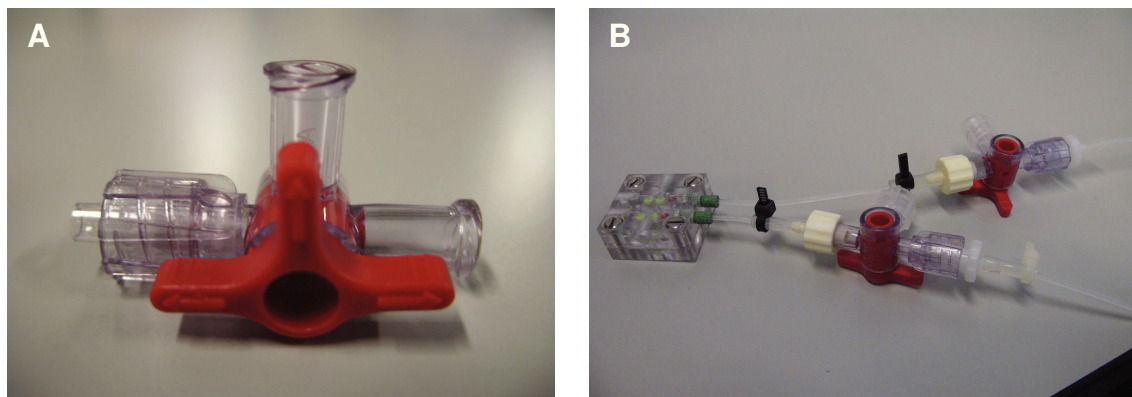


FIGURA 6: (A) LLAVE DE TRES VÍAS, (B) SISTEMA CON LLAVES INCORPORADAS.

2.5 SENSOR DE FLUJO

El sensor de flujo empleado es un sensor comercial de Sensirion modelo LG16-0430. Este elemento tiene como función medir el flujo de medio de cultivo dentro del sistema. Regulando la presión aplicada al sistema a través del manorreductor, y con ayuda del sensor de flujo, podemos aplicar el flujo deseado al sistema. Se visualizan los datos de flujo (flujo en $\mu\text{l}/\text{minuto}$) en el PC mediante el software proporcionado por el fabricante. En la **figura 7**, se muestra el sensor real (A), otra que muestra el software utilizado por el fabricante (B) y (C) mostrando gráfica de flujo prácticamente constante entorno a $2,2 \mu\text{l}$ con el tiempo que da el sistema neumático.

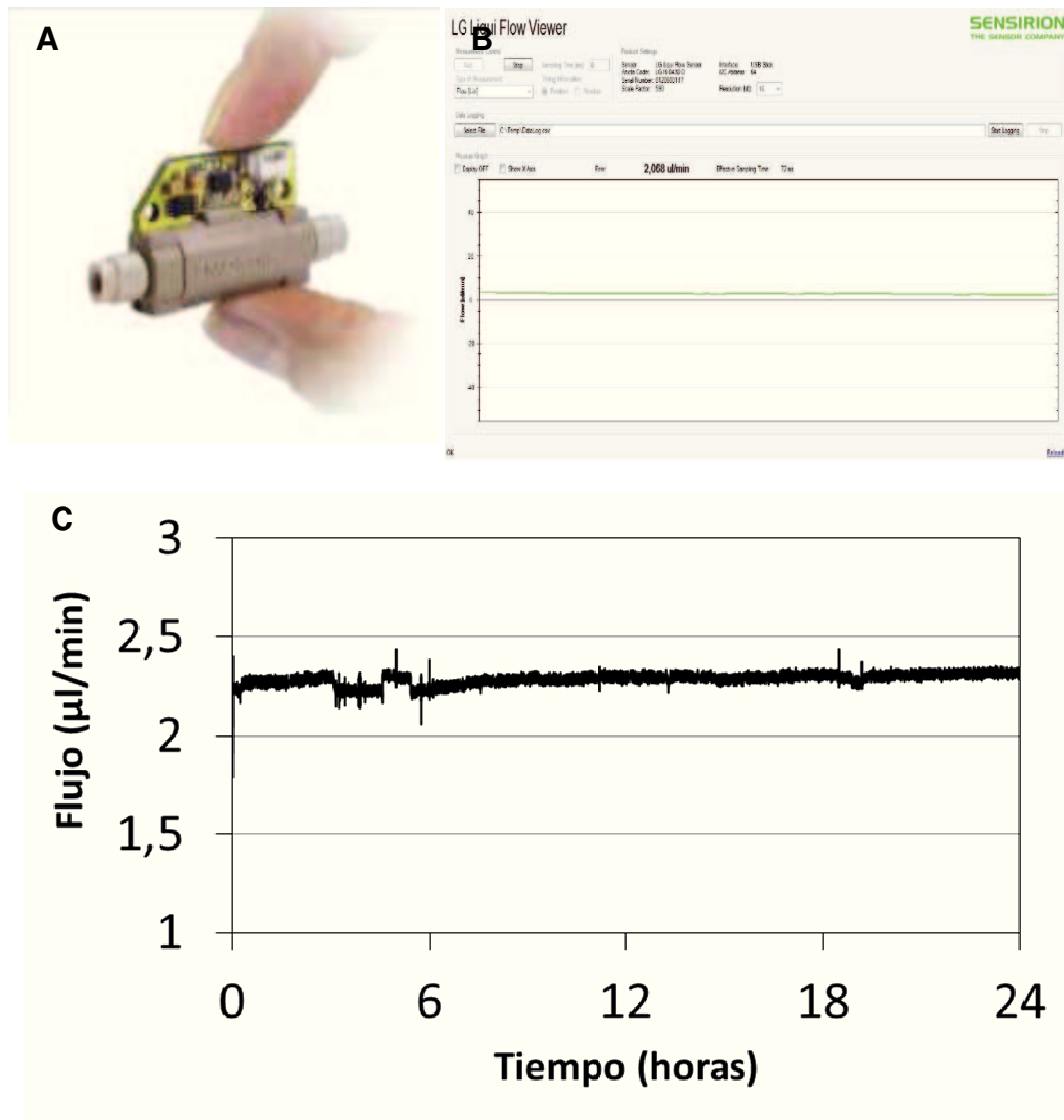


FIGURA 7. (A) Sensor de flujo. (B) Software comercial del sensor. (C) Gráfico representando el flujo durante un experimento.

CAPÍTULO 3

CONFINAMIENTO DEL GEL DE COLÁGENO EN CHIPS PERFUNDIDOS

En este capítulo, se describe el desarrollo de un primer protocolo de confinamiento del hidrogel en la microcámara central del chip microfluídico.

Una técnica de confinamiento eficiente debería permitir la inyección de una disolución acuosa cualquiera (en nuestro caso un hidrogel con células embebidas) dentro del chip microfluídico de tal modo que esta quede localizada exclusivamente en la microcámara central. De este modo, una vez inyectado y polimerizado el hidrogel, los microcanales laterales quedarían libres para hacer fluir diferentes disoluciones.

En una primera aproximación se ideó un protocolo de confinamiento basado en el comportamiento laminar de los fluidos dentro de los sistemas microfluídicos. En un sistema de flujo laminar los procesos de mezclado entre dos fluidos se limitan casi exclusivamente a los debidos a la difusión. Por lo tanto, se ideó un protocolo de confinamiento basado en esta propiedad. El fundamento del protocolo consistiría en sellar las entradas de los microcanales laterales, y perfundir el hidrogel en la microcámara central. Debido al flujo laminar, y al diseño del chip, el hidrogel debería atravesar la microcámara central sin invadir los laterales. El proceso de polimerización de la mayoría de los hidrogeles dura apenas unos minutos, por lo que la difusión de moléculas entre la microcámara

central y los microcanales laterales no debería afectar gravemente a la composición del hidrogel.

3.1 MONTAJE DEL SISTEMA PARA EL CONFINAMIENTO

A continuación se describe en detalle el protocolo de montaje del sistema para el protocolo de confinamiento en chips perfundidos:

1. Se introduce el chip microfluídico dentro del encapsulado, quedando las juntas tóricas ajustadas a las salidas microfluídicas del chip, finalmente se cierra el encapsulado para garantizar la estanqueidad al chip.
2. Se acoplan tubos de silicona de 0.8 mm de diámetro interno y de unos 10 cm de largo en cada una de las salidas del encapsulado. Se coloca una llave de tres vías en cada tubo de silicona para abrir o cerrar el paso del flujo según se desee. Este elemento se utiliza porque permite un fácil control del paso de flujo sin provocar apenas cambios de volumen dentro del sistema.
3. Con una jeringuilla de 2 ml, se inyecta agua destilada en el chip a través de los diferentes tubos. Se intenta que el sistema quede sin burbujas de aire, ya que durante la posterior inyección del hidrogel estas burbujas pueden comprimirse y provocar cambios internos de volumen. Para intentar garantizar la ausencia de burbujas se examina el sistema con un microscopio conectado a un ordenador vía USB.
4. Una vez que dentro del sistema no se aprecian burbujas, se cierran las llaves de tres vías colocadas en los tubos laterales y se dejan abiertas las centrales (**Figura 8**).

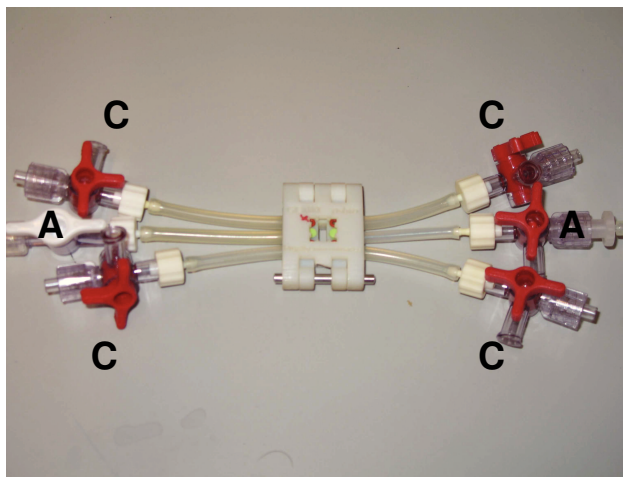


FIGURA 8: ENCAPSULADO Y LLAVES DE TRES VÍAS UNIDAS A LOS TUBOS. Se indica con una “C” aquellas llaves que se encuentran cerradas y con una “A” aquellas que están abiertas.

5. Se procede a preparar el hidrogel de colágeno según protocolo **A**, con la excepción de que se incorpora un colorante, azul de toluidina al 2% v/v. Este colorante se añade al hidrogel para poder distinguirlo del agua dentro del sistema. Tanto los compuestos a utilizar, como las puntas de pipeta se introducen en un baño de hielo para evitar la polimerización del hidrogel antes de que sea introducido en el sistema. Al trabajar con volúmenes tan pequeños, una vez fuera del hielo el hidrogel se atemperará en cuestión de segundos y polimerizará muy rápidamente.

3.2 ELECCIÓN DEL SISTEMA DE INYECCIÓN DE HIDROGEL

La inyección de hidrogel de colágeno dentro del chip microfluídico resultó ser un paso clave para lograr el confinamiento mediante este protocolo, por lo que se fueron testando diferentes métodos.

3.2.1 INYECCIÓN CON JERINGUILLA

Se comenzó usando una jeringuilla de 2 ml, suficiente volumen para llenar la cámara central y hacer salir el hidrogel por el tubo del otro extremo. El hidrogel se carga dentro de la jeringuilla y esta se acopla al tubo de silicona central y se empieza a impulsar el hidrogel tratando de hacerlo lentamente. Una vez introducido el hidrogel en la cámara central, se procede a retirar la jeringuilla.

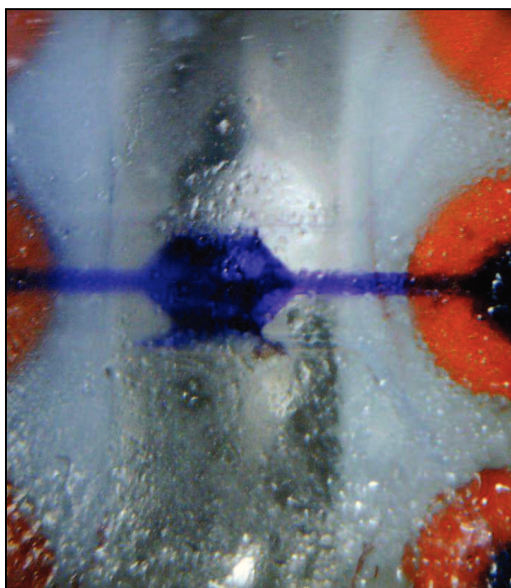


FIGURA 9: FUGA DEL HIDROGEL A LOS MICROCANALES LATERALES POR INYECCIÓN CON JERINGUILLA.

Como se puede ver en la **figura 9**, este protocolo de inyección no fue capaz de confinar apropiadamente el hidrogel. La mínima velocidad de inyección que se puede alcanzar manualmente es muy elevada (superior al flujo máximo de 55 $\mu\text{l}/\text{min}$ que es capaz de detectar el sensor) para las dimensiones del sistema. Además es complicado mantener un flujo de inyección constante, experimentando cambios bruscos en el flujo durante la inyección.

Estos flujos tan altos hacen que se produzcan fugas de hidrogel a los canales laterales. Es más, al retirar la jeringuilla del tubo, se generan bruscos cambios de volumen dentro del sistema y el hidrogel se dispersa por todo el chip microfluídico.

En conclusión, este sistema de inyección se descartó debido a flujos de inyección muy elevados y los cambios de volumen internos provocados.

3.2.2 INYECCIÓN CON MICROPIPETA

Tras descartar el uso de jeringuillas se propuso sustituirlas por micropipetas, ya que estas permiten una inyección mucho más lenta y controlada. Se empleó la micropipeta de mayor precisión disponible, en un intento de disminuir lo máximo posible la velocidad de inyección. Se carga el hidrogel dentro de la micropipeta y la punta de esta se introduce en el tubo de silicona central. Se empieza a impulsar el hidrogel con cuidado, intentando mantener un flujo bajo y constante. Posteriormente, una vez el hidrogel está dentro de la cámara del chip microfluídico, se procede a retirar la micropipeta con cuidado.

Sin embargo, a pesar de haber reducido considerablemente la velocidad de inyección, esta sigue siendo demasiado elevada y el hidrogel no queda completamente localizado en la microcámara central. Por otro lado, los desplazamientos de líquido que tienen lugar tanto al introducir como al retirar la micropipeta continúan ocasionando un fuerte desplazamiento del hidrogel y por consiguiente la pérdida del confinamiento.

3.2.3 INYECCIÓN POR PRESIÓN HIDROSTÁTICA

Debido a los problemas sufridos con los anteriores sistemas, se desarrolló un sistema de inyección de baja velocidad basado en diferencias de presión hidrostática.

Se procede del siguiente modo: el tubo central de entrada al sistema se ceba con el hidrogel y se cubre con hielo para evitar su polimerización mientras se prepara el resto del sistema. Al extremo libre del tubo de entrada se acopla una columna de líquido compuesta por un segmento de tubo acoplado a su vez a un tubo Eppendorff lleno con 1 ml de agua destilada. En la **figura 10** puede verse este montaje.

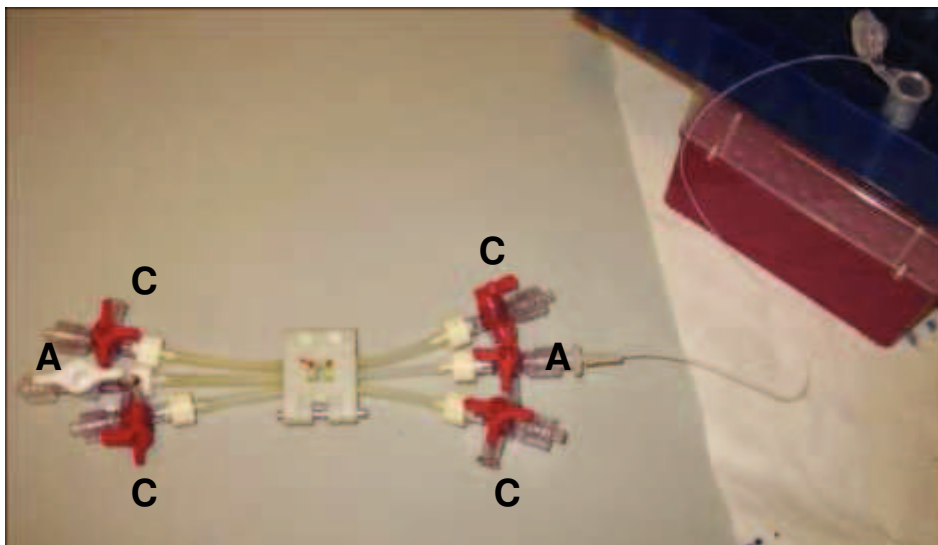


FIGURA 10: SISTEMA DE INYECCIÓN POR PRESIÓN HIDROSTÁTICA.

Para generar la presión que forzará al hidrogel a entrar en el sistema se sitúa el Eppendorff a una altura mayor que el resto del sistema. Regulando dicha altura se podrá controlar la presión ejercida sobre el volumen de hidrogel y por lo tanto se regula también su velocidad de entrada. La llave de tres vías acoplada a la columna de líquido permite generar o bloquear el flujo de hidrogel sin causar cambios de volumen internos.

Con esta metodología logramos obtener flujos estables de $1 \mu\text{l}/\text{min}$. El flujo es constante y no se aprecian movimientos del hidrogel bruscos dentro de la cámara central ni tampoco se aprecian fugas a los canales laterales durante la inyección.

En la **figura 11**, se muestra una foto de gel de colágeno teñido con azul de toluidina al 2% mediante el confinado por presión hidrostática.

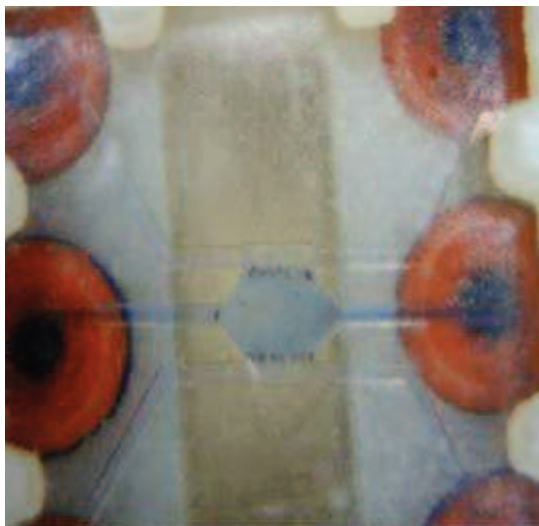


FIGURA 11: CONFINADO DEL CHIP DE UN HIDROGEL MEDIANTE PRESIÓN HIDROSTÁTICA. Para facilitar su detección el hidrogel se mezcló con azul de toluidina al 2%.

En conclusión, esta técnica basada en la presión hidrostática parece confinar el hidrogel apropiadamente, y por lo tanto se empleará durante los ensayos de cultivo celular en 3D.

3.3 TESTEO DEL PROTOCOLO DE CONFINAMIENTO EN ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR 3D

Debido a sus buenos resultados en las pruebas se decidió emplear el protocolo desarrollado en ensayos preliminares de cultivo celular 3D. En estos ensayos no se puede incorporar el colorante azul de toluidina al hidrogel debido a su toxicidad sobre las células, de hecho se recomienda evitar el uso de cualquier colorante. Para evaluar la eficacia del protocolo se marcaron las células empleadas con un compuesto fluorescente y poder así determinar si quedaban localizadas exclusivamente en la microcámara central o no.

En la **figura 12** se muestran los resultados logrados con este método. En **(A)** a tiempo cero y **(B)** a las 2 h de flujo.

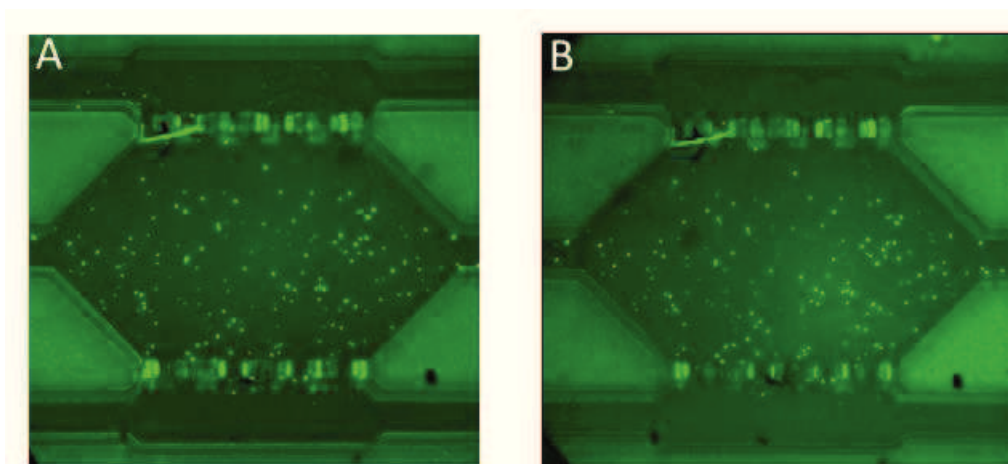


FIGURA 12: CONFINAMIENTO MEDIANTE INYECCIÓN CON PRESIÓN HIDROSTÁTICA. (A) Distribución de las células tras confinar el hidrogel. (B) Distribución de las células en el mismo ensayo tras 2 horas aplicando un flujo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ por el microcanal superior.

Tal y cómo se puede apreciar la mayoría de las células quedan dentro de la microcámara central, sugiriendo que el hidrogel se encuentra casi exclusivamente dentro de la misma. Se comprobó que ambos microcanales laterales podían profundirse fácilmente, mientras que el microcanal central no. Además, tras la perfusión de medio por los microcanales laterales, las pocas células localizadas en estos desaparecieron, mientras que las situadas en la microcámara central se mantuvieron en la misma posición, validando este protocolo para confinar el hidrogel.

Sin embargo, este protocolo demostró tener un inconveniente serio, y es la pérdida de células experimentada durante el proceso de inyección mostrado en la **figura 13**. Este protocolo permitía reducir la velocidad de inyección a los valores necesarios para lograr un confinamiento eficaz, sin embargo esto implica que el tiempo empleado por el hidrogel para recorrer los microcanales internos del sistema y alcanzar la cámara central es también largo. Durante este tiempo las células, que son más densas que el hidrogel, van sedimentando en el fondo de los distintos tubos y microcanales, por lo que la densidad celular que alcanza la microcámara central es mucho menor a la

preparada de antemano. Aunque es un efecto que puede tratar de compensarse aumentando la densidad inicial, hace difícil de controlar el proceso, ya que dependiendo de la velocidad de inyección lograda este efecto será más o menos grave.



FIGURA 13: PÉRDIDA POR SEDIMENTACIÓN CELULAR DEBIDO A LA LENTA VELOCIDAD DE INYECCIÓN. Se sembró una densidad celular inicial de 3 millones de células/ml, dado que el volumen interno de la microcámara es de 0.3 μ l, deberían verse alrededor de 900 células.

CAPÍTULO 4

CONFINAMIENTO DEL HIDROGEL DE COLÁGENO EN CHIPS SECOS

Debido a los inconvenientes antes mencionados se decidió abordar el confinamiento del hidrogel desde una nueva perspectiva. En este capítulo se detalla el desarrollo de una técnica de confinamiento basada en las propiedades del material del chip microfluídico.

En la literatura se pudieron encontrar algunos ejemplos de chips microfluídicos que permitían confinar hidrogeles dentro de una microcámara central basándose en las propiedades del material específico empleado, generalmente PDMS (Ref. 10-11-12). Para lograr el confinamiento, tales chips microfluídicos debían estar completamente secos y la velocidad de inyección debía ser baja. En un primer momento se intentó imitar este sencillo protocolo en nuestro sistema. Se montó todo el sistema tal y cómo se ha descrito previamente en el **capítulo 3**, pero esta vez se mantuvo completamente seco. Finalmente, se procedió a inyectar el hidrogel mediante el protocolo basado en presión hidrostática.

En la siguiente **figura 14**, se muestra una serie de imágenes grabadas con el microscopio USB del confinamiento en la cámara central a tiempo real de hidrogel de colágeno a 2 mg/ml sin teñirlo con azul de toluidina. Como se

puede apreciar, este sistema de inyección permitió confinamientos muy precisos y reproducibles.

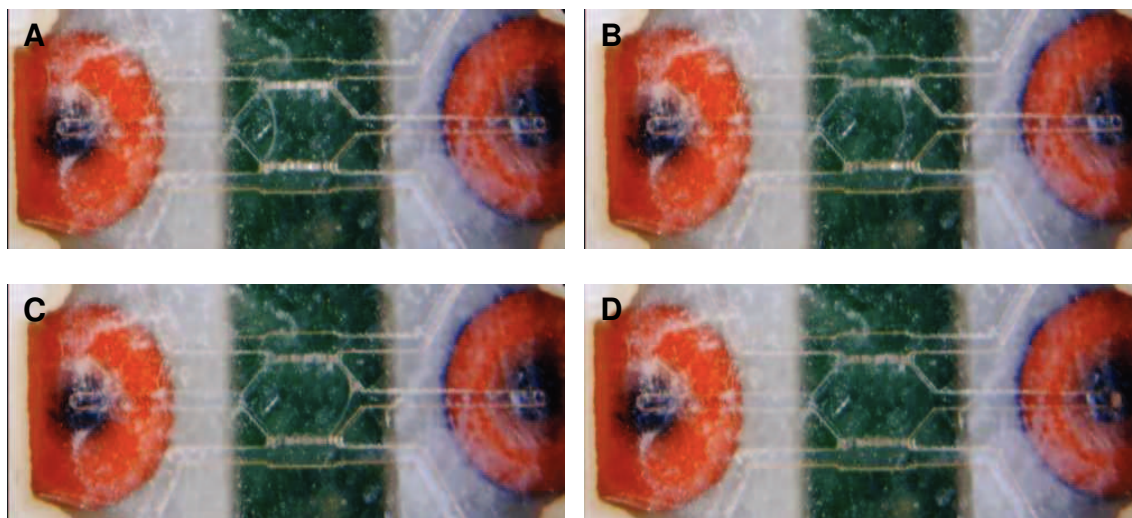


FIGURA 14: CONFINAMIENTO DEL HIDROGEL EN LA MICROCÁMARA CENTRAL EN MICROCHIP SECO. (A) Hidrogel entrando a la microcámara, (B) Interfase hidrogel/aire en la cámara y los pilares, (C) Confinamiento completo de la microcámara y los pilares y (D) El hidrogel termina de confinar por el canal central hasta salir por la salida microfluídica opuesta a la de inyección.

Sin embargo, durante la fase de polimerización del hidrogel se observaron una serie de problemas. Se observó que, cuando el frente del hidrogel alcanzaba la salida microfluídica del chip, se detenía y no lograba atravesar la junta tórica y salir del sistema por el otro extremo. Si aumentábamos la presión ejercida sobre el hidrogel, aumentando la altura de la columna de líquido, lo que provocábamos era la fuga del hidrogel a los microcanales laterales. En la siguiente **figura 15**, se muestra el resultado al presionar el hidrogel para intentar hacerlo salir del chip microfluídico.

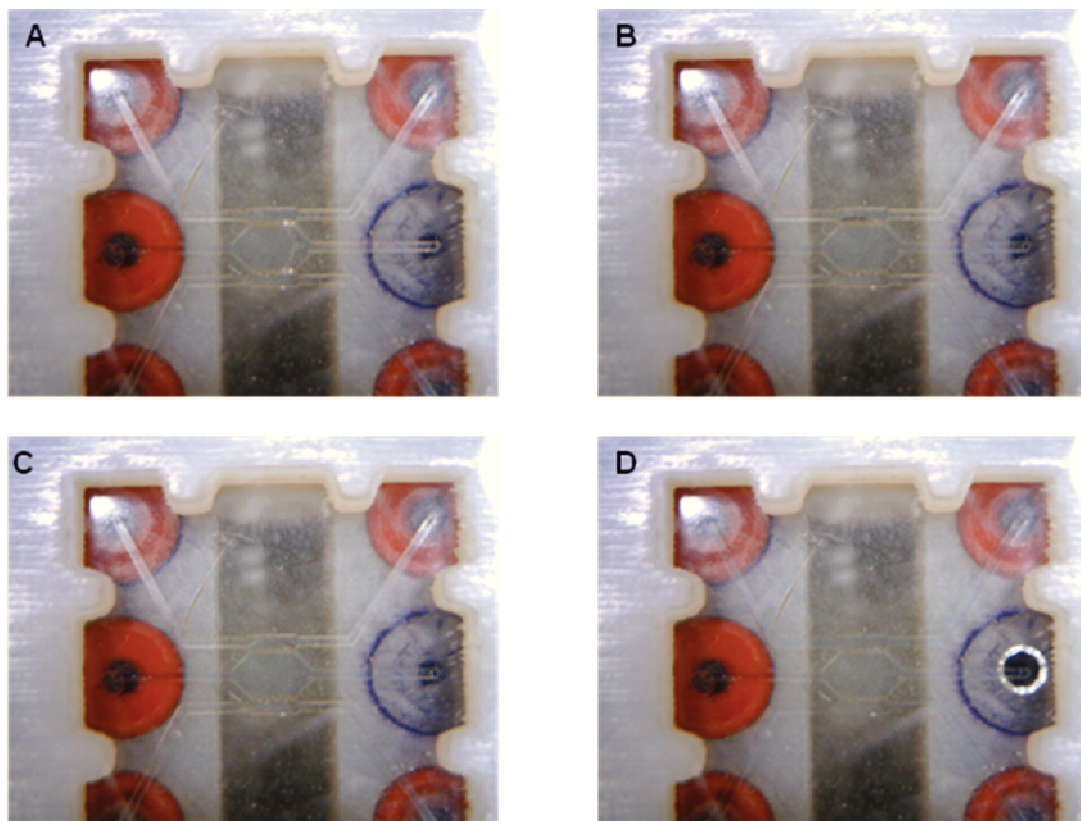


FIGURA 15. PROBLEMÁTICA EN LA SALIDA MICROFLUÍDICA. (A) Confinado del hidrogel en la cámara central. (B) Se comienza a aumentar la presión sobre el hidrogel para intentar forzar su salida por el extremo del canal central. (C) Esta sobrepresión hace que el hidrogel comience a invadir el canal lateral superior, arruinando el confinamiento (D) Una vez que el hidrogel ha invadido todo el chip microfluídico, aplicando una presión elevada se logra forzar su salida por el microcanal central.

Por otro lado, durante la polimerización del hidrogel se observó un problema más grave que el anterior. Para asegurar que la polimerización del hidrogel se ha completado se esperan 15 minutos, durante los cuales se veía como, dentro de la microcámara central, el frente del hidrogel comenzaba a retroceder de nuevo y dejaba un volumen muerto que era ocupado por aire. Finalmente, este aire ocupaba casi por completo la cámara central y arruinaba el confinamiento.

En la **figura 16** se pueden ver imágenes de cómo ocurre este proceso.

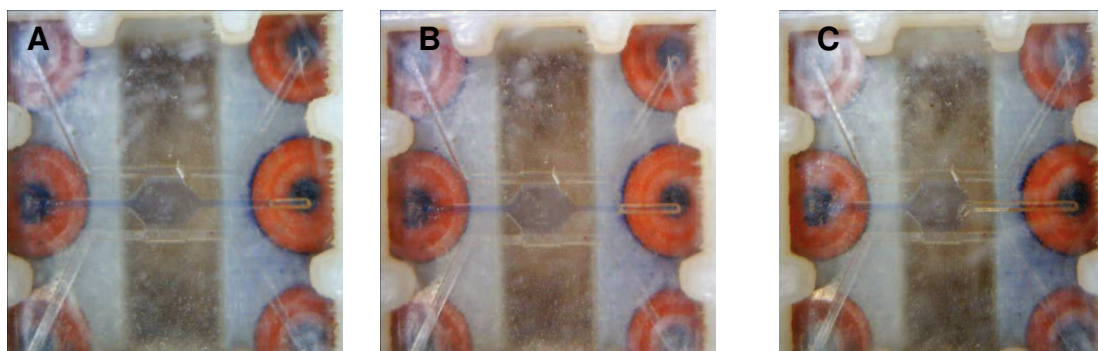


FIGURA 16: SUCESIÓN DE IMÁGENES DE LA RETRACCIÓN DEL GEL. (A) Empieza a retraerse desde el “o-ring”, (B) Continúa avanzando por el microcanal central, y (C) Alcanza a la microcámara central provocando pérdida total del confinamiento.

En conclusión, este protocolo permitía obtener un confinamiento muy preciso, reproducible y más rápido que el usado en el **capítulo 3**. Además, este protocolo, en teoría, permitiría obtener una interfase entre el hidrogel y el medio muy definida, lo que sería interesante para ciertos experimentos, como yuxtaponer dos hidrogeles diferentes uno al lado de otro y estudiar el comportamiento celular. No obstante, experimentábamos problemas de retracción del hidrogel que no lográbamos explicar, por lo que en los siguientes capítulos tratamos de analizar en detalle este proceso.

CAPÍTULO 5

MODELIZACIÓN DEL PROCESO DE CONFINADO

Debido a la aparente dificultad para lograr un confinamiento eficiente, se analizó en detalle este proceso. Actualmente, existen algunos dispositivos microfluídicos que están siendo usados para el cultivo celular 3D, y en términos generales comparten un diseño común: poseen una microcámara central, en la que tendrá lugar la localización del gel, y dos microcanales laterales. Los canales laterales están separados de la cámara por una serie de columnas espaciadas regularmente.

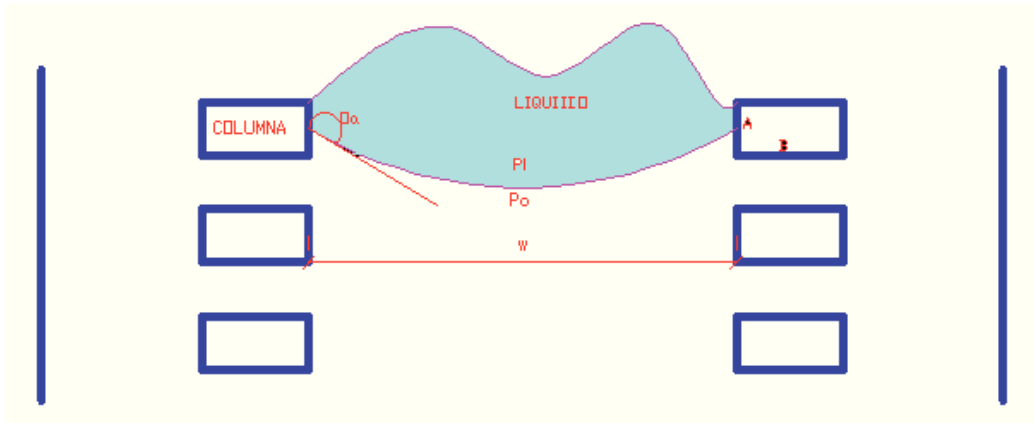
5.1 FUNDAMENTO TEÓRICO DEL PROCESO DE CONFINAMIENTO

En general, los dispositivos empleados para el cultivo celular en 3D se fabrican en PDMS, ya que presenta buenas propiedades en términos de biocompatibilidad, transparencia y precio.

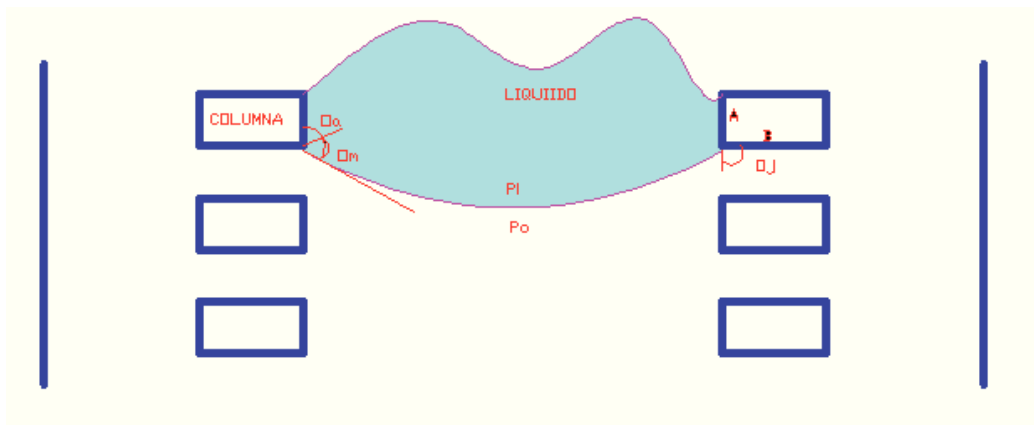
Durante la inyección del hidrogel dentro de estos chips microfluídicos, la presión ejercida por el émbolo de la pipeta (ΔP_p) va impulsando el líquido a lo largo del dispositivo. Cuando este líquido llega a la cámara central, se forman

diferentes interfaces líquido/aire entre los pilares, tal y cómo se muestra en la sucesión de imágenes de la **figura 17**.

A)



B)



C)

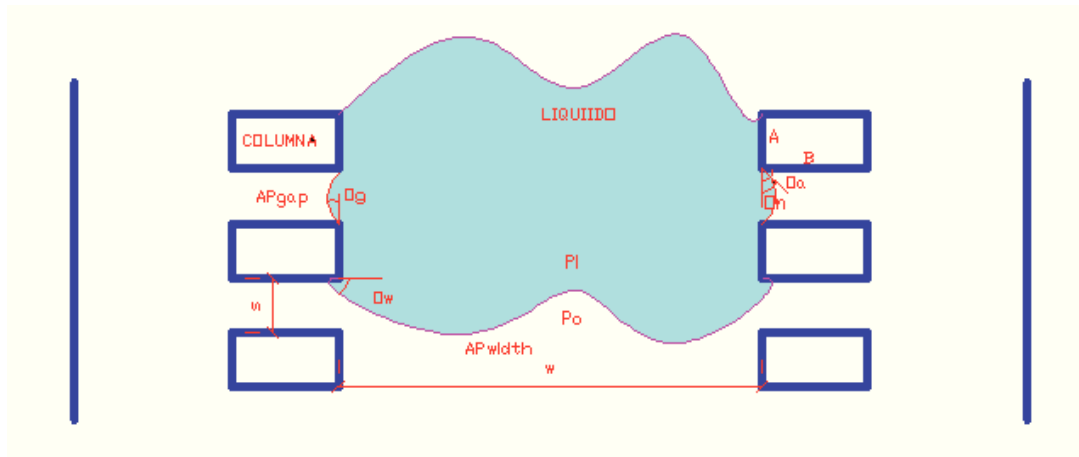


FIGURA 17: COMPORTAMIENTO FÍSICO DEL HIDROGEL MIENTRAS SE CONFINA EN LA CÁMARA CENTRAL.

(A) Paso del hidrogel por las primeras columnas y el ángulo que forma la interfase líquido/aire, (B) Ángulos que forma el hidrogel al salir de las primeras columnas y la interfase, (C) Diferencia de presión entre interfases (ΔP_{gap} y ΔP_{width}) y sus ángulos correspondientes.

La ecuación de Young-Laplace permite analizar la diferencia de presión estas interfases:

$$\Delta P = -2\gamma \left(\frac{\cos \theta_c}{w} + \frac{\cos \theta_c}{h} \right)$$

Dónde ΔP describe la caída de presión a través de la interfase ($P_o - P_i$) como una función de la tensión superficial (σ), del ángulo de contacto (θ_c) y del ancho (w) y alto (h) de la interfase. La mayoría de los hidrogeles están compuestos esencialmente por agua, por lo que la tensión superficial se asume igual a la del agua ($0,072 \text{ N/m}^2$), mientras que el ángulo de contacto depende del material del chip microfluídico. Para el SU-8 este ángulo oscila entre 72° y 86° , mientras que para el PDMS varía entre 110° y 140° . La anchura y altura de la interfase las determina la geometría del propio dispositivo, y por lo tanto calcular la diferencia de presión en estas interfases es una tarea sencilla.

En este contexto, ΔP_w equivale a la mínima presión requerida para hacer avanzar el líquido a través de la cámara central. Mientras que ΔP_g equivale a la máxima presión que el sistema puede soportar antes de que las interfases laterales comiencen a avanzar entre los pilares y ocurran fugas. Por lo tanto, para garantizar el confinamiento debe cumplirse que la presión de inyección del gel sea mayor que ΔP_w y menor que ΔP_g .

5.2 ANÁLISIS DE PROCESO DE CONFINAMIENTO.

Para satisfacer que $\Delta P_w < \Delta P_p < \Delta P_g$, el diseño del chip microfluídico puede optimizarse y así tratar de maximizar la diferencia entre ΔP_g y ΔP_w .

Cómo ejemplo, en la **figura 18**, se representa cómo varía esta diferencia ($\Delta P_{gap} - \Delta P_{width}$) al modificar el espacio entre columnas o la anchura de la cámara.

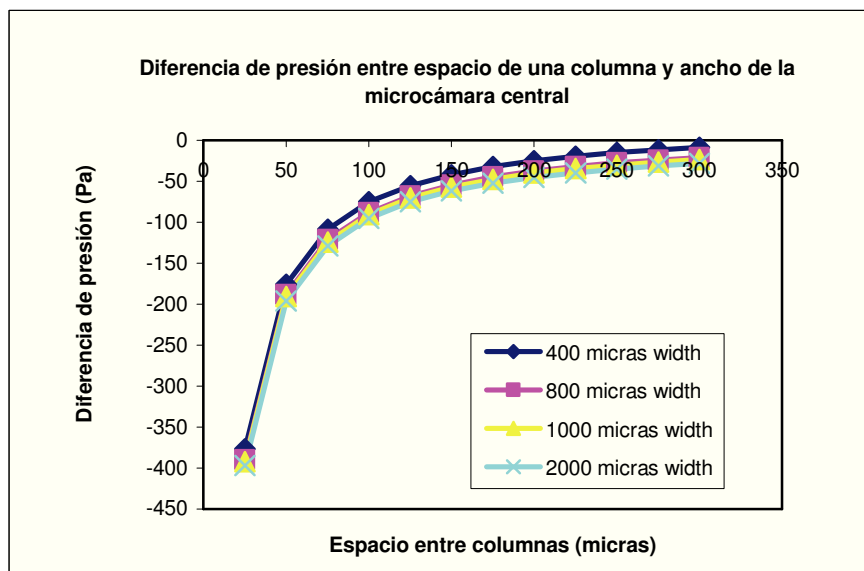


FIGURA 18: GRÁFICA QUE REPRESENTA LA DIFERENCIA DE PRESIÓN ENTRE COLUMNAS Y ANCHO DE LA MICROCÁMARA CENTRAL.

En esta gráfica se ve como varía la diferencia de presión ($\Delta P_{gap} - \Delta P_{width}$) frente al espacio entre columnas para diferentes anchuras de la cámara central.

Se trabaja para un rango de valores de espacio entre columnas de 25 a 300 μm , dando valores de diferencia de presión, en un rango de (-450 a 0) Pa.

En este caso, las diferencias de presión son negativas porque nuestro chip está hecho de SU-8, material ligeramente hidrofílico con un ángulo de contacto de entre ($72\text{-}86^\circ$). Por otra parte, se puede observar como al aumentar el espacio entre columnas, aumenta la diferencia de presión considerablemente. En cuanto a la variación de la anchura de la cámara no es de gran relevancia el cambio en la diferencia de presión.

En la **figura 19** se representa la diferencia de presión ($\Delta P_{\text{gap}} - \Delta P_{\text{width}}$) variando el espacio entre columnas y el ángulo de contacto.

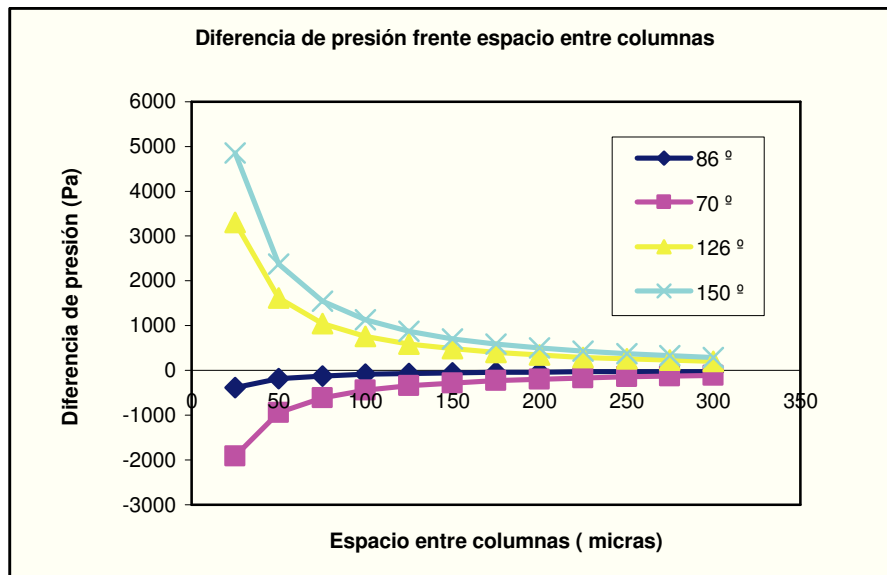


FIGURA 19: GRÁFICA QUE REPRESENTA LA DIFERENCIA DE PRESIÓN FRENTE AL ESPACIO ENTRE COLUMNAS VARIANDO EL ÁNGULO DE CONTACTO.

En esta gráfica se muestra como varía la diferencia de presión ($\Delta P_{\text{gap}} - \Delta P_{\text{width}}$) frente al espacio entre columnas para diferentes ángulos de contacto. Esta figura pone de manifiesto que dependiendo de si el ángulo de contacto es mayor o menor de 90° , el signo de la diferencia de presión cambia. Para ángulos de contacto por encima de 90° , como es el caso del PDMS usado en la literatura, las diferencias de presión son positivas y permiten confinar el

hidrogel siempre que el espacio entre columnas sea menor que la anchura de la microcámara central.

Por otro lado, cuando el ángulo de contacto está por debajo de 90° , como ocurre en el SU-8, la situación cambia dramáticamente y de hecho la invasión de los canales laterales está favorecida.

En conclusión, al trabajar con SU-8, que es ligeramente hidrofílico, el protocolo confinamiento en seco empleado en otros dispositivos hidrófobos, resulta ser imposible, porque la diferencia de presión ($\Delta P_{\text{gap}} - \Delta P_{\text{width}}$) tiende a ser negativa en cualquier caso.

CAPÍTULO 6

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA CONFINAMIENTO

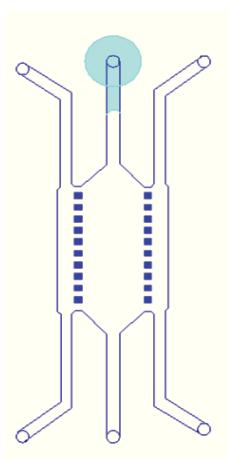
Tras ver los resultados obtenidos mediante el protocolo de confinamiento empleado para dispositivos hidrofóbicos en nuestro dispositivo, se intentó modificar dicho protocolo para adaptarlo a dispositivos hidrofílicos. Finalmente se pudo obtener un protocolo modificado que resultó ser una alternativa sencilla y simple en cuanto a material y proceso para inyectar el hidrogel.

6.1 PRINCIPIOS FÍSICOS DEL PROTOCOLO ALTERNATIVO

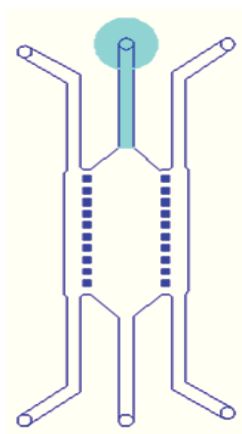
Como se ha explicado previamente, el carácter ligeramente hidrofílico del SU-8 hace que los líquidos se comporten de manera distinta en comparación con los dispositivos hidrofóbicos hechos en PDMS. En nuestro dispositivo hidrófilo, una vez que la solución de hidrogel ha comenzado a entrar en un microcanal (**Figura 20A**), el proceso de llenado continuará de forma espontánea debido a esta hidrofiliidad. Una vez que el hidrogel llega a la cámara central, la anchura del microcanal comienza a aumentar, llegando hasta las 1000 μm . En los dos vértices que delimitan este ensanchamiento de la microcámara central la interfase líquido-aire se queda detenida. Esto se debe a que en estos vértices las paredes del dispositivo han cambiado de dirección, haciendo que el ángulo de contacto con el líquido también cambie (**Figura 20B**). En este punto la interfase forma un ángulo con las paredes del microcanal de 90° , y por lo tanto,

según la ecuación de Young-Laplace, la diferencia de presión es nula. Por lo tanto, la presión que inducía el llenado del chip desaparece y este proceso de llenado espontáneo se detiene. Para que el proceso continúe debe aplicarse una presión externa, ejercida con la micropipeta, y obligar a esta interfase a curvarse hasta que alcance un ángulo de contacto con las nuevas paredes similar al ángulo de contacto nativo (en torno a 80° para el SU-8 y el agua) (**Figura 20C**). Una vez que la interfase ha alcanzado este ángulo, el proceso de llenado vuelve a ser espontáneo hasta que la interfase alcanza los primeros pilares (**Figura 20D**). En este punto la situación es similar a la que ocurría a la entrada de la cámara, pero en esta ocasión existen dos interfases laterales y una central de mayor anchura. Para forzar el avance del hidrogel debe ejercerse de nuevo una presión suficiente como para que alguna de las nuevas interfases alcance una curvatura equivalente al ángulo de contacto nativo (80°) (**Figura 20D**). Tal y cómo se ha descrito previamente, la ecuación de Young-Laplace establece que ante una presión determinada la curvatura adoptada por una interfase depende de su altura y anchura. En la **figura 20D** puede observarse que las interfases laterales poseen una anchura mucho menor que la principal, y por lo tanto ante una presión determinada su ángulo de contacto será menor que para la interfase principal. Esto causa que la presión necesaria para hacer avanzar la interfase principal sea menor que en las interfases laterales, y por lo tanto se favorece el llenado de la microcámara central sin provocar la fuga a los microcanales laterales (**Figura 20E**). Esta situación se repetirá a lo largo de todos los pilares, y finalmente se habrá logrado llenar la microcámara central mientras que los laterales permanecen libres de líquido (**Figura 20F**).

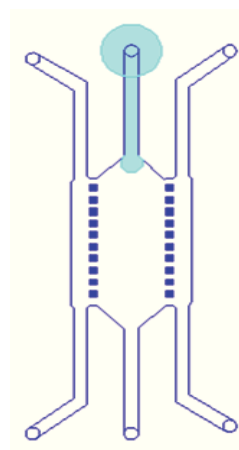
A)



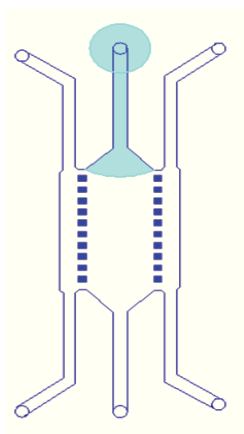
B)



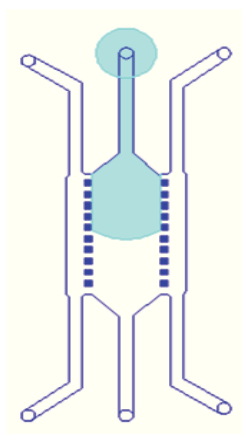
C)



D)



E)



F)

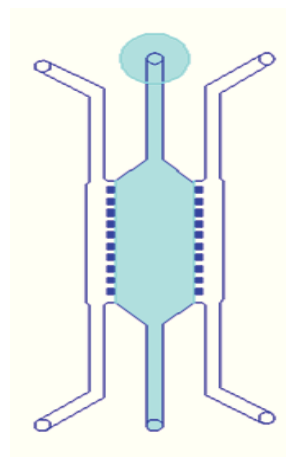


FIGURA 20: SIMULACIÓN CONFINADO DE HIDROGEL MEDIANTE EL NUEVO PROTOCOLO. (A) Depósito de la gota, (B) Entrada del hidrogel por diferencias de presión a la microcámara central, (C) menisco cóncavo entrando en la microcámara, (D) Menisco convexo confinado la primera columna, (E) Hidrogel confinado mitad de la microcámara y percepción de las interfases tanto en la microcámara como en los microcanales laterales y columnas y (F) Confinado completo del hidrogel en la microcámara y sin percepción de fugas.

6.2 PROTOCLO ALTERNATIVO

Los pasos a seguir en este protocolo son los siguientes:

1. Colocar un chip totalmente seco y limpio en una placa de cultivo.
2. Preparar el hidrogel de colágeno según el protocolo **A**.
3. Con una pipeta de 10 μ l se introduce una pequeña cantidad de hidrogel a través de una de las entradas microfluídicas centrales del chip microfluídico. Una vez que se aprecia que el hidrogel ha comenzado a entrar dentro del chip se retira la pipeta de la entrada, dejando colocada una pequeña gota de 5 -10 μ l sobre la entrada empleada previamente.
4. Finalmente se lleva el chip a una estufa para polimerizarlo a 37 ° C durante 15 minutos aproximadamente. Una vez pasado este tiempo, el chip se coloca dentro del encapsulado y ya se encuentra el sistema listo para trabajar.

En la **figura 21**, puede observarse el resultado final de una disolución de agua teñida con azul de toluidina tanto exteriormente como interiormente del chip microfluídico en la parte **(A)** y **(B)**. Mientras que en la parte **(C)** de la figura puede observarse un cultivo celular confinado con esta técnica. Debido a la rapidez de este protocolo no se detectó ninguna desviación entre la densidad celular preparada y la sembrada finalmente.

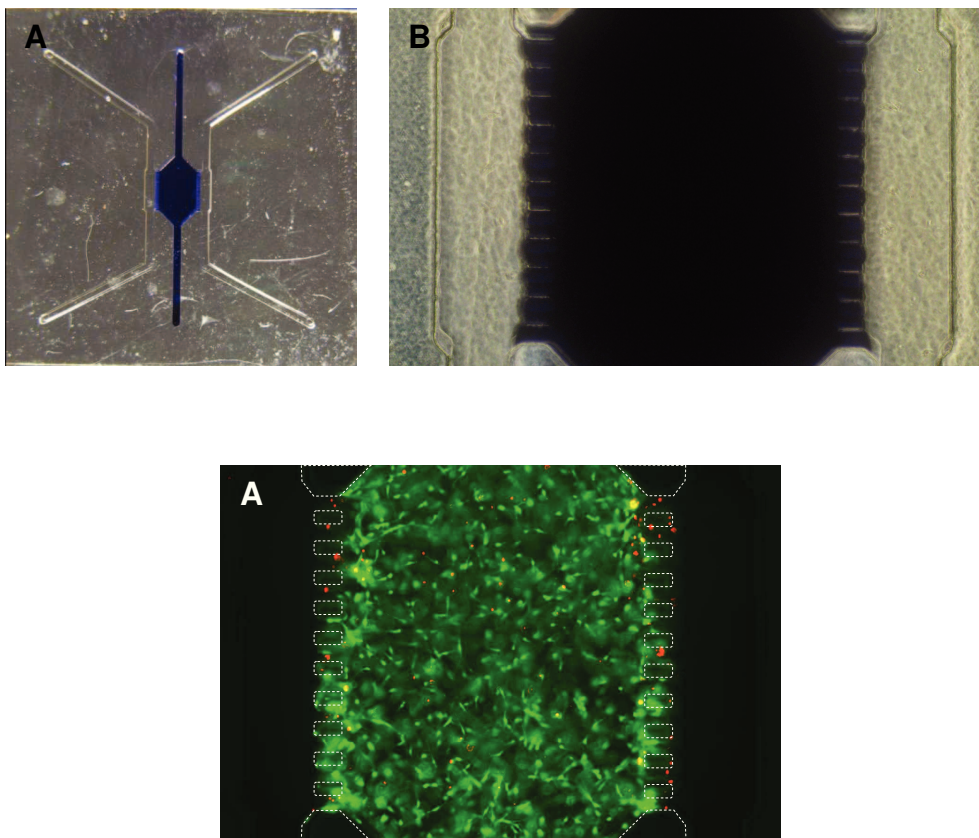


FIGURA 21: RESULTADOS DEL NUEVO PROTOCOLO DE CONFINADO. (A) Vista desde el exterior de una disolución de azul de toluidina 100 %, (B) Vista de la microcámara central al microscopio y (C) Distribución de las células dentro del chip microfluídico empleando el protocolo desarrollado. Las células se han marcado con la tinción de viabilidad, apareciendo las vivas en verde y las muertas en rojo.

6.3 CONCLUSIÓN

Este último protocolo permite confinar el hidrogel dentro de la microcámara con una metodología muy sencilla y altamente reproducible. Con este protocolo se obtiene una clara interfase entre el hidrogel y el medio de los microcanales laterales, lo que permitiría el diseño de multitud de experimentos.

CAPÍTULO 7

FORMACIÓN DE GRADIENTES BIOQUÍMICOS DENTRO DEL CHIP MICROFLUÍDICO

La comunicación celular frecuentemente está mediada por gradientes bioquímicos y estos rigen muchos procesos biológicos distintos. Tal y cómo se ha descrito previamente, existen diferentes artículos en los que se ha desarrollado un dispositivo microfluídico, basado normalmente en PDMS, para generar gradientes bioquímicos. La formación de estos gradientes se consigue haciendo fluir un medio con una sustancia química concreta a través de uno de los microcanales, mientras que por el otro microcanal se hace fluir un medio que carece de este compuesto. Dicho compuesto comenzará a difundir a través del hidrogel hasta alcanzar el otro microcanal, dónde será arrastrado fuera del dispositivo por el flujo de medio. Con el tiempo se establecerá un equilibrio químico y se habrá establecido un gradiente de concentración de esta sustancia a lo largo de la microcámara central.

En este capítulo, se describe la formación de un gradiente químico en el chip microfluídico haciendo pasar distintos líquidos coloreados por cada canal. El resultado esperado sería que ambos colorantes comenzasen a difundir hacia la microcámara y termine formándose un gradiente de colores. El objetivo de estos ensayos es comprobar la capacidad del sistema para generar estos gradientes químicos.

7.1 PROTOCOLO PARA LA FORMACIÓN DE GRADIENTES

Los pasos a seguir en el sistema de formación de gradientes, son los siguientes:

1. En primer lugar, se procede a la preparación del hidrogel de colágeno según protocolo **A**, y se confina siguiendo el protocolo desarrollado en el **capítulo 6**.
2. Una vez polimerizado y colocado dentro del encapsulado, se preparan dos tubos con 1 ml cada uno de los líquidos que se van a perfundir: una solución azul y otra amarilla preparadas a partir de colorantes de impresora. Cada reservorio se acopla a un sistema neumático como se explica en el **capítulo 2** y conectan los tubos al encapsulado. Se visualiza la microcámara central mediante un microscopio en color conectado al ordenador vía USB.
3. Con el sistema ya preparado, se procede a la abertura de las válvulas de aire de los sistemas neumáticos e inyectamos los líquidos coloreados dentro del sistema. Regulando la presión aplicada controlamos el flujo de líquido dentro de cada microcanal, y aplicamos en torno a 0.1-0.2 bares.
4. Se observa la entrada de ambos líquidos en el chip y se toman fotos a medida que el frente de difusión de los colorantes va avanzando a través del hidrogel. Las dos salidas del sistema se introducen dentro de un tubo Eppendorff para recoger el líquido eluído.

En la **figura 22** se muestra una sucesión de fotos del sistema durante un ensayo. Como se puede observar, se logró establecer un gradiente de color a lo largo de toda la cámara central, llegándose a obtener una coloración verde en el centro de la microcámara central.

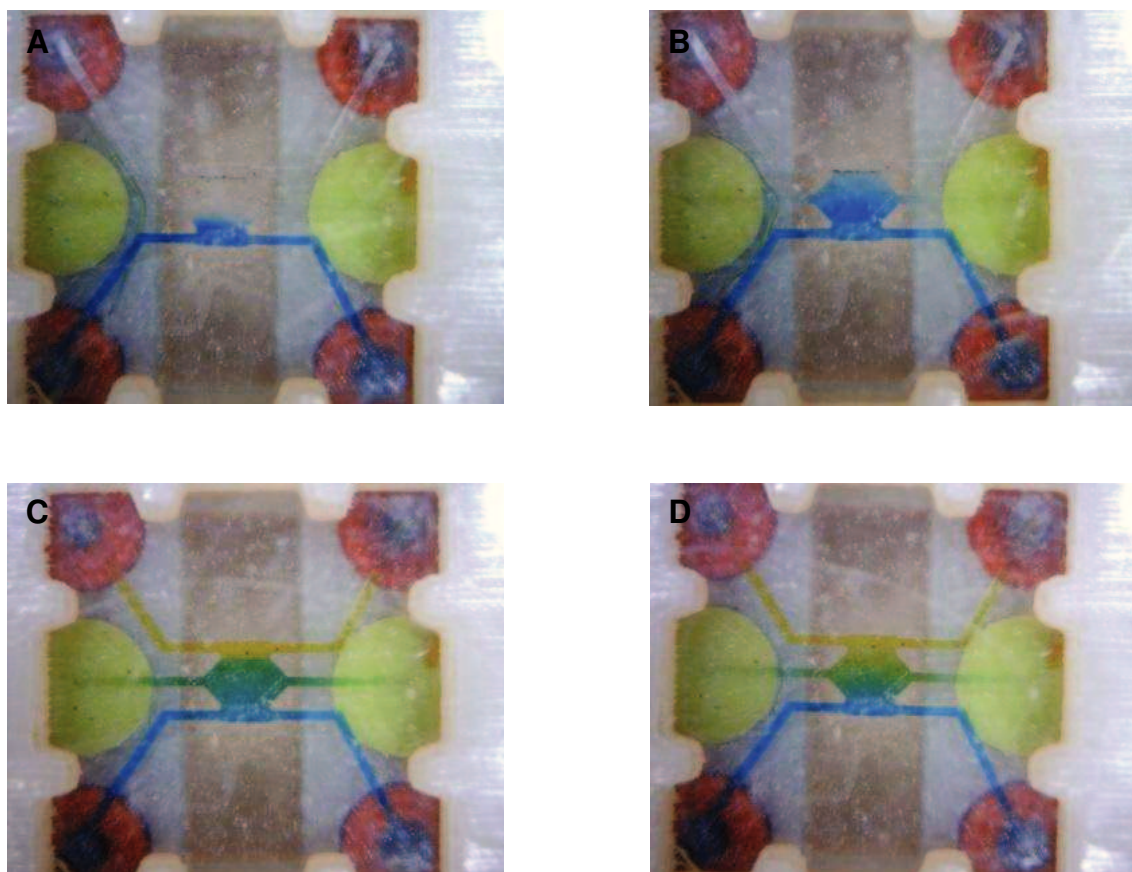


FIGURA 22: GRADIENTE DE COLOR EN LA CÁMARA CENTRAL DEL CHIP. (A) Se introduce el colorante azul por el microcanal inferior, (B) Se percibe la difusión en la microcámara, (C) Se introduce el segundo colorante, amarillo, por el otro microcanal y (D) Se forma gradiente en la microcámara central con el tiempo.

7.2 INESTABILIDAD EN LA FORMACIÓN DE GRADIENTES

Durante los ensayos de formación de gradiente surge un problema bastante grave que impide controlar de forma precisa el perfil del mismo. Una vez que ambos flujos están activados el gradiente comienza a establecerse, sin embargo a medida que transcurre el tiempo se observa que poco a poco uno de los colores va invadiendo la cámara central hasta que alcanza el microcanal

opuesto. De modo que finalmente, en un tiempo variable en cada ensayo, queda toda la cámara central de un solo color y el otro queda restringido a su microcanal lateral. Esto ocurrió en todos los ensayos y el color que invadía la microcámara central variaba en cada ensayo.

Este fenómeno probablemente se debe a que parte del flujo de uno de los microcanales está desviándose parcialmente a través de la microcámara central hasta el otro microcanal. Este flujo transversal parece ser muy reducido, pero tarde o temprano termina por arruinar el gradiente ya que un color domina por completo en la microcámara central.

Para entender el problema de la aparición de este flujo transversal se deben analizar a las ecuaciones que definen como se divide un flujo en una encrucijada. Dichas ecuaciones son completamente análogas a las que definen el reparto de la corriente eléctrica en una bifurcación dentro de un circuito eléctrico. En la **figura 23** se muestra un esquema que analiza nuestro sistema y lo compara con un circuito eléctrico.

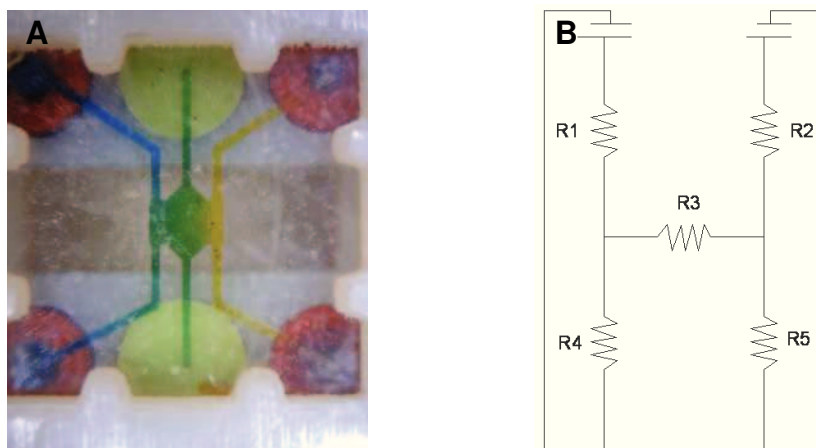


FIGURA 23: ESQUEMA DEL MICROCHIP. (A) Flujo cruzado e invasión del color amarillo en la microcámara central y (B) Esquema que analiza el sistema y lo compara con un circuito eléctrico.

En la analogía mostrada en la **figura 23**, la diferencia de presión que impulsa los líquidos y el flujo del mismo equivalen, respectivamente, a la diferencia de potencial y a la intensidad de corriente (I) de un circuito eléctrico. Se muestran las diferentes resistencias originadas tanto por el hidrogel de colágeno como por los propios tubos y microcanales del sistema. Es decir, R_1 y R_2 son las

resistencias del microcanal antes de llegar a la microcámara central. R_4 Y R_5 son las resistencias que ofrecen los microcanales y tubos después de la microcámara central. Y finalmente R_3 , es la resistencia que ofrece el hidrogel de colágeno confinado en la microcámara central.

Para explicar como se divide el flujo que pasa por el microcanal lateral izquierdo, hay que atender a la siguiente ecuación:

$$I_1 = I_t \cdot \frac{R_T}{R_4 + R_T}$$

Siendo I_1 el flujo que pasa a través del canal lateral izquierdo, R_4 es la resistencia ofrecida por la salida del microcanal lateral izquierdo y R_T , la resistencia total que ofrece el resto del sistema. Para el caso del flujo que sale por el canal lateral derecho, se utiliza la misma ecuación de antes pero ahora quedaría:

$$I_2 = I_t \cdot \frac{R_T}{R_5 + R_T}$$

En teoría, el hidrogel es un elemento que genera gran resistencia al paso del flujo, aunque el valor exacto dependerá de la concentración de hidrogel empleada. Para definir las resistencias ofrecidas por los canales laterales, se utiliza la siguiente fórmula:

$$R = \frac{k}{d^4}$$

Dónde “k” es una constante y “d” es el diámetro del canal por donde pasa el flujo elevado a su cuarta potencia. Cómo se puede ver el elemento dominante al calcular la resistencia de un conducto circular es su diámetro.

En principio asumimos que $R_1 = R_2$ y $R_4 = R_5$. Debido a la presencia del hidrogel, R_3 es mucho mayor que el resto de resistencias, lo que hará que la mayor parte del flujo continúe por el microcanal lateral en lugar de desviarse a través de la microcámara. Sin embargo, por pequeño que sea, siempre habrá un flujo transversal a través de la microcámara central, y hará que tarde o temprano uno de los colores domine por completo.

Para que esto no ocurriese debería garantizarse que la presión con que ambos líquidos alcanzan la microcámara central es exactamente la misma, lo que debido al error instrumental o imperfecciones de los materiales no es posible.

En conclusión, aunque hemos podido demostrar la formación de un gradiente químico a través de la microcámara, mantener dicho gradiente durante tiempos muy prolongados es complicado sin reajustar manualmente la presión en cada lado.

CAPÍTULO 8

DESARROLLO DE CULTIVO CELULAR 3D EN CHIPS MICROFLUÍDICOS

Como se ha comentado al principio del presente proyecto, el comportamiento celular es muy diferente en una matriz extracelular 3D respecto de un microambiente 2D. Tanto las propiedades mecánicas, como las características químicas de estos microambientes 3D juegan un papel muy importante en la ingeniería de tejidos.

En este capítulo se detallará el proceso de cultivo celular en un microambiente 3D y su viabilidad dentro de chips microfluídicos. El objetivo del presente capítulo es determinar las óptimas condiciones para el cultivo celular dentro de los microdispositivos. Los ensayos de cultivo celular 3D se han realizado empleando células MT3C3, una línea de fibroblastos comercial. Se ha usado esta línea por su bajo coste y amplia distribución en la investigación biomédica.

En la siguiente **figura 24**, se esquematiza el microchip de un cultivo celular 3D con las células confinadas distinguiendo las vivas de las muertas en la cámara central y la diferenciación de los canales laterales entre un medio de nutrientes fresco y un medio pobre de nutrientes.

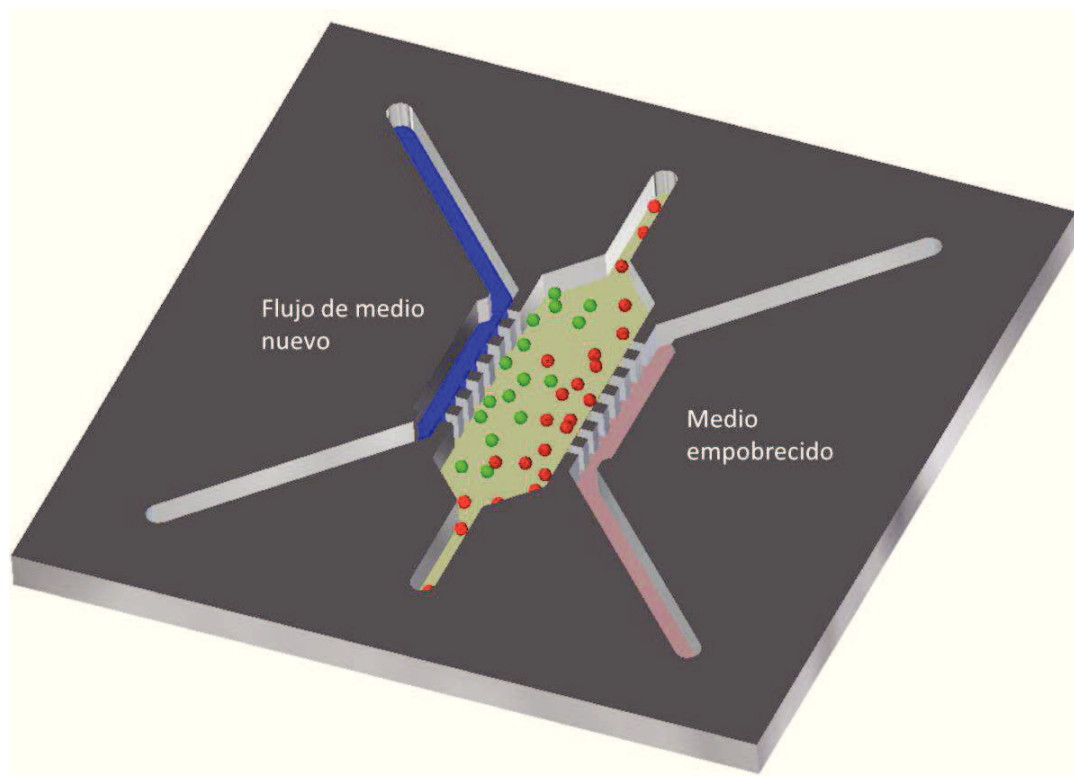


FIGURA 24: ESQUEMA DE LOS ENSAYOS QUE SE LLEVARÁN A CABO EN EL MICROCHIP DE CULTIVO CELULAR 3D. En este esquema un microcanal permanecerá sellado, mientras que a través del otro se perfundirá medio de cultivo nuevo continuamente. Las células irán consumiendo los nutrientes y el oxígeno de la microcámara central, generando así un gradiente de los mismos. En este esquema se hipotetiza que aquellas células más próximas a la fuente de oxígeno y nutrientes sobrevivirán (esferas verdes), mientras que las más alejadas morirán (esferas rojas).

8.1 RESULTADOS DE VIABILIDAD EN HIDROGELES DE COLÁGENO MACROSCÓPICOS

En primer lugar, para poder evaluar la viabilidad dentro de los chips se requiere de un sistema control con el que comparar los resultados. En este contexto, se elaboró un protocolo para obtener cultivos celulares 3D macroscópicos sembrados sobre placas de cultivo convencionales. En el anexo **B**, se explica detalladamente este protocolo así como los componentes empleados.

En estos ensayos se sembraron diferentes densidades celulares en distintos sistemas control para estudiar tanto la viabilidad celular en estos hidrogeles de colágeno como su estructura 3D. En estos ensayos es habitual que al ir

creciendo las células provoquen una contracción del hidrogel, reduciéndose su volumen. En ensayos macroscópicos esto no suele ser relevante, sin embargo en nuestro sistema esta contracción del hidrogel podría alterar el confinamiento y arruinar el ensayo. Se ha descrito esta contracción se reduce a medida que aumenta la concentración del hidrogel. Por lo tanto se testaron también diferentes concentraciones de hidrogel para evaluar su efecto en la viabilidad celular y en la contracción.

En las **figuras 25, 26, 27, 28, 29 y 30** se muestran cultivos celulares 3D macroscópicos a diferentes densidades celulares y variando también la concentración del hidrogel de colágeno. Tras 24 horas en cultivo la viabilidad en estos sistemas fue evaluada mediante el uso de una tinción de viabilidad para observar las células vivas, marcadas en verde, mientras que las muertas aparecen en rojo.

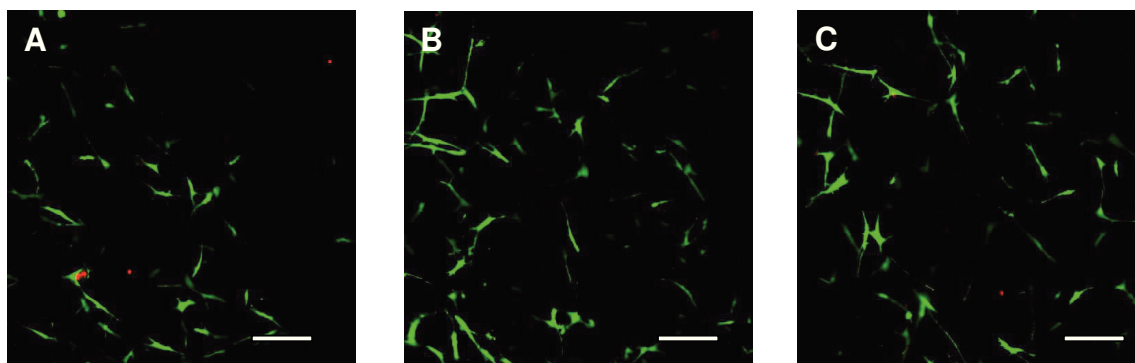


FIGURA 25: CULTIVO CELULAR 3D MACRO A DENSIDAD DE 1 MILLÓN CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 1,2 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μm .

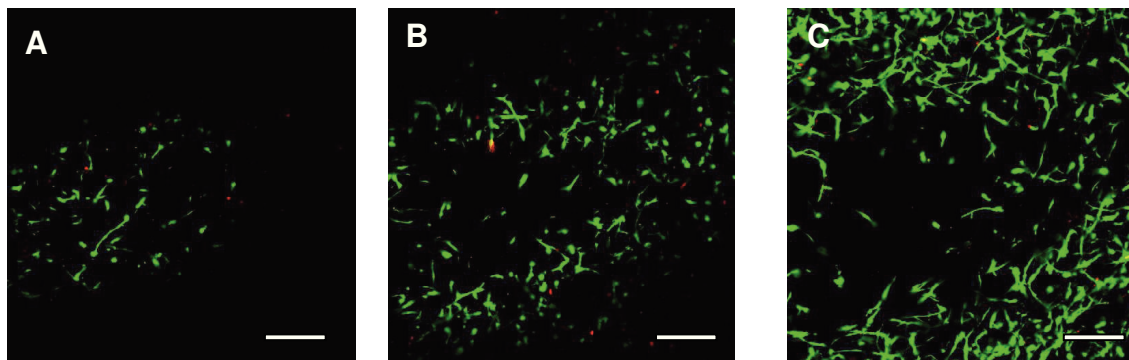


FIGURA 26: CULTIVO CELULAR 3D MACRO A DENSIDAD DE 3 MILLONES CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 1,2 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

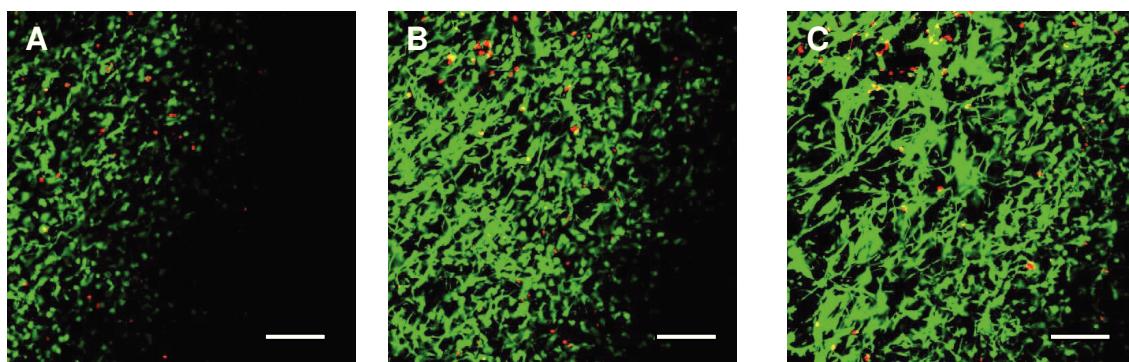


FIGURA 27: CULTIVO CELULAR 3D MACRO A DENSIDAD DE 10 MILLONES CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 1,2 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

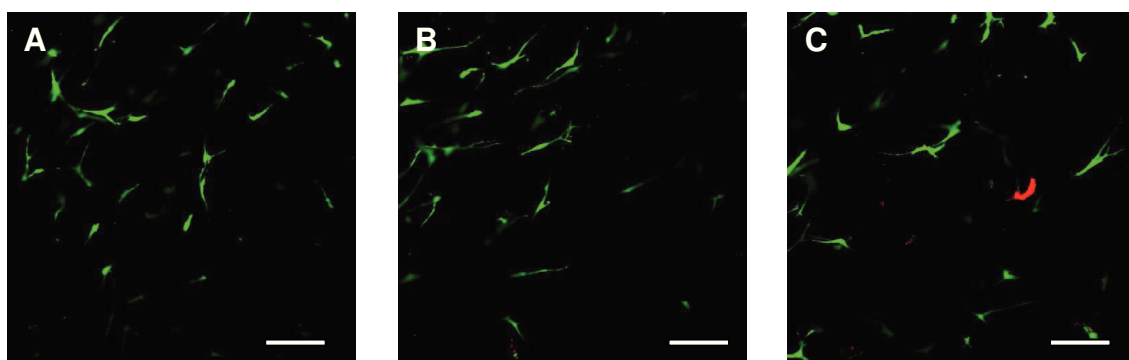


FIGURA 28: CULTIVO CELULAR 3D MACRO A DENSIDAD DE 1 MILLÓN CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 2,4 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

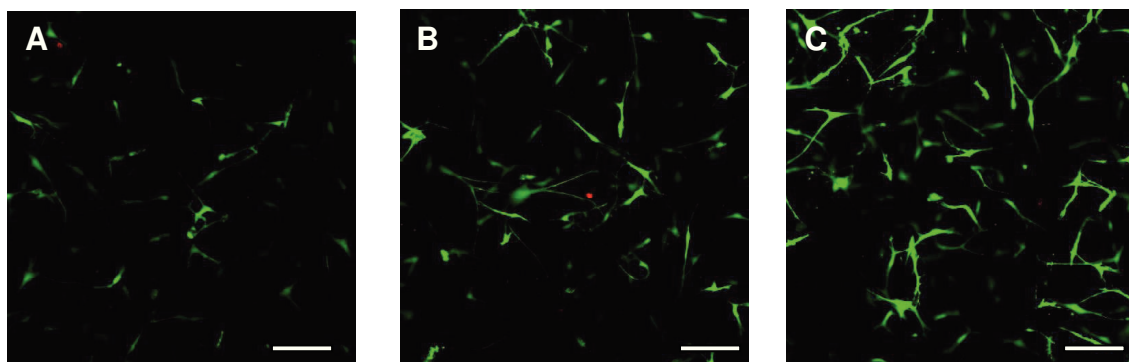


FIGURA 29: CULTIVO CELULAR 3D MACRO A DENSIDAD DE 3 MILLONES CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 2,4 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

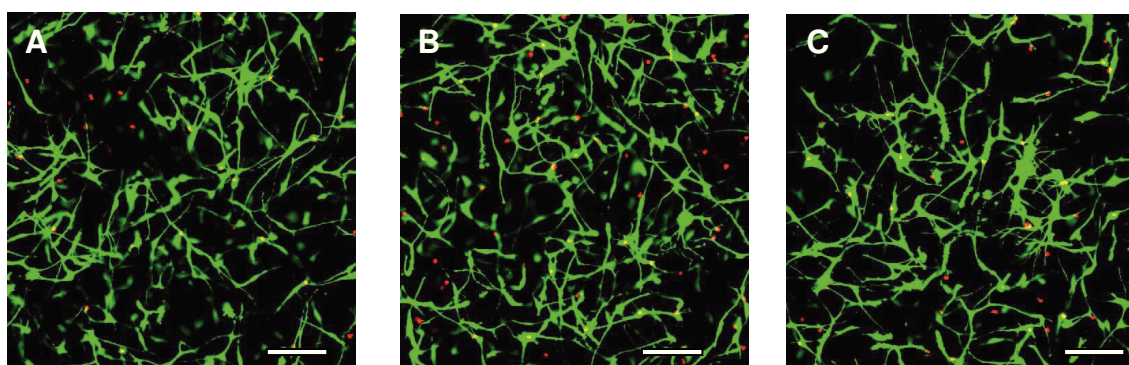


FIGURA 30: CULTIVO CELULAR 3D MACRO A DENSIDAD DE 10 MILLONES CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 2,4 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

Observando los resultados macroscópicos, tenemos una viabilidad muy buena para las diferentes densidades celulares y para las concentraciones del hidrogel de colágeno testadas. Tal y cómo se esperaba, los hidrogeles de menor concentración (1,2 mg/ml) mostraron una mayor contracción con respecto a los de mayor concentración (2,4 mg/ml). Esto es particularmente evidente en las imágenes a 10 millones células/ml, en las que la densidad parece ser mayor en los hidrogeles de 1,2 mg/ml. Estos hidrogeles experimentaron una mayor contracción y por tanto las células quedan más concentradas de lo esperado.

Ahora podemos realizar los experimentos dentro de los chips microfluídicos y compararlos con estos resultados obtenidos en controles macroscópicos.

8.2 MÉTODO Y RESULTADOS DE CULTIVO CELULAR 3D EN CHIPS MICROFLUÍDICOS EN ESTÁTICO

Los controles macroscópicos mostraron que en todas las condiciones ensayadas la viabilidad era bastante elevada. Por otro lado, la contracción del hidrogel ocurrió tal y como se esperaba. A continuación se procedió a testar estas mismas condiciones dentro de los chips microfluídicos.

El método a seguir para cultivo celular 3D en estático, es el siguiente:

1. Se coge un chip microfluídico y se introduce en una placa Petri de pequeño tamaño en la campana extractora de flujo laminar.
2. Dentro de campana, se lava el chip, tanto externamente como internamente con isopropanol para esterilizarlo. De este modo garantizamos que hemos eliminado la presencia de posibles bacterias u hongos que podrían contaminar el cultivo. Posteriormente se hacen dos lavados con agua destilada para quitar los restos de isopropanol, que serían perjudiciales para las células. Finalmente se seca el chip aplicando vacío hasta dejarlo completamente seco por el exterior y por el interior.
3. Se procede al levantamiento de las células de la placa Petri. Se trata de “tripsinizar” (despegar las células de la placa Petri), centrifugar y contar estas células según protocolo en el anexo **C**.

4. Posteriormente, se pasa a la preparación del hidrogel de colágeno según protocolo expuesto en el anexo **A**, y se añade el volumen necesario de células para que queden a la concentración de interés. Se mezclan bien las células con el hidrogel con una micropipeta y se deja en hielo para evitar una polimerización prematura.
5. Se cogen 10 μ l de hidrogel de colágeno con las células y se confina en la microcámara central mediante la técnica de confinado detallada en el capítulo 7. Finalmente, la placa Petri cerrada con el chip se mete al biorreactor durante 15 minutos para permitir la polimerización del hidrogel. 37 °C de temperatura, 5% de CO₂ y 100% de humedad.
6. Finalizada la polimerización se añade suficiente medio de cultivo a la placa Petri y con la pipeta se purga el aire de los microcanales laterales, quedando ahora con medio de cultivo.
7. Se deja la placa en el incubador hasta el día siguiente.
8. Para evaluar la viabilidad dentro del chip, se retira el medio de cultivo y se lava con PBS, finalmente se añade la tinción de viabilidad a la placa y se lleva al microscopio.

En las **figuras 31, 32, 33, 34, 35 y 36** se muestran ensayos de cultivo celular 3D dentro de los chips microfluídicos. En estas condiciones la renovación de nutrientes y oxígeno depende exclusivamente de la difusión.

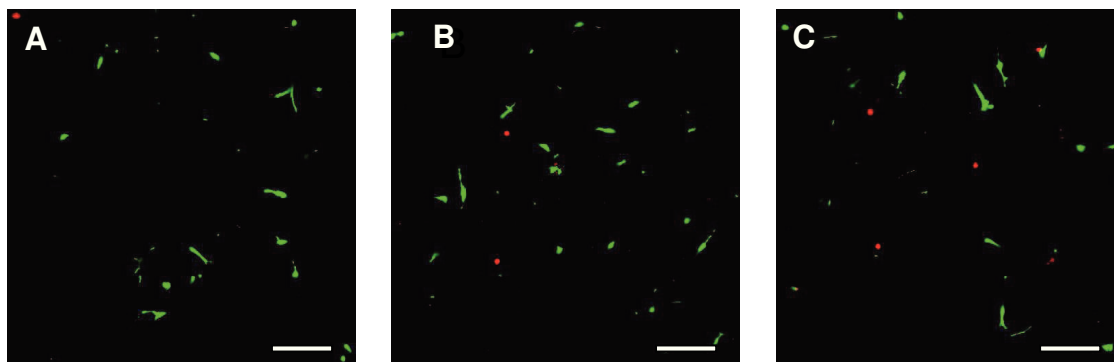


FIGURA 31: CULTIVO CELULAR 3D EN ESTÁTICO A DENSIDAD DE 1 MILLÓN CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 1,2mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μm .

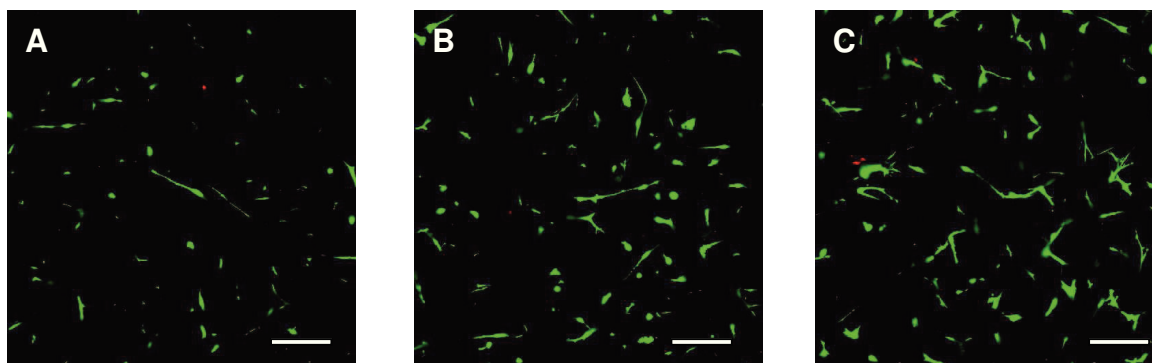


FIGURA 32: CULTIVO CELULAR 3D EN ESTÁTICO A DENSIDAD DE 3 MILLONES CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 1,2 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μm .

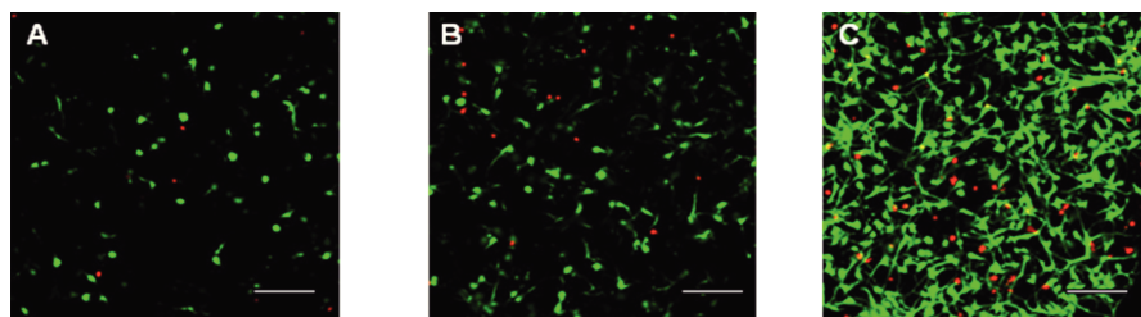


FIGURA 33: CULTIVO CELULAR 3D EN ESTÁTICO A DENSIDAD DE 10 MILLONES CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 1,2 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μm .

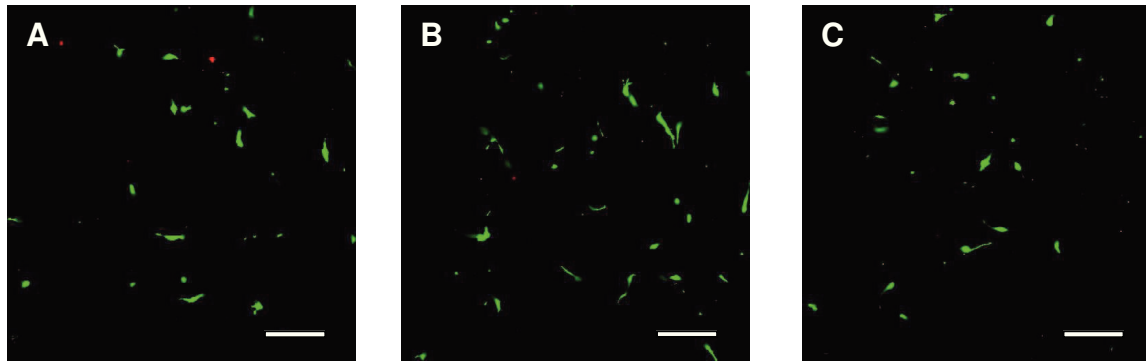


FIGURA 34: CULTIVO CELULAR 3D EN ESTÁTICO A DENSIDAD DE 1 MILLÓN CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 2,4 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

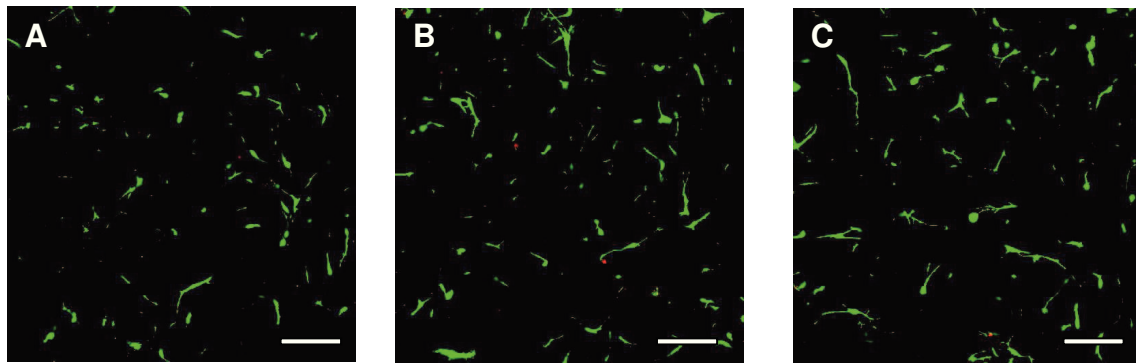


FIGURA 35: CULTIVO CELULAR 3D EN ESTÁTICO A DENSIDAD DE 3 MILLONES CÉLULAS/ml Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 2,4 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

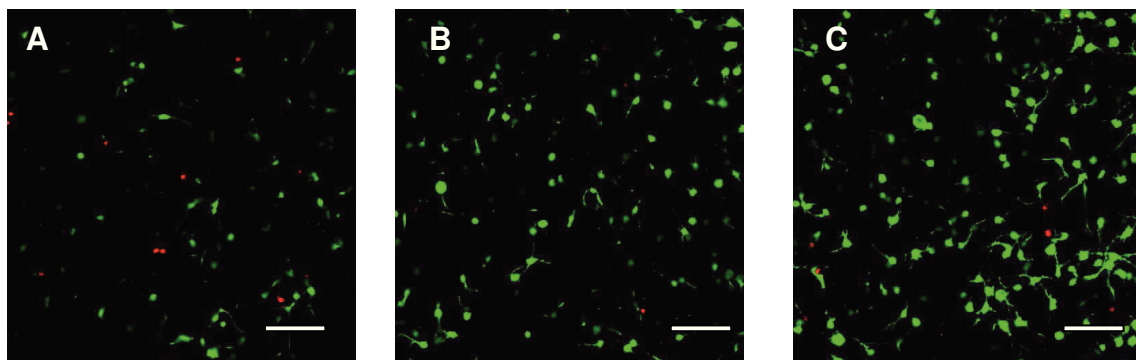


FIGURA 36: CULTIVO CELULAR 3D EN ESTÁTICO A DENSIDAD DE 10 MILLONES/CEL Y UNA CONCENTRACIÓN DE GEL DE 2,4 mg/ml. (A) Primer plano del chip, (B) Plano medio del chip y (C) Fondo del chip. La escala base de estas fotos es 100 μ m.

Estos ensayos celulares 3D en chips microfluídicos muestran muy buena viabilidad celular en todas las condiciones ensayadas. Se podría destacar que las condiciones óptimas, es decir, donde apenas se ve mortalidad, parece ser a 3 millones células/ml, siendo indiferente la concentración del hidrogel de colágeno. Cabe destacar que en los ensayos dentro de los chips microfluídicos no se aprecia contracción alguna, como se ve en la figura 29c. Suponemos que en estos ensayos el hidrogel queda adherido a las paredes del chip microfluídico y las células no provocan su contracción. Este hecho, combinado con la elevada viabilidad de todas las condiciones es de gran interés, ya que permite trabajar a cualquier concentración ensayada y mantener constante al mismo tiempo el volumen de hidrogel dentro de la microcámara central.

En conclusión, los chips microfluídicos basados en SU-8 son completamente biocompatibles y permiten un amplio abanico de condiciones de cultivo celular. Por ello, se sigue investigando nuevas posibles condiciones de cultivo celular, como es el caso de los ensayos en flujo explicados a continuación.

8.3 BIOESTADÍSTICA DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROCHIPS EN ESTÁTICO

Conforme a los resultados que se han obtenido en los diferentes ensayos celulares en estático, es decir, sin renovación del medio de nutrientes, a diferentes densidades celulares y variando la concentración del gel de colágeno confinado según protocolo explicado anteriormente en la cámara central, se realiza una bioestadística de manera que se puede afirmar con seguridad, cuales son las condiciones óptimas en este tipo de ensayos de cultivo celulares 3D y por consiguiente, válida para estudios futuros.

Para ello, se tiñe según se explica en el protocolo **E**, los ensayos con PI (yoduro de propidio) para localizar las células muertas y FS (Fluoresceína) para resaltar las células vivas.

La forma en que se procedió al recuento celular fue mediante un conteo de las células en tres planos como se muestran las fotos anteriormente, es decir, un primer plano (parte de arriba de la cámara), un plano intermedio (a mitad de la altura de gel) y un plano del fondo (base de la cámara). De esta manera se puede hacer un promedio del gel en 3D con los diferentes planos. Esta práctica se realiza para 3 ensayos diferentes repitiendo la misma operación con todas las condiciones estudiadas anteriormente.

Finalmente, con el promedio total de los tres ensayos, se puede obtener un % de viabilidad celular con su desviación típica plasmada en un diagrama de barras para todas las condiciones dadas. En la **figura 37**, se muestra el diagrama de viabilidad celular en tanto por uno.

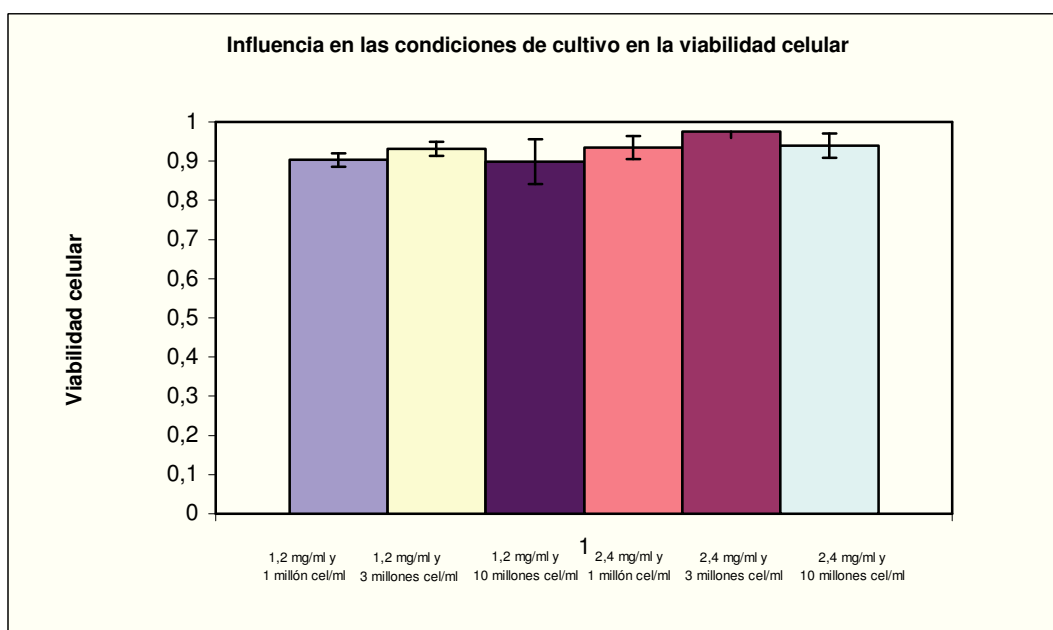


FIGURA 37: DIAGRAMA DE % VIABILIDAD CELULAR EN CHIPS EN ESTÁTICO.

Como se puede ver en el diagrama, la viabilidad óptima es a densidad celular 3 millones y una concentración de colágeno de 2,4 mg/ml llegando a alcanzar un 97.6 % de células vivas. Por otro lado, una viabilidad menos abrupta pero igualmente válida es en la condición de 10 millones de células con una concentración de 1,2 mg/ml alcanza un 89.8 % de células vivas.

En conclusión, los resultados obtenidos en estos ensayos en estático son perfectamente destacables ya que el % de viabilidad celular en la mayoría de los casos es superior al 90 % por lo tanto se puede afirmar que son válidas estas condiciones para estudios que se describen a posteriori como los gradientes celulares.

8.4 ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR 3D EN CHIP MICROFLUÍDICO CON PASO DE FLUJO CONTÍNUO

Una vez demostrada la alta viabilidad celular dentro de los chips microfluídicos para todas las condiciones ensayadas, se procedió a generar cultivos 3D en flujo continuo.

Cómo ya se ha mencionado previamente, la hipoxia es uno de los mayores inductores de respuesta biológica que se conocen. El SU-8 es un material que no permite el paso del oxígeno a través de él, al contrario que el PDMS. Por esta razón los chips microfluídicos de SU-8 son dispositivos ideales para generar condiciones de hipoxia.

Para lograr estas condiciones el planteamiento es el siguiente: una vez que se tiene confinado un hidrogel de colágeno en la cámara central, un microcanal lateral será sellado mientras que por el otro se perfunde continuamente medio de cultivo nuevo. Las células comenzarán a consumir el oxígeno y los nutrientes dentro de la microcámara y se establecería así un gradiente de hipoxia y nutrientes.

Al mismo tiempo se intenta que el sistema sea fácilmente portable, ya que el ensayo se realiza en diferentes zonas del laboratorio, como la campana de flujo laminar, el biorreactor o el microscopio.

El protocolo desarrollado para cultivo celular en flujo es el siguiente:

1. Se procede al levantamiento celular según protocolo **C** explicado en anexos.
2. Seguidamente se prepara el hidrogel de colágeno a la concentración de interés según protocolo **A**.
3. Se confina el hidrogel en la microcámara central empleando el protocolo explicado en el **capítulo 6**. Una vez cubierto con medio el chip microfluídico, se deja hasta el día siguiente en el incubador para permitir que las células se adhieran correctamente al hidrogel.
4. Al día siguiente se esteriliza con isopropanol o autoclave (tratamiento de 121°C y 1 atmósfera durante 20 minutos) todo el material del sistema que vaya a entrar en contacto directo con el medio de cultivo: encapsulado, reservorio, tubos y juntas. El sensor de flujo se esteriliza a parte mediante isopropanol.
5. Una vez esterilizado todo el sistema, se pasa a montarlo en la campana de flujo laminar.

6. Se llena el reservorio con un volumen de medio adecuado a la duración del experimento y el flujo que se empleará. Comúnmente se llena con 25 ml de medio de cultivo.
7. Empleando una jeringa llena de medio se purga el aire de los tubos y quedan llenos de medio.
8. Se coloca el chip microfluídico dentro del encapsulado y se cierra con cuidado. Si al cerrar queda algo de aire dentro del sistema, este será expulsado al activarse el flujo.
9. Todo el sistema se lleva al biorreactor y se conecta el sensor de flujo al ordenador.
10. Finalmente, mediante el manorreductor se aplica una presión determinada al reservorio para generar el flujo deseado. Normalmente se aplica entre 0,1-0,2 bares para generar un flujo entre 2-2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

8.5 RESULTADO DEL CULTIVO CELULAR 3D EN FLUJO

Dado que los ensayos en estático mostraron que la viabilidad era elevada en todas las densidades celulares testadas, para los ensayos en flujo se empleó una densidad de 4 millones de células/ml, ya que es una densidad bastante elevada y aún permite distinguir fácilmente células individuales.

El comportamiento celular dentro de la microcámara central se fue observando durante varios días. Tras 7 días en flujo se tomaba el sistema completo y se perfundía con la tinción de viabilidad descrita en el protocolo **D**.

En la **figura 38A**, puede verse como antes de activarse el flujo las células se encuentran distribuidas homogéneamente en los diferentes planos de la microcámara central. Tras 7 días, se muestra en la **figura 38B** como esta distribución cambia abruptamente y la mayoría de las células aparecen concentradas en las proximidades del microcanal que está siendo perfundido, presumiblemente debido a la creación de un gradiente de hipoxia y nutrientes a lo ancho de la microcámara central.

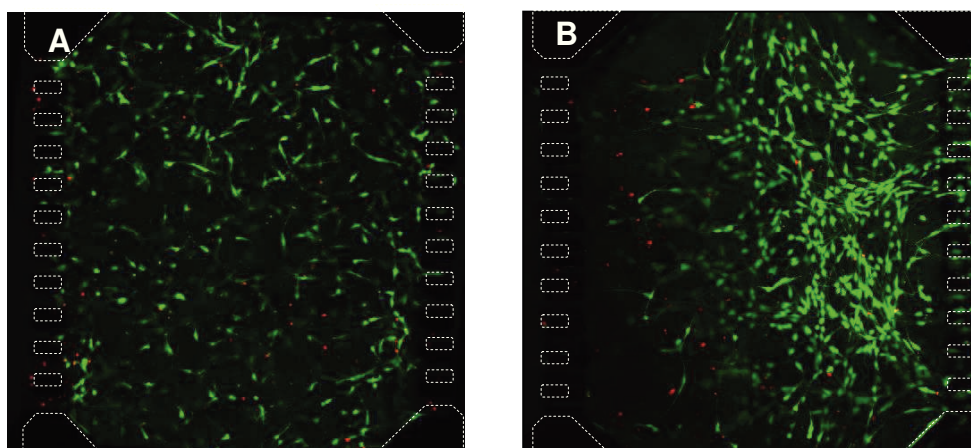


FIGURA 38: CULTIVO CELULAR 3D EN CHIP MICROFLUÍDICO CON FLUJO. (A) Distribución celular antes de activar el flujo y (B) Distribución celular tras 7 días aplicando un flujo de 2-2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ por el microcanal derecho.

Con este ensayo hemos demostrado la capacidad del sistema de desencadenar un intenso proceso migratorio, debido probablemente a un gradiente de hipoxia y nutrientes. Esto reproduce con gran acierto lo que puede ocurrir “in vivo”, ya que en los tejidos las células se encuentran embebidas en una matriz proteica y reciben los nutrientes desde los vasos sanguíneos cercanos. Cuando un vaso se obstruye por un coágulo se generan las mismas condiciones que dentro de nuestro sistema. Por otro lado, cuando un tumor comienza a crecer va agotando los nutrientes y estas células tumorales comienzan a migrar siguiendo un patrón similar al mostrado en nuestro sistema.

En conclusión, hemos demostrado no solo la biocompatibilidad de nuestro sistema sino que también lo hemos empleado para reproducir un proceso biológico de gran interés como es la respuesta desencadenada por hipoxia y falta de nutrientes.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

Durante este proyecto de investigación se planteó crear un sistema microfluídico para estudiar el comportamiento celular en ambientes tridimensionales sometidos a un gradiente de nutrientes y oxígeno. Para ello se requería alcanzar una serie de objetivos.

En primer lugar, debía lograrse un fino control sobre la localización de un hidrogel dentro del chip microfluídico. Para tal fin, se ha desarrollado exitosamente un protocolo de confinamiento en el que el hidrogel, con las células embebidas, queda localizado exclusivamente en la microcámara central, mientras que los canales laterales permanecen libres para el flujo de medio.

En segundo lugar, se ha demostrado la biocompatibilidad del dispositivo. Ensayos con diferentes condiciones de densidad celular y concentración del hidrogel mostraron una viabilidad celular muy alta y, aparentemente, similar a los controles macroscópicos.

Finalmente, se ha logrado mantener un cultivo con flujo continuo durante una semana. Durante estos ensayos se ha establecido un gradiente de nutrientes y

oxígeno y se ha demostrado cómo las células migran en respuesta a este gradiente.

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos preliminares para la formación de gradientes químicos dentro del sistema microfluídico. Aunque se ha demostrado la capacidad del sistema para generar dichos gradientes a corto plazo, aún debe trabajarse para mantener su estabilidad de manera indefinida.

TRABAJO FUTURO

Este proyecto de investigación no acaba en estos ensayos sino que tiene un trabajo futuro muy amplio. Una vez que se ha demostrado la viabilidad del sistema, estudios posteriores muy interesantes serían ensayos con células tumorales sometidas a las mismas condiciones de gradiente de nutrientes. Parece que la privación de nutrientes aumenta la capacidad de metástasis e invasión de los tumores, y el sistema que hemos desarrollado serviría como modelo para estudiar dicho comportamiento y testar nuevos fármacos que detengan esta invasión acelerada por la hipoxia y la falta de nutrientes.

También otra de las ideas más destacadas es seguir haciendo ensayos de gradientes bioquímicos. Estas biomoléculas podrían ser factores de crecimiento, fármacos, medios de nutrientes con diferentes composiciones a la utilizada en estos ensayos y otras muchas según el interés concreto del estudio.

Para ensayos futuros en la formación de gradientes, se han propuesto el uso de bombas peristálticas trabajando de forma alterna.

Al utilizar dos bombas peristálticas, una en cada canal, mientras se impulsa líquido por un canal, el otro queda pinzado tanto en la entrada como en la salida, aportando una presión suficientemente alta para que el flujo vaya por el canal adecuado.

