



Trabajo Fin de Máster

Título del trabajo:

Estudio en microfluídica de procesos involucrados
en la regeneración cardiaca: migración de
fibroblastos y angiogénesis

Title and subtitle:

Microfluidic-based study of processes involved in
cardiac regeneration: fibroblasts migration and
angiogenesis

Autor/es

Sandra Pérez Rodríguez

Director/es

José Manuel García Aznar

Facultad de Ciencias
2017

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	5
1. Regeneración cardiaca	5
2. Fibroblastos cardiacos	6
3. Angiogénesis	7
4. Dispositivos microfluídicos	9
OBJETIVOS	11
MATERIALES	12
1. Cultivos celulares	12
2. Dispositivos microfluídicos	12
3. Hidrogeles	14
MÉTODOS	15
1. Fabricación de dispositivos microfluídicos	15
2. Cultivo tridimensional	17
3. Ensayo de proliferación	22
4. Ensayo de viabilidad	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
1. Estudio del efecto de factores de crecimiento en fibroblastos	24
2. Estudio de la angiogénesis	29
CONCLUSIONES	46
CONCLUSIONS	47
BIBLIOGRAFÍA	48
1. Artículos	48
2. Páginas web	52
ANEXO 1	53
ANEXO 2	54

RESUMEN

La regeneración cardiaca es crucial para la recuperación de la actividad del corazón tras una patología. En este proyecto se van a estudiar mediante microfluídica, dos procesos involucrados que destacan por su gran importancia: la migración de fibroblastos cardiacos a la zona dañada y la formación de nuevos vasos nacientes para revascularizar el tejido. Se han demostrado numerosas diferencias entre los fibroblastos dermales y cardiacos, como la fuerza contráctil o la respuesta a factores de crecimiento. Los fibroblastos tienden a migrar en respuesta a factores de crecimiento, sin embargo, los fibroblastos cardiacos no se ven atraídos por el PDGF, como sí lo hacen los dermales, sino que sólo aumentan su velocidad media y efectiva frente a TGF- β . Además, ambos factores parecen mostrar una tendencia a disminuir la proliferación de estos tipos celulares. Por otro lado, se ha tratado de optimizar distintos protocolos para el estudio la angiogénesis, modificando distintos parámetros.

ABSTRACT

Cardiac regeneration is crucial to recuperate heart activity after disease. This project will study by microfluidics, two involved processes that stand out because of their huge importance: fibroblast migration to damaged zones and formation of new vessels to tissue revascularization. It has been demonstrated numerous differences among dermal and cardiac fibroblasts, such as its contractile strength or its response to growth factors. Fibroblasts tend to migrate in response to growth factors, however, cardiac fibroblasts are not attracted to PDGF whereas dermal ones do. Notwithstanding, cardiac fibroblasts increase their mean and effective velocity in the presence of TGF β . In addition, both factors show to have a tendency to diminish proliferation of these cells. On the other hand, different protocols have been tried to be optimized for angiogenic studies, by modification of distinct parameters.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al grupo de investigación M2BE por su apoyo a la hora de realizar este proyecto y por ofrecerme su ayuda siempre que la he necesitado. Gracias a Manu por ofrecerme esta oportunidad y ser un gran director de proyecto, a Nieves por enseñarnos y mantener los cultivos celulares sin los cuales no podría haber llevado a cabo mis ensayos, a Cris, Javier y Yago por sus consejos, a Carlos por el desarrollo de sus programas, a Vanesa y Esther por arreglar MatLab cada vez que se bloquea.

Finalmente, agradecer la financiación del European Research Council (ERC) mediante el proyecto ERC-2012-StG 306751, que ha permitido que sea becada para la realización de prácticas extracurriculares en actividades de investigación.

INTRODUCCIÓN

1. Regeneración cardiaca

El corazón es uno de los órganos más importantes del cuerpo humano, cuya función principal es bombear la sangre, proporcionando oxígeno a las células y eliminando el CO₂ y otros residuos del organismo (LiveScience, 2016). Por tanto, un fallo cardíaco puede suponer graves problemas. Según la Organización Global de Salud, el fallo isquémico en el corazón es la causa principal de muerte a nivel mundial, causando más de 8 millones y medio de víctimas en 2015. Además, a esta cifra hay que sumar los casos de fallos no isquémicos, como arritmias, fibrosis, heridas o miocardiopatías. Esta alta tasa de mortalidad supone un incentivo en la investigación para estudiar más en profundidad y entender el mecanismo de regeneración cardiaca, permitiendo el desarrollo de novedosas terapias.

El corazón se caracteriza por ser uno de los tejidos con menos capacidad regenerativa, lo que dificulta su estudio y hace que se requieran técnicas más sensibles para detectar los pequeños cambios que se producen. En el proceso regenerativo está involucrado un aumento de masa muscular, procedente de una mayor proliferación de cardiomiositos y la transdiferenciación de fibroblastos y células madre hematopoyéticas de la médula ósea a cardiomiositos (Laflamme and Murry, 2014); un aumento de tejido conectivo, por lo que los fibroblastos deben migrar hasta la zona dañada (Leask, 2007); y un aumento de angiogénesis, vascularizando de nuevo las zonas dañadas (Mandic et al, 2016). Sin embargo, habitualmente, estos mecanismos innatos no son capaces de compensar el daño producido, sustituyendo parte de la masa muscular perdida por tejido conectivo no funcional, enfermedad conocida como hipertrofia compensadora (Rebouças et al, 2016). Este hecho lleva a pensar que, para obtener una recuperación absoluta, es necesario una estimulación externa. Los tratamientos más utilizados actualmente consisten en la implantación de células madre (Herreros et al, 2011) y estimulación de distintas estirpes celulares con factores de crecimiento para, por ejemplo, potenciar la

migración celular o la angiogénesis (Rebouças et al, 2016). Como última instancia, se recurre al trasplante de corazón.

2. Fibroblastos cardiacos

Los fibroblastos cardiacos representan el tipo celular más abundante en el corazón, formando una red estrechamente conectada que se distribuye en la matriz extracelular rodeando los cardiomiositos (Cardio Research, 2016). Las funciones de este tipo celular son la contribución a la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular, generar una plataforma de soporte para distribuir correctamente las fuerzas mecánicas del tejido y permitir la conexión entre todos los componentes cardiacos, ser fuente de distintas moléculas con acción paracrina, y actuar como aislante eléctrico, para evitar que el impulso eléctrico se desvíe (Zeisberg and Kalluri, 2010).

Aunque pueden tener distintos orígenes, se considera que principalmente provienen de las células mesoquimales del epicardio embrionario. Sin embargo, en condiciones patológicas, la reparación del tejido requiere que se produzca nuevo tejido conectivo, por lo que fibroblastos de diferentes orígenes y fibroblastos cardiacos situados en zonas sanas, son capaces de responder a señales moleculares y migrar hacia la zona dañada (Cardio Research, 2016). Allí, parte de ellos se transforman en fibroblastos cardiacos y parte en miofibroblastos, la forma especializada de fibroblasto capaz de sintetizar el tejido conectivo perdido (Zeisberg and Kalluri, 2010; Leask, 2007). Una vez que el daño es reparado, los miofibroblastos mueren por apoptosis. En caso de permanecer remanentes en la zona, se genera fibrosis (Leask, 2007).

Algunas de estas moléculas señalizadoras que participan en la curación de heridas, tanto en corazón, como en otros tejidos, como piel o pulmón, son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*, PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor Beta*, TGF β) (Barrientos et al, 2008).

La familia PDGF es un grupo multifuncional de proteínas implicadas en multitud de funciones fisiológicas, entre las que destaca su implicación necesaria para la división de fibroblastos, especialmente miofibroblastos, y su contribución en el mantenimiento de

tejido conectivo, lo que convierte en un factor cuya presencia es esencial para la curación de heridas. Además, se ha demostrado que la expresión de este factor se incrementa en el tejido cardiaco tras sufrir un infarto, regulando la inflamación, angiogénesis y fibrosis para reparar el daño ocasionado (Zhao et al, 2011).

EL factor TGF β pertenece a una familia con tres isoformas importantes, todas ellas presentes en la curación de heridas, que se secretan como precursores inactivos que deben ser activados mediante corte proteolítico y dimerización, permitiendo que se una a sus receptores. Esta unión activa rutas destinadas al bloqueo del ciclo celular o a la activación de un programa alternativo de diferenciación (Penn et al, 2012).

La presencia de ambos factores ha sido estudiada en heridas epidérmicas, determinando que ambos poseen efectos positivos en la curación de éstas. Por un lado, el PDGF es un quimioatractante de fibroblastos epiteliales, por lo que favorece su migración a la zona dañada, además de estimular su proliferación. Por otro lado, el TGF β tiene una función de formación y remodelación de la matriz extracelular, ya que es capaz de modificar el metabolismo de los fibroblastos (Allen et al, 2015; Barrientos et al, 2008). Este efecto se ha estudiado también en fibroblastos cardiacos, determinando que el TGF β aumenta la expresión de genes profibroticos y de proteínas presentes en la matriz extracelular, así como la secreción de colágeno I (Lindner et al, 2014). Otros estudios han demostrado la capacidad de transdiferenciación que posee el TGF β , pudiendo transformar fibroblastos de pulmón en miofibroblastos (Midgley et al, 2013). En este proyecto queremos estudiar si estos factores tienen efectos sobre la migración y proliferación de los fibroblastos cardiacos.

3. Angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos. Consiste en la migración, crecimiento y diferenciación de células endoteliales, que recubren las paredes internas de los vasos sanguíneos. Este proceso está controlado por señales químicas en el cuerpo, que pueden ser de tipo estimulador o inhibidor. Normalmente, los efectos estimulantes

e inhibidores están equilibrados, de modo que los vasos sanguíneos se forman solo cuándo y dónde se necesitan (Hoeben et al, 2004).

La angiogénesis desempeña un papel fundamental en la regeneración cardiaca, vascularizando de nuevo las zonas dañadas. Se han propuesto un modelo de dos fases para la formación de vasos. En la fase inicial se produce una vasodilatación de vasos pre-existentes mediada por moléculas señalizadoras, como el factor de crecimiento endotelial (*Vascular Endotelial Growth Factor*, VEGF), que se une a receptores de la superficie de células endoteliales normales, generando una cascada de señales que promueven el crecimiento y la supervivencia de los vasos sanguíneos. Posteriormente, se produce la degradación de la membrana basal y su rotura mediante enzimas proteolíticas, denominadas metaloproteasas de matriz. De esta forma, se permite la migración celular. En la segunda fase se promueve la proliferación y migración de las células endoteliales para formar nuevos brotes que penetran en las zonas dañadas proporcionando nutrientes y oxígeno de nuevo (Hoeben et al, 2004).

Se ha estudiado el efecto de diversas moléculas en la estimulación angiogénica, determinándose que la más potente es la proteína VEGF (Del Amo et al, 2015), en concreto su isoforma VEGF-A. Su producción puede inducirse, entre otros, mediante el factor de transcripción HIF (*Hipoxia-Inducible Factor*) que se une a las secuencias potenciadoras del gen VEGF-A. Este factor de transcripción es liberado por células en déficit en oxígeno, condiciones que se dan cuando ocurre un fallo isquémico. En condiciones normales con oxígeno la subunidad α se hidroxila impidiendo la unión de la subunidad β y posteriormente se degrada con ubiquitina, pero en ausencia de oxígeno la subunidad β se une a la α , activando distintos genes como el de VEGF (Hoeben et al, 2004).

En este proyecto se quiere estudiar la comunicación celular entre los fibroblastos cardiacos y las células endoteliales, y su relación con el proceso angiogénico. Estudios previos han determinado que el cultivo de células endoteliales con medio condicionado de fibroblastos cardiacos genera cambios metabólicos, como el aumento de síntesis de DNA, o un efecto protector frente a hipoxia (Zhao et al, 2001). También se ha observado

un efecto en la angiogénesis al cocultivar células endoteliales humanas con fibroblastos de distintos tejidos, como procedentes de pulmón o piel, generándose un aumento en la longitud y estabilidad de los vasos nacientes (Hien Lim et al, 2013; Nakatsu et al, 2003). En este estudio, se espera determinar si los fibroblastos cardiacos son capaces de estimular la angiogénesis del mismo modo que lo hacen otras estirpes celulares.

4. Dispositivos microfluídicos

In vivo, gran parte de los procesos ocurren en tres dimensiones, por lo que lo más adecuado sería trabajar con una plataforma tridimensional que simule adecuadamente el ambiente fisiológico. Esto se consigue gracias a la microfluídica. La microfluídica consiste en la tecnología ingenieril diseñada para manipular fluidos a escalas micrométricas (Sackmann et al, 2014), permitiendo la miniaturización, integración y automatización de distintos procesos (Halldorsson et al, 2015). Como se ha dicho previamente, un campo de aplicación de gran impacto de estos dispositivos microfluídicos es el ámbito de la ingeniería biomédica, en concreto, el desarrollo de cultivos celulares 3D, ya que estos dispositivos permiten recrear el ambiente fisiológico celular *in vitro* (Mark et al, 2010; Halldorsson et al, 2015).

Se han desarrollado dispositivos de microfluídica (Shin et al, 2012; Moreno-Arotzena et al, 2014), cuyas dimensiones están entorno a las micras, lo que conlleva un ahorro en reactivos, células y espacio. La posibilidad de cultivar los microorganismos embebidos en geles de colágeno, representa de una manera más exacta la matriz extracelular en tres dimensiones (Huang et al, 2010). El material más utilizado hasta la fecha es el polidimetilsiloxano (PDMS) debido a su transparencia, flexibilidad, permeabilidad de gases, inactividad química y biocompatibilidad (Rusconi et al. 2014). Esta aproximación se puede implementar mediante la adición de un flujo que simule el fluido intersticial, por el cual se transportan nutrientes y proteínas. La mayoría de los estudios en modelos tridimensionales se han centrado en analizar el comportamiento de las células en función de su entorno, variando tanto condiciones físicas (densidad, fuerza de presión, de flujo, etc), como químicas (pH, factores de atracción o repulsión) (Velve-Casquillas et al, 2010). El grupo de investigación M2BE, en el que se va a realizar este proyecto, tiene

una amplia experiencia en el uso de estos dispositivos microfluídicos en múltiples aplicaciones de mecánica celular: quimiotaxis en fibroblastos (Moreno-Arotzena et al, 2015; Del Amo et al, 2017), haptotaxis en fibroblastos (Moreno-Arotzena et al, 2015), angiogénesis (Del Amo et al, 2015) y cáncer (Anquiano et al, 2017).

OBJETIVOS

En este proyecto se quiere ahondar en dos procesos esenciales para la regeneración cardiaca: la migración y proliferación de fibroblastos cardiacos y la estimulación de la angiogénesis ante condiciones patológicas. Por tanto, los objetivos principales son los siguientes:

- Determinar si los factores PDGF y TGF β afectan a la migración, proliferación o morfología de los fibroblastos cardiacos y dermales
- Entender si en hipoxia, condiciones habituales en infartos, se modifica la migración de los fibroblastos cardiacos.
- Entender si las condiciones patológicas de hipoxia pueden afectar la angiogénesis.

Así mismo, para alcanzar estos objetivos, se han planteado otros objetivos necesarios:

- Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos adecuados para cada estudio.
- Determinación y optimización de la forma más adecuada de análisis de angiogénesis.

MATERIALES

1. Cultivos celulares

Todos los cultivos celulares utilizados son líneas primarias humanas comerciales, por lo que se trabaja en pasajes pequeños.

1.1. Normal Human Dermo Fibroblast (NHDF)

Los fibroblastos dermales provienen de la dermis de la piel de adultos. Se cultivan en medio FBM suplementado con insulina, rhFGF-B, GA-1000 y 2% de FBS (medio FGM-2, *Lonza*).

1.2 Normal Human Cardiac Fibroblast (NHCF)

Los fibroblastos cardiacos se han aislado de ventrículos de corazones sanos de adultos. Se cultivan en medio FBM suplementado con insulina, rhFGF, GA-1000 y 10% de FBS (medio FGM-3, *Lonza*).

1.3. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Las HUVECs provienen de las venas del cordón umbilical. Se cultivan en medio EGM suplementado con 2% de FBS, hidrocortisona, hGFG, VEGF, R3-IGF-1, ácido ascórbico, hEGF, GA-1000 y heparina (medio EGM-2, *Lonza*).

2. Dispositivos microfluídicos

Para llevar a cabo las distintas aproximaciones, se han utilizado distintos diseños de dispositivos realizados mediante el programa AutoCAD.

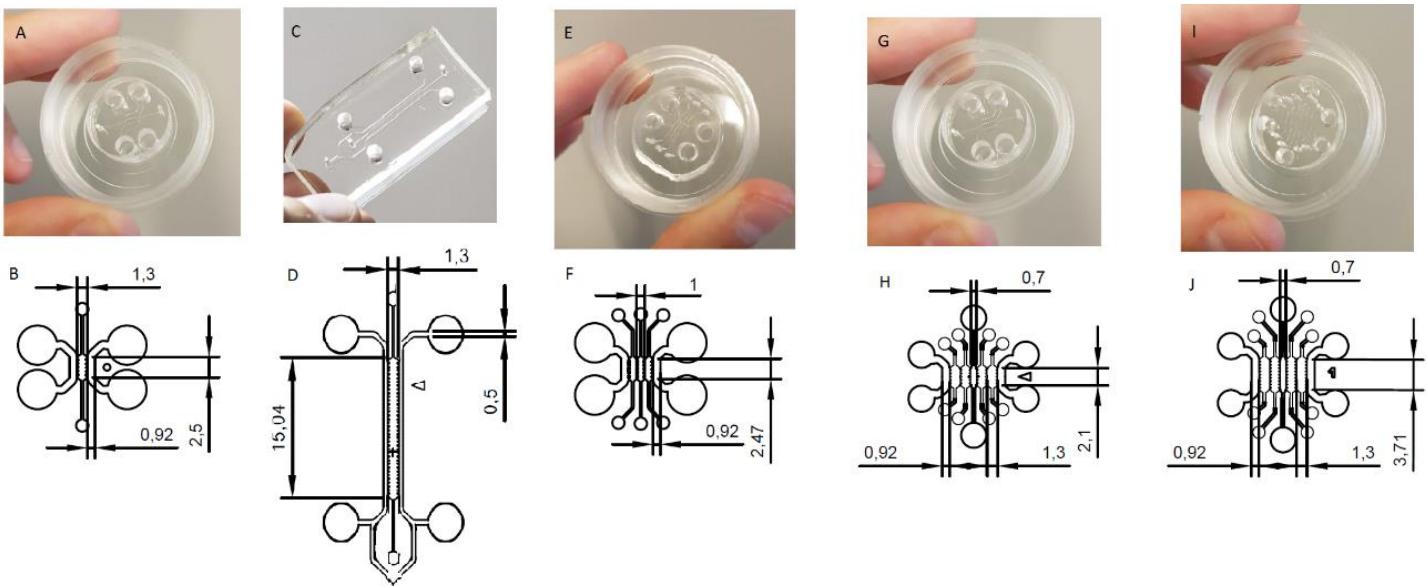


Fig. 1: Geometrías de los dispositivos utilizados. A y B) Dispositivo de 1 canal y 5 postes; C y D) Dispositivos de 1 canal y 30 postes; E y F) Dispositivo de 3 canales y 5 postes; G y H) Dispositivo de 5 canales y 5 postes; I y J) Dispositivo de 5 canales y 10 postes.

2.1. Dispositivos de 1 canal y 5 postes

Se trata de un dispositivo con un canal central de 2.5 cm de longitud y 1.3 cm de anchura, con 5 postes, en el que se introduce colágeno, y dos canales adyacentes de 0.92 cm de anchura el cual se llena con medio, actuando como reservorios (fig. 1a y 1b).

2.2. Dispositivos de 1 canal y 30 postes

Consiste en un dispositivo con un canal central de 15 cm de longitud y 1.3 cm de ancho, que consta de 30 postes. Los reservorios tienen una anchura de 0.5 cm (fig. 2a y 2b).

2.3. Dispositivo de 3 canales y 5 postes

Se trata de un dispositivo de 3 canales de 1 cm de largo y 2.5 cm de ancho, con 5 postes. Los reservorios contiguos tienen una anchura de 0.92 cm (fig. 3a y 3b).

2.4. Dispositivos de 5 canales y 5 postes

Consiste en un dispositivo con 1 canal central de 0.7 cm de anchura, con 2 canales adyacentes a ambos lados de 1.3 cm de anchura. La longitud de todos ellos es de 2.1 y

contienen 5 postes. Los reservorios situados en los extremos tienen una anchura de 0.92 cm (fig. 4a y 4b).

2.5. Dispositivos de 5 canales y 10 postes

Al igual que en el diseño anterior, es un dispositivo de 1 canal central de 0.7 cm de ancho y 2 contiguos a ambos lados de 0.3 cm. La longitud de ellos es de 3.7 cm, con un total de 10 postes. Los reservorios situados en los extremos tienen un ancho de 0.92 cm (fig. 5a y 5b).

3. Hidrogeles

Se ha trabajado con plataformas tridimensionales de colágeno tipo I, a concentraciones de 2.5 y 4 mg/ml, cuyas propiedades mecánicas han sido previamente analizadas (Moreno-Arotzena, 2015). Estos geles se utilizarán como plataformas de cultivos, en los que se embeberán distintos tipos celulares para realizar cultivos tridimensionales.

MÉTODOS

Para el desarrollo de este proyecto se realizará una metodología multidisciplinar, integrando dispositivos microfluídicos, cultivo celular 3D y métodos de análisis de imagen y de biología molecular. A continuación se realiza una breve descripción de cada uno de ellos.

1. Fabricación de dispositivos microfluídicos

La fabricación de los dispositivos de microfluídica se realiza siguiendo el protocolo de Shin et al (2012) que se explica a continuación.

1.1. Diseño del chip

Se realizó el diseño de los dispositivos de 5 canales mediante el programa AutoCAD. El resto de diseños ya estaban en uso en el laboratorio. Los diseños se envían al Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) donde se encargan de imprimirlos en obleas de acetato de silicio, mediante litografía.

1.2. Pretratamiento de dispositivos

Se aplica un pretratamiento a las obleas para facilitar la separación del molde de PDMS de éstas. Para ello, en primer lugar se limpian las obleas mediante soplado con aire comprimido, y posteriormente, se colocan sobre una placa de Petri. Se añaden 10 μ l de $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{SiCl}_3$ sobre una pequeña placa de Petri que se coloca encima de la oblea y se somete a vacío durante 2 horas. Debido a la toxicidad del compuesto, este proceso se realizará en campana de extracción y el primer molde de PDMS obtenido tras el pretratamiento será desecharido.

1.3. Fabricación del molde de PDMS

El molde de PDMS consiste en una mezcla desgasificada de la base y el agente curante de *Sylgard 184 silicone elastomer* en una proporción 10:1. Tras su incubación a 80 °C

durante toda la noche, el molde se separa de la oblea y se perfora con bisturíes circulares para biopsias dermales de distintos diámetros (4mm, 3mm y 1mm) siguiendo el patrón diseñado. Los moldes pueden contener pequeñas partículas que provoquen contaminaciones o impidan el correcto sellado, por lo que se retiran mediante un celo. Para garantizar un esterilizado completo, los moldes se autoclanan dos veces a 120°C durante 20 minutos, primero en un programa húmedo y posteriormente, en uno seco. Se dejan secar los moldes a 80°C durante toda la noche.

1.4. Limpieza y esterilización de superficies cristalinas

En el caso de la utilización de dispositivos de 5 o 10 postes, éstos se sellan en platos de 35 mm de diámetro de fondo de cristal (μ -Dish 35mm, *ibidi*) ya esterilizados. Sin embargo, los moldes de 30 postes se sellan sobre laminillas cubreobjetos (18 x 18mm, *Menzel-Gläser*) que deben haber sido esterilizadas previamente. Esta limpieza consiste en sumergir los cubreobjetos en metanol durante 2 minutos. Después, se desecha el metanol y se aclara con acetona durante otros dos minutos para eliminar los restos de metanol. A continuación, se añade acetona de nuevo y se desecha pasados 5 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se separan y secan con papel de filtro y se esterilizan a 130°C durante 2 horas.

1.5. Sellado de dispositivos microfluídicos

Los moldes se sellan sobre superficies de cristal. Para ello, en primer lugar, tanto los moldes de PDMS como las superficies cristalinas, se someten a un tratamiento de plasma en vacío durante 2 minutos. Este tratamiento aumenta la exposición de grupos -Si-OH de la superficie del PDMS, permitiendo uniones covalentes con los grupos -Si-OH de la superficie del cristal, quedando unidos ambos elementos (Henniker plasma).

A continuación, se llenan los canales con Poli-D -lisina 1mg/ml (PDL) y se incuba durante 4 horas a 37°C. Este tratamiento incrementa la adhesión de las células con la superficie, debido a las interacciones electrostáticas entre el polímero PDL y las cargas negativas de la membrana celular. Además, el PDL no es degradado por las proteasas celulares y, al ser una proteína sintética, no influye en ninguna ruta de señalización (Harnett et al,

2007). Posteriormente, se retira el PDL y se lava con agua deionizada estéril al menos 3 veces para eliminar los restos de PDL, ya que un exceso de éste puede ser tóxico para las células. Los dispositivos se incuban a 80°C durante 48 horas, para restaurar la hidrofobicidad de las superficies de adhesión.

2. Cultivo tridimensional

Los experimentos fueron realizados en cultivos tridimensionales en matrices de colágeno I, para simular el entorno fisiológico de una forma más realista.

2.1. Fibroblastos embebidos en gel

En primer lugar se determinó la concentración adecuada de fibroblastos y de colágeno a la que se debía trabajar para que el gel aguantara intacto. Combinando las concentraciones celulares a 1, 1.5, 2 y $3 \cdot 10^5$ cel/ml, con geles de 2.5 y 4 mg/ml de colágeno, se consideró que las condiciones óptimas es de $1 \cdot 10^5$ cel/ml a 4 mg/ml.

Tanto los fibroblastos dermales (NHDF) y cardiacos (NHCF-V), a una concentración final de $1 \cdot 10^5$ cel/ml, serán embebidas en una matriz de colágeno tipo I y medio con una proporción óptima de NaOH/H₂O para obtener un pH fisiológico de 7.5. Este gel será introducido en los canales correspondientes (en los dispositivos de 1 canal (fig. 1a y 1b), se introducirá en el canal central, mientras que en los dispositivos de 5 canales (fig. 4a, 4b, 5a y 5b), en los canales de los extremos) y polimerizará a 37°C en una caja húmeda, volteando el dispositivo cada 5 minutos, durante al menos 20 minutos. Tras este periodo de tiempo, se llenarán los canales reservorios con el medio apropiado.

En el caso de los ensayos de migración, los dispositivos se dejan incubando durante la noche, y en el momento previo del análisis de migración, se retira el medio de un canal y se introduce el tratamiento adecuado: medio de cultivo (control), medio de cultivo con 5ng/ml de PDGF-BB y medio de cultivo con 15ng/ml de TGFβ-1. De esta forma, se crea un gradiente químico que nos permite estudiar la quimiotaxis de los fibroblastos hacia estos factores de crecimiento. Los dispositivos se analizan con microscopía de contraste de fases (*Nikon D-Eclipse C1 Confocal Microscope, objetivo 10x*) tomando fotos cada 20

minutos durante 24 horas. Los resultados se analizan con el algoritmo *cell_tracker* diseñado por el propio grupo de investigación para su uso en el programa *MatLab*.

2.2. Monocapa

Para el estudio de la angiogénesis, se quiso realizar una monocapa de HUVEC que simularía una pared del vaso endotelial. En la puesta a punto de llevaron a cabo dos técnicas principalmente.

2.2.1. Siembra en vertical

Se genera una solución de colágeno I a la densidad adecuada y pH 7.5, mediante la mezcla de DPBS 10x, NaOH 0.5N y medio de cultivo EGM-2, trabajando en hielo para evitar su polimerización temprana. Posteriormente, se llena el canal central de los dispositivos y se polimeriza a 37°C en una caja húmeda, volteando el dispositivo cada 5 minutos, durante al menos 30 minutos. A continuación, se introduce una suspensión de HUVECs a la concentración apropiada por un canal reservorio y se incuba a 37°C en una caja húmeda manteniendo el dispositivo en vertical. De esta forma, debido a la fuerza de la gravedad, las células endoteliales tienden a situarse sobre la plataforma de colágeno. Tras 40 minutos de incubación, se rellenan ambos reservorios.

Para determinar las condiciones óptimas, se trabajó con concentraciones celulares de HUVECs de 0.5, 1 y $1.5 \cdot 10^6$ cel/ml, combinadas con densidades de 2.5 y 4 mg/ml. Dada la dificultad en el mantenimiento de la monocapa durante 24 horas, se realizaron distintos pretratamientos en el reservorio antes de la siembra de la monocapa, que pretendían aumentar la adherencia de las HUVECs al colágeno: i) hidratación con suero:medio (FCS:EGM-2, 1:1) durante las 24 horas a 37°C; ii) matrigel (3 mg/ml) durante 5 minutos a 37°C; iii) matrigel (3 mg/ml) durante 1 minuto y medio a temperatura ambiente; iv) fibronectina (100 µg/ml) durante 1 hora y media a 37 °C. También se modificó el protocolo de fabricación de los dispositivos (*1.5. Sellado de dispositivos microfluídicos*), aumentando el tiempo de incubación con PDL a 8, 16 y 24 horas. Finalmente, se introdujo la variable de los dispositivos, trabajando con

dispositivos de 1 canal y 5 postes (fig. 1a y 1b) con profundidad de 150 y 300 μm , y de 1 canal y 30 postes (fig. 2a y 2b).

2.2.2. Siembra en horizontal

Esta siembra se realiza en dispositivos de 5 canales (fig. 4a, 4b, 5a y 5b). En primer lugar, se realiza una solución de colágeno a 4mg/ml, se introduce en los canales adyacentes al canal central y se incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos para que polimerice. Posteriormente, se realiza una nueva solución de colágeno a 4 mg/ml en la que se embeben fibroblastos cardiacos a una concentración óptima de $1 \cdot 10^5$ cel/ml (2.1. *Fibroblastos embebidos en gel*) y se incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, volteando el dispositivo cada 5 minutos, para asegurar la correcta distribución tridimensional de las células. Finalmente, se introduce en el canal central una solución de HUVECs a $2.5 \cdot 10^6$ cel/ml y se llenan los reservorios con medio FGM-3. El fundamento de esta técnica se basa en introducir una alta concentración de HUVECs para que éstas se adhieran a las paredes de colágeno y formen una monocapa.

Para favorecer la adhesión se probó a realizar una prehidratación durante la noche con suero y medio (FCS:EGM-2, 1:1). También se modificó el protocolo de fabricación de los dispositivos (1.5. *Sellado de dispositivos microfluídicos*), aumentando el tiempo de incubación con PDL a 8, 16 y 24 horas.

En un primer momento, se trabajó con dispositivos de 1 canal con profundidad de 150 y 300 μm (fig. 1a y 1b) desarrollando la monocapa en un canal reservorio y estimulando con VEGF o medio, y con dispositivos de 3 canales (fig. 3a y 3b) cocultivando los fibroblastos en el canal central. Sin embargo, las HUVECs tendían a adherirse a la pared de PDMS, en vez de a la de colágeno. Por tanto, se decidió desarrollar los dispositivos simétricos de 5 canales.

2.2.3. Estimulación de la angiogénesis

Se emplearon distintos tratamientos para estimular el proceso de angiogénesis. Las condiciones de estudio fueron: i) medio EGM-2 como control negativo; ii) VEGF (49

ng/ml) como control positivo; iii) cocultivo con fibroblastos dermales; iv) cocultivo con fibroblastos cardiacos; v) medio condicionado de fibroblastos cardiacos sanos recogido a las 96 horas; vi) medio condicionado de fibroblastos cardiacos en hipoxia recogido a las 96 horas. En el caso de ensayos a 24 horas, se introducía el tratamiento justo después de sembrar la monocapa. Sin embargo, en ensayos cortos de 4-6 horas, se pretrataban la noche anterior, unas 12 horas previas a la siembra de la monocapa, para permitir la difusión de las moléculas y generar el gradiente. Los dispositivos se analizan con microscopía de contraste de fases (*Nikon D-Eclipse C1 Confocal Microscop, objetivo 20x*) tomando fotos cada 20 minutos durante 24 horas.

2.3. Esferoides

2.3.1. Prueba evaporación

Para determinar el tamaño mínimo de gota para cultivar el esferoide, se realizó un ensayo con distintos volúmenes de agua para analizar su evaporación. En la tapa superior de una pequeña placa se añadieron 5, 10 y 15 μ l de agua y se incubó a 37°C, analizándose el volumen cada 24 horas. Para reducir la evaporación, la parte inferior de la placa se llenó de agua.

2.3.2. Cultivo en gota colgante

En primer lugar, para determinar la concentración apropiada de HUVEC para la formación de esferoides, se trabaja a $5 \cdot 10^4$ céls/ml y $5 \cdot 10^5$ céls/ml, considerándose la densidad celular de $5 \cdot 10^5$ céls/ml la más adecuada. Tras obtener una solución a dicha concentración, se añade matrigel (200 μ g/ml) para dar consistencia a la aglomeración. Posteriormente, se sitúa una gota sobre la tapa superior de una pequeña placa y se llena de agua la parte inferior de la placa, para evitar la evaporación.

Tras comprobar que volúmenes pequeños no se evaporaban (2.3.1. *Prueba de evaporación*) se realizaron gotas de 5, 10, 15 y 25 μ l, determinándose que el volumen óptimo eran gotas de 25 μ l, aunque se formaban múltiples esferoides de diversos tamaños y densidades, obteniéndose gran variabilidad.

2.3.3. Cultivo tridimensional en dispositivo microfluídico

Se embeben esferoides cultivados durante 72 horas (2.3.2. *Cultivo en gota colgante*) en geles de colágeno a una concentración final de 4 mg/ml. Esta solución se introduce en el canal central de los dispositivos de 1 canal y 300 μ m (fig. 1a y 1b) y se incuba a 37°C durante 20 minutos, volteando cada 5 minutos, para que polimerice el gel. Finalmente, se rellenan los reservorios con medio como control negativo o VEGF (40 ng/ml) como control positivo.

2.3.4. Cultivo tridimensional en placa de 96 pocillos

Se embeben esferoides cultivados durante 72 horas (2.3.2. *Cultivo en gota colgante*) en geles de colágeno a una concentración final de 4 mg/ml. Se añaden 100 μ l en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (25 μ l de gota colgante en 75 μ l de solución de colágeno) y se incuba a 37°C durante 20 minutos para que polimerice el gel. Finalmente, se añaden 100 μ l de medio como control negativo o VEGF (40 ng/ml) como control positivo.

2.4. Red endotelial

Para realizar la red endotelial se siguió el protocolo de Chen et al. (2012). Primero, se resuspenden HUVECs a $12 \cdot 10^6$ cel/ml en una solución de trombina (4 U/ml) disuelta en medio EGM-2. A continuación, se mezcla con una solución de fibrinógeno (6 mg/ml) en una proporción 1:1, por lo que obtenemos una concentración celular final de $6 \cdot 10^6$ cel/ml en un gel de fibrinógeno de 3 mg/ml. En el momento en que se mezcla la trombina y el fibrinógeno, la trombina activa la conversión de fibrinógeno a fibrina, por lo que los pasos explicados previamente se realizan en hielo para evitar su polimerización temprana. Posteriormente, se introduce esta mezcla en el canal central de los dispositivos de 1 canal (fig. 1a y 1b) y se deja gelificar 15 minutos a temperatura ambiente en una caja húmeda. Finalmente, se llenan los reservorios con medio EGM-2, y el medio se cambia cada 24 horas. Se toman fotos cada 24 horas con microscopía de contraste de fases (*Nikon D-Eclipse C1 Confocal Microscope, objetivo 10x*).

3. Ensayo de proliferación

Se siembran 1000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Tras 2 horas de incubación a 37ºC para que se adhieran, se retira el medio y se añaden distintos tratamientos: medio de cultivo (control), medio de cultivo con 5ng/ml de PDGF-BB y medio de cultivo con 15ng/ml de TGFβ-1. En cada ensayo, se analizan 3 réplicas, con sus respectivos 3 controles negativos, que consisten en los tratamientos sin células.

Para la cuantificación de la proliferación, se utiliza el reactivo Blue Cell Viability de *Abnova*, que es metabolizado por las células vivas dando lugar a un compuesto fluorescente. Se añaden 10 µl de reactivo por cada 100 µl de volumen en el pocillo y se incuba a 37ºC durante 4 horas. La fluorescencia se mide con una longitud de excitación de 570 nm y de emisión de 620 nm. Se realizan medidas a las 0 (momento de la adición de tratamientos), 24, 48, 72 y 96 horas.

4. Ensayo de viabilidad

Se siembran $4 \cdot 10^4$ fibroblastos cardiacos en un volumen de 500 µl por pocillo en una placa de 12 pocillos, o sea, $2 \cdot 10^4$ fibroblastos por pocillo. Se estudian dos condiciones: cultivo en medio FGM-3 y cultivo en condiciones de hipoxia con 8 µM de CPX. Cada 24 horas se tripsinizan y añade el reactivo Azul Trypan en una proporción 1:3 para cuantificar la mortalidad. Este reactivo es un colorante no permeable que solo tiñe de azul las células cuya membrana está dañada, o sea, células muertas.

5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los ensayos de migración se desarrolló un script para su uso con el programa MatLab en colaboración con un miembro del grupo especializado en programación. En primer lugar, se le ordena al programa que cargue los datos obtenidos previamente en el análisis de migración (*2.1. Fibroblastos embebidos en gel*). Dado que se han analizado diferente número de células en cada experimento, las longitudes de las columnas de los datos son distintas, por lo que igualan todas ellas para poder generar una matriz que incluya los datos de las tres condiciones a analizar

(control, PDGF y TGF β). Finalmente, se realiza la función anova1 para cada pareja de datos, obteniendo los valores p de ellos. El script completo se puede encontrar en el *anexo 1*. La estadística de los demás experimentos se llevó a cabo con el Test T.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio del efecto de factores de crecimiento en fibroblastos

Debido a las pérdidas de masa muscular tras las patologías cardiacas, es necesaria la migración celular a las zonas dañadas para compensar el daño (Rebouças et al, 2016). Este suceso también ocurre en otros tejidos estudiados en mayor profundidad, como el epitelial (Tracy et al, 2016). Por tanto, se pensó que sería interesante la comparación de dos estirpes de fibroblastos: dermales (NHDF) y cardiacos (NHCF-v).

En primer lugar, se analizó la migración basal de ambos tipos celulares sin ningún tipo de estímulo externo en geles de 4 mg/ml. Se analizaron las distancias recorridas, la velocidad media que consiste en la distancia total recorrida entre el tiempo invertido en ello, y la velocidad efectiva, que se entiende como la distancia lineal entre el punto de partida y el punto final dividida por el tiempo total (*anexo 2*). Los fibroblastos cardiacos muestran mayores distancias recorridas (fig. 2b) y velocidades medias y efectivas (fig. 2c) que los dermales.

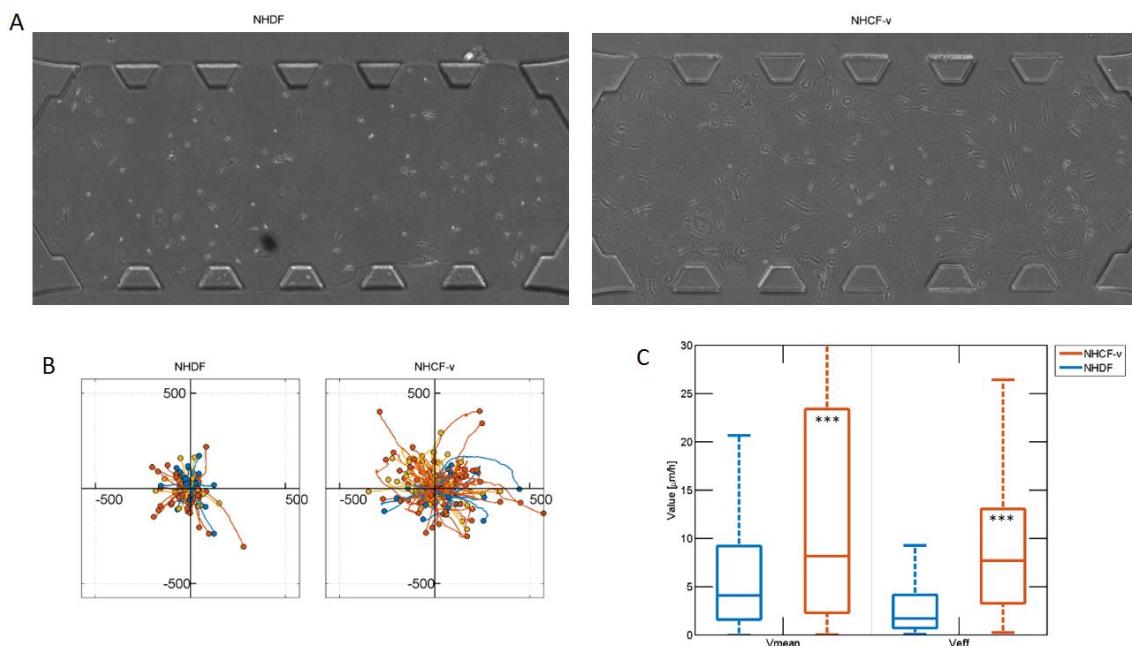


Fig. 2: A) Ensayo de migración de fibroblastos dermales (NHDF) y cardiacos (NHCF-v) en

geles de 4 mg/ml de colágeno; B) trayectorias relativas; C) velocidad medio y efectiva.

*** $p<0.005$. $n=6$.

Estas diferencias tan significantes se deben a su forma celular y la capacidad de ejercer fuerza de cada tipo celular. Los fibroblastos cardiacos adoptan formas más alargadas (fig. 2a) que les permiten interaccionar con fibras de colágeno más alejadas para impulsarse en esa dirección, recorriendo mayores distancias con facilidad (fig. 2b). Además, este tipo celular posee una mayor fuerza contráctil, por lo que se mueve a mayor velocidad, dando lugar a una velocidad media de gran valor (fig. 2c). La velocidad efectiva es prácticamente similar a la media (fig. 2c), lo que indica que el movimiento de los fibroblastos cardiacos ha sido de avance en casi su totalidad. Por otro lado, la forma celular más redondeada de los fibroblastos dermales (fig. 2a) sólo les permite interaccionar con fibras de colágeno cercanas, avanzando distancias menores (fig. 2b) y a una menor velocidad (fig. 2c), lo que indica una menor fuerza contráctil. Finalmente, los fibroblastos dermales muestran una velocidad efectiva muy inferior a la media, indicando que predomina un movimiento circular de escaso avance.

La diferencia de fuerza entre ambos tipos celulares se demuestra al sembrar la misma densidad celular en un gel de colágeno y se incuba durante 24 horas. Tras la siembra de $3 \cdot 10^5$ cel/ml y su incubación durante la noche, se observa que los fibroblastos cardiacos han sido capaces de romper las uniones entre el colágeno y los postes de PDMS (fig. 3), mientras que el gel que embebe los fibroblastos dermales se mantiene fijo a los postes (fig. 3). Esto verifica la mayor fuerza que poseen los fibroblastos cardiacos.

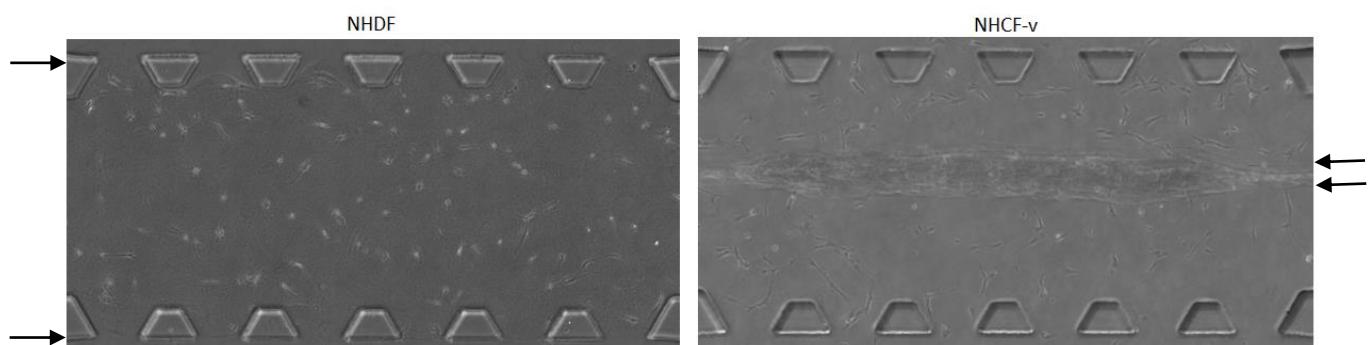


Fig. 3: Siembra de fibroblastos dermales y cardiacos a concentración de $3 \cdot 10^5$ cel/ml tras 24 horas de incubación. Las flechas indican la posición final del gel. $n=3$.

A continuación, se quiso determinar el efecto que tenían distintos factores de crecimiento en la migración de los fibroblastos. Debido a la importancia del PDGF y TGF β en la curación y regeneración de heridas (Barrientos et al, 2008), se consideraron de gran interés para su estudio. Ambos factores presentan distintas isoformas, pero se decidió trabajar con PDGF-BB, ya que está involucrado en la remodelación miocárdica tras infartos (Zhao et al, 2011). En cuanto al TGF β , sus tres isoformas están presentes en la curación de heridas, pero se observa una disminución de TGF β -1 en condiciones no patológicas, sugiriendo una mayor participación de esta isoforma en la regeneración cardiaca (Penn et al, 2012).

Habiéndose demostrado previamente la capacidad de generación de gradientes químicos en los dispositivos microfluídicos (Del Amo et al, 2017; Moreno-Arotzena et al, 2014), se generaron gradientes con ambos factores en la parte superior de los dispositivos. Se observa que los fibroblastos dermales migran significativamente atraídos hacia el PDGF, factor que también aumenta su velocidad efectiva; mientras que los fibroblastos cardiacos solo responden al TGF β , aumentando su velocidad media y efectiva (fig. 4).

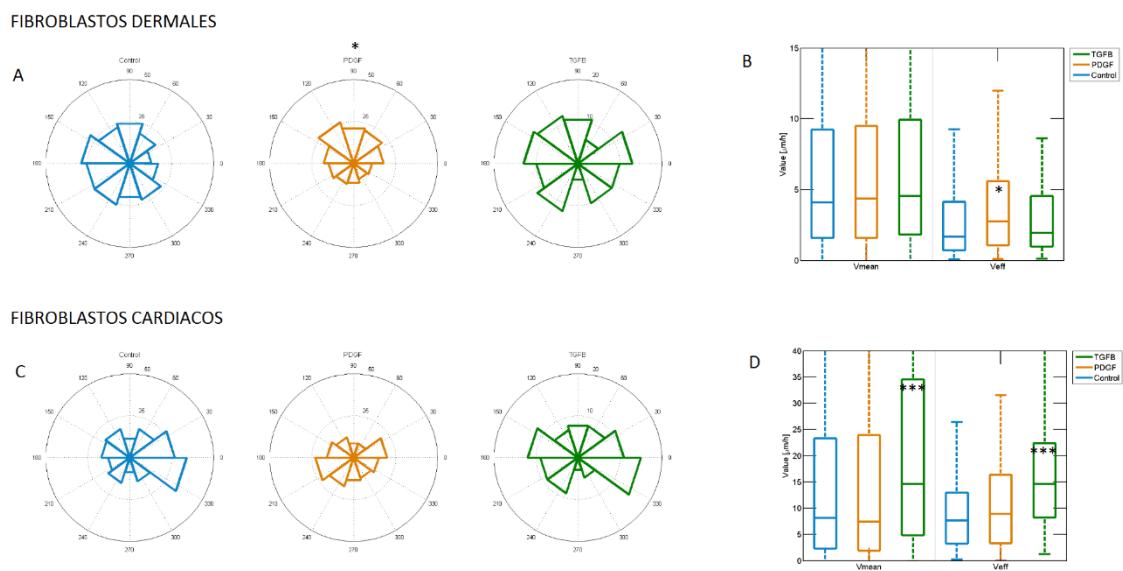


Fig.4: Ensayo de migración de fibroblastos dermales (NHDF) y cardiacos (NHCF-v) con gradientes de PDGF y TGF β . A) Direccionalidad de NHDF; B) Velocidades medias y

*efectivas de NHDF; C) Direccionalidad de NHCF-v; D) Velocidades medias y efectivas de NHCF-v. *p<0.05, *** p<0.005. n=3.*

Otros estudios habían demostrado previamente que en condiciones de herida, los fibroblastos dermales se ven quimioatraídos por PDGF, tanto en 2D (Zeller et al, 2001), como en 3D (Moreno-Arotzena et al, 2014). Nuestros resultados reafirman este hecho, mostrando una tendencia de los NHDF a migrar en la dirección donde se encuentra el factor de crecimiento (fig. 4a). Sin embargo, no solo son atraídos, sino que este factor es capaz de aumentar la velocidad efectiva, (fig. 4b), lo que sugiere que podría generarse un cambio en el citoesqueleto de los fibroblastos para modificar su tipo de movimiento, induciendo un movimiento más direccional.

Por otro lado, los fibroblastos cardiacos no se ven atraídos por ninguno de los factores (fig. 4c), pero sí se observa un aumento muy significativo de su velocidad media y efectiva en respuesta a TGF β (fig. 4d). Este incremento podría ser consecuencia de la capacidad transformante del factor, sugiriendo que estos cambios son el comienzo de la transdiferenciación de fibroblastos cardiacos a otro tipo celular. Un destino final podría ser la diferenciación a miofibroblastos, cambio que ocurre tras daño cardiaco (Thompson et al, 2011). Esta hipótesis se ve respaldada por estudios que han demostrado que el TGF β es capaz de transformar fibroblastos de pulmón en miofibroblastos (Midgley et al, 2013). Sin embargo, para testar esta hipótesis se requiere un estudio en mayor profundidad, analizando, por ejemplo, marcadores específicos de miofibroblastos.

Dado que ambos factores parecen inducir un cambio citoesquelético al modificar las velocidades efectivas o medias, el siguiente paso para continuar su estudio sería una tinción de filamentos del citoesqueleto, como actina o miosina, para analizar las posibles diferencias.

Por último, se quiso analizar el efecto de estos factores en la proliferación fibroblástica. En primer lugar, se observa una gran diferencia en las intensidades recogidas por cada tipo celular, lo que indica que poseen un metabolismo distinto, siendo los fibroblastos dermales mucho más activos a la hora de metabolizar el compuesto utilizado. Sin embargo, lo más sorprendente de estos resultados es que ambos factores, tanto el PDGF, como el TGF β , tienen un efecto negativo significante en la proliferación celular. Estos datos se contradicen con la bibliografía existente, ya que estos factores han sido descritos como potenciadores de la proliferación en fibroblastos en cultivos 2D. Por un lado, estudios previos han demostrado que los fibroblastos dermales cultivados en 2D incrementan su proliferación en respuesta a PDGF en concentraciones entre 10 y 20 ng/ml. En este proyecto, se trabaja con 5 ng/ml, lo que podría indicar que se trata de una concentración muy baja para detectar este aumento proliferativo. Sin embargo, en cuanto al TGF β se ha demostrado que estimula la proliferación en un rango de concentraciones entre 0.1 y 20 ng/ml (Chen et al, 2012), siendo a 5 ng/ml la más estimulante para fibroblastos dermales (Lal BK et al, 2003) y 15 ng/ml para cardíacos (Sigel et al, 1996), concentraciones similares a las utilizadas en este ensayo. Por tanto, esta disminución de proliferación en respuesta a TGF β se da por factores independientes a la concentración del factor. Se realizarán estudios en mayor profundidad para determinar la causa de estos resultados. Por último destacar que otros proyectos han realizado un estudio comparativo de la proliferación en cultivo en dos y tres dimensiones, determinando que este efecto estimulador solo se produce en cultivos 2D, pero no en cultivos tridimensionales en plataformas de hidrogeles (Chen et al, 2012).

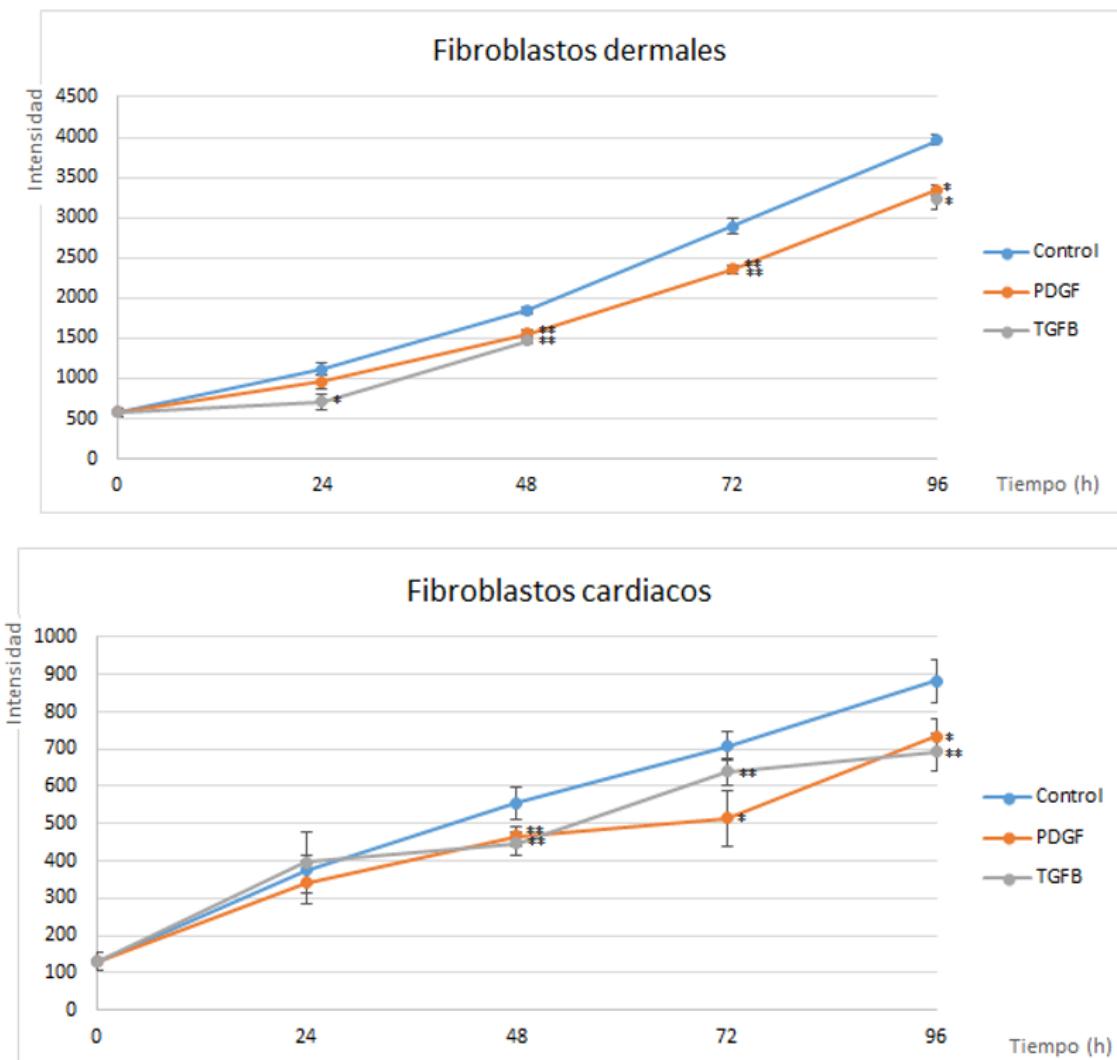


Fig. 5: Ensayo de proliferación de fibroblastos dermales y cardiacos, al ser cultivadas con medio (control), PDGF o TGF β . * $p<0.05$, ** $P<0.01$. $n=3$.

2. Estudio de la angiogénesis

La angiogénesis es esencial para la revascularización de zonas dañadas tras una patología cardiaca, por lo que su estudio es de gran interés (Hoeben et al, 2004). El primer paso para llevar a cabo este proyecto es seleccionar la patología de estudio. Debido a la gran tasa de mortalidad a nivel mundial producido por infartos cardiacos, unos 1.2 millones de víctimas anuales según la Organización Mundial de la Salud, se consideró una patología con alto atractivo para su investigación. A continuación, se debía plantear una forma de generar dichas condiciones simulando el entorno lo más

similar al ambiente fisiológico como sea posible. Para ello, se trabaja con dos tipos de células: fibroblastos cardiacos y células endoteliales. Por un lado, es necesario establecer un sistema para el cultivo de los fibroblastos en condiciones de hipoxia, presente tras un infarto, mientras que, por otro lado, hay que determinar y optimizar la forma más adecuada de imitar el tejido endotelial. Nuestra hipótesis consiste en que los fibroblastos cardiacos en condiciones patológicas de hipoxia van a inducir una mayor angiogénesis, necesaria para la regeneración del tejido.

A la hora de generar condiciones de hipoxia, el primer pensamiento fue incubar los fibroblastos sin oxígeno. Sin embargo, para ello se requería la compra de un nuevo incubador con opción a dichas condiciones. Finalmente, se decidió utilizar el compuesto ciclopirox olamina (CPX), utilizado en otros trabajos previos con la finalidad de generar hipoxia en fibroblastos (Hien Lim et al, 2013). El CPX consiste en un inhibidor de la prolil hidroxilasa, enzima encargada de hidroxilar la subunidad α del factor HIF1, marcándola para su ubiquitinación y degradación. Al inhibir dicha hidroxilación, se bloquea esa ruta, y la subunidad α se une a la β , activando distintos genes presentes en hipoxia. A continuación, se determinó el efecto de este compuesto en la viabilidad de los fibroblastos, para asegurar que éstos no murieran. Para ello, se realizó un ensayo de viabilidad con Trypan Blue durante 5 días, cultivando los fibroblastos cardiacos con medio FGM-3 como control o con 8 μ M de CPX para generar condiciones de hipoxia (fig. 6). Ambos tratamientos mantienen a las células con altos porcentajes de viabilidad, siempre superiores al 85%. Aunque se observa una pequeña bajada de viabilidad a partir del segundo día en condiciones de hipoxia, ésta no es significante. Tras determinar que el CPX no afecta a la viabilidad, se consideró que los fibroblastos serían cultivados durante 3 días con CPX antes de preparar los ensayos de angiogénesis, dando tiempo al compuesto a ejercer su acción y activar la transcripción de los genes regulados por hipoxia, permitiendo a los fibroblastos secretar las señales oportunas para comunicarse con las células contiguas.

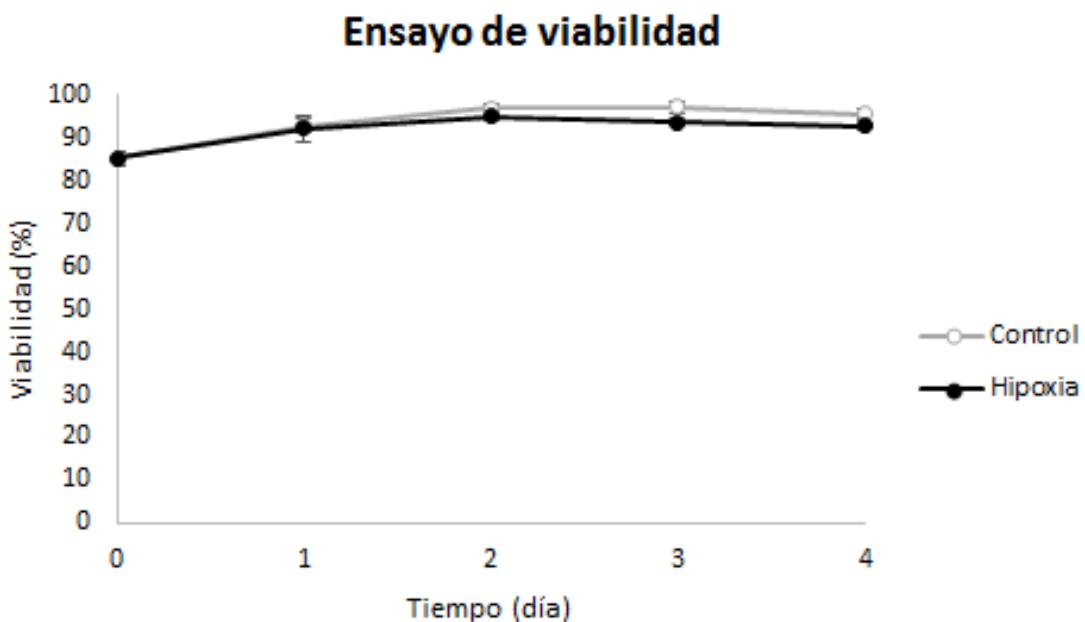


Fig. 6: Ensayo de viabilidad con Trypan Blue durante 1 semana. Los fibroblastos cardiacos se cultivaron con medio FGM-3 como control y con 8 μ M de CPX como condiciones de hipoxia. Los experimentos se realizaron con n=4. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

2.1. Optimización de una monocapa de HUVEC

Por otro lado, se necesitaba optimizar adecuadamente una forma de simular el vaso endotelial. Tomando como referencia otros estudios previos (Del Amo et al, 2015), se procedió con la puesta a punto de una monocapa de células HUVECs. Este procedimiento consistía en realizar un gel de colágeno en el canal central y, posteriormente, sembrar HUVEC en un reservorio y cultivarlo en vertical. De esta forma, las HUVEC se adhieren a la pared de colágeno formando una monocapa que simula parte de un vaso endotelial, siendo capaces de generar vasos nacientes al ser estimuladas (fig. 7).

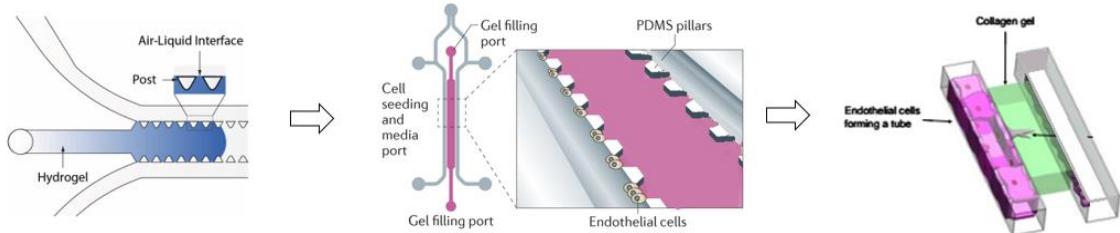


Fig.7: Procedimiento para realizar monocapa de HUVEC en vertical. En primer lugar se introduce un gel de colágeno en el canal central. A continuación se añaden HUVEC en un reservorio y se cultivan en vertical, para que éstas se adhieran al hidrogel formando una monocapa. Finalmente se realizan distintos tratamientos para estimular la angiogénesis (Hsieh-Fu, 2017).

En primer lugar, se trabajó con una concentración de $1.5 \cdot 10^6$ células/ml en geles de colágeno de 2.5 mg/ml. Sin embargo, tras 24 horas de ensayo, el gel no se mantenía unido a los postes, siendo imposible la cuantificación de vasos nacientes (fig. 8). Esto se debe a que las células son capaces de ejercer más fuerza cuando tienen apoyos en zonas de 2D, como la superficie de cristal o los postes de PDMS. De esta forma, tienden a cubrir estas superficies 2D, rompiendo las uniones del gel con los postes.

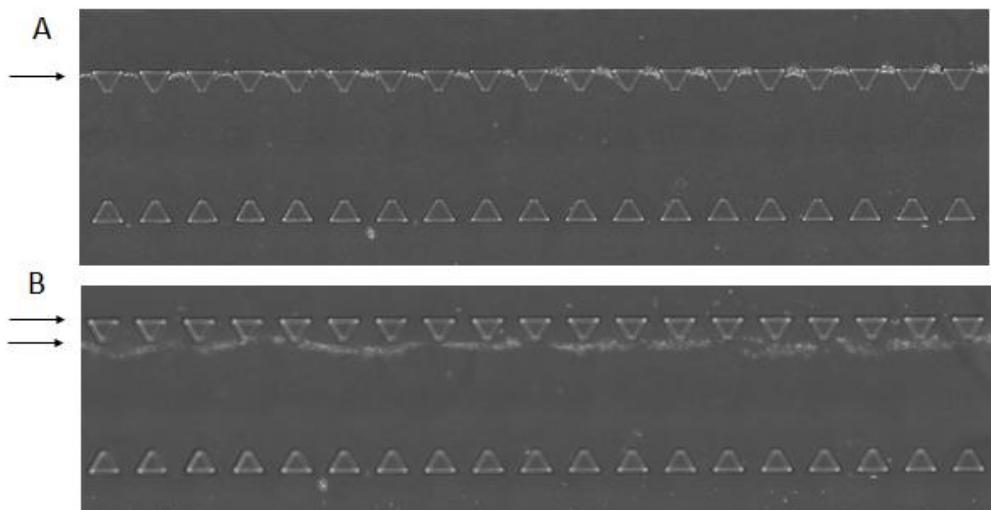


Fig. 8: Monocapa de $1.5 \cdot 10^6$ HUVEC/ml en geles de colágeno de 2.5 mg/ml a las 0h (a) y 24h (b). Las flechas indican la altura inicial y final del gel de colágeno.

Para solventar este problema, se propusieron distintas soluciones que consistían en variar la concentración de HUVEC y de colágeno, o realizar distintos pre-tratamientos para aumentar la adherencia de las HUVEC con el colágeno. Se trabajó con concentraciones celulares de HUVEC de 0.5, 1 y $1.5 \cdot 10^6$ cel/ml, combinadas con densidades de colágeno de 2.5 y 4 mg/ml. Desafortunadamente, ninguna de estas variaciones consiguió mantener la monocapa durante 24 horas. Sin embargo, sí se observó una ligera mejora al combinar las concentraciones de $0.5 \cdot 10^6$ cel/ml y 4 mg/ml, manteniéndose la monocapa alrededor de un par de horas más.

Por tanto, se procedió a realizar distintos pretratamientos en el reservorio antes de la siembra de la monocapa, que pretendían aumentar la adherencia de las HUVECs al colágeno: i) hidratación con suero:medio (FCS:EGM-2, 1:1) durante las 24 horas a 37°C; ii) matrigel (3 mg/ml) durante 5 minutos a 37°C; iii) matrigel (3 mg/ml) durante 1 minuto y medio a temperatura ambiente; iv) fibronectina (100 µg/ml) durante 1 hora y media a 37 °C. El suero genera un efecto similar a la fibronectina, que consiste en una proteína involucrada en la adhesión celular (Rouslahti, 1984), por lo que se espera que las HUVEC se adhieran a la pared del colágeno, en vez de al cristal o PDMS. Por otro lado, el matrigel es un compuesto con actividad biológica que simula la membrana basal, intentando recrear de forma más fisiológica el entorno celular (Kleinman and Martin, 2005). Al igual que las modificaciones anteriores, no se obtuvieron mejoras y el gel de colágeno continuaba siendo arrancado. También se combinaron los tratamientos con dispositivos de distinta altura, de 150 y 300 µm, pero los resultados no fueron favorables.

Por último, se modificó el protocolo de sellado de los dispositivos, aumentando el tiempo de incubación de éstos con PDL de 4h, a 8 y 24h (fig. 9). Se observa que un aumento en el tiempo de incubación con PDL, mantiene el colágeno parcialmente unido a los postes tras una incubación con PDL de 8h y completamente unido tras 24h de PDL. Sin embargo, este hecho no se debe a un aumento de adherencia entre el colágeno y el PDMS, sino a la alta toxicidad celular que genera el PDL, matando a la gran mayoría de células, lo que les impide ejercer fuerza y arrancar el gel.

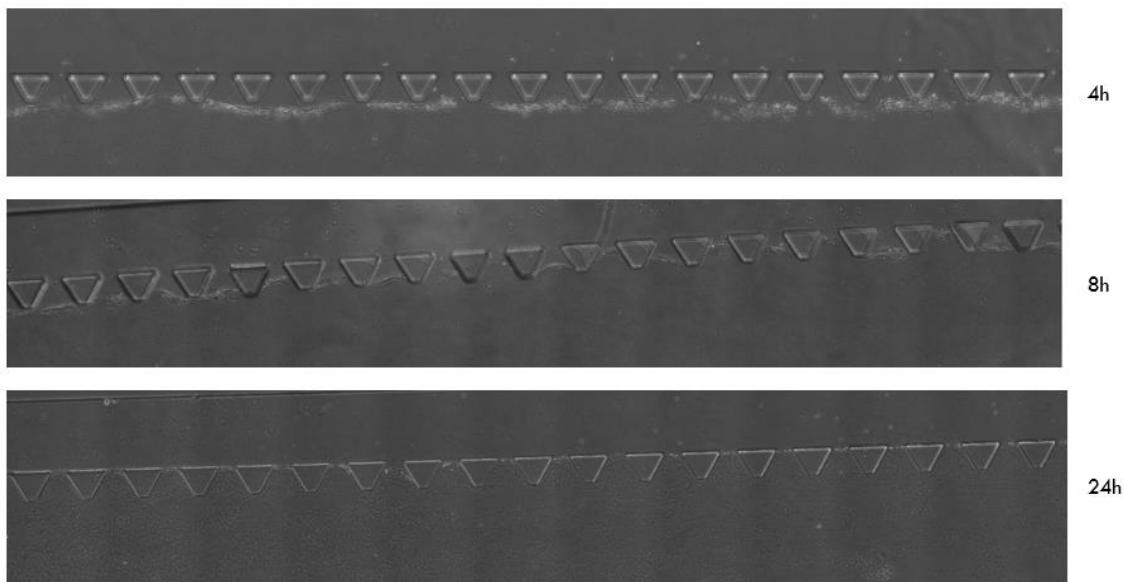


Fig. 9: Siembra de monocapa en vertical en condiciones de $0.5 \cdot 10^6$ cel/ml y 4 mg/ml de colágeno, variando el tiempo de incubación de PDL en el sellado de los dispositivos de 4 horas a 8 y 24 h.

Dada la falta de éxito para mantener la monocapa durante 24 horas, se decidió realizar ensayos de 4 horas con HUVEC a $0.5 \cdot 10^6$ cel/ml en geles de 4 mg/ml. Para ello, en primer lugar se estimuló la angiogénesis con un cocultivo de fibroblastos cardiacos sanos y en condiciones de hipoxia a una concentración de $1 \cdot 10^5$ cel/ml, además del uso de un control negativo que consistía en medio EGM-2. Tras 4 horas no se observó ningún vaso naciente. Esto podía deberse a una baja señalización debido al escaso número de fibroblastos cardiacos cocultivados. Para comprobar esta hipótesis, se cultivaron $4 \cdot 10^4$ fibroblastos cardiacos en una placa e 96 pocillos en un volumen de 500 μ l de medio o medio con CPX, para generar las condiciones de hipoxia. Este medio se recogió a los 4 días y se utilizó para estimular la angiogénesis. Se repitió el ensayo anterior, añadiendo un control positivo que consistía en la estimulación con VEGF (15 ng/ml). Dado el aumento de concentración celular, se esperaba una mayor señalización que estimulara la angiogénesis. Sin embargo, no se observó ningún vaso naciente, ni en el control positivo. Por tanto, se dedujo que 4 horas no eran suficientes para poner en marcha el mecanismo de angiogénesis.

Por tanto, se decidió generar la monocapa con otro protocolo utilizado para el estudio de angiogénesis por otros grupos de investigación (Hien Lim et al, 2013). Éste consistía en generar geles de colágeno en los canales adyacentes y realizar un cultivo de alta densidad de HUVEC, unas $2.5 \cdot 10^6$ cel/ml, en el canal central. Posteriormente se incuban las células a 37°C y ellas mismas proliferan y se adhieren a las paredes de colágeno. En primer lugar se trabajó con dispositivos de 1 canal y 5 postes, generando el gel en el canal central y la siembra en un reservorio. Sin embargo, las HUVEC tendían a adherirse preferentemente a la pared de PDMS, en lugar de la de colágeno, debido a su mayor rigidez. Por tanto, se pasó a trabajar con dispositivos de 3 canales y 5 postes, generando el gel en los canales contiguos y la siembra en el canal central. Sin embargo, estos dispositivos no estaban diseñados para siembras celulares en el canal central, siendo el puerto de llenado muy pequeño (1 mm), lo que conllevaba la entrada de burbujas de aire. Por tanto, debido a la inutilidad de los dispositivos disponibles, se procedió al desarrollo de una nueva geometría mediante el programa AutoCad.

Este nuevo dispositivo consistirá en un diseño simétrico (fig. 1g, 1h, 1i y 1j), lo que nos permitirá analizar en un mismo dispositivo dos condiciones simultáneamente, como por ejemplo, fibroblastos sanos y en hipoxia. Para ello, consta de un canal central en el que se realiza la siembra de HUVEC, y dos canales adyacentes en los que se introducirá el gel de colágeno. De esta forma, ambas paredes del canal central serán similares y las HUVEC no tendrán preferencia por adherirse a ninguna de ellas. Estudios previos demostraron que el contacto de fibroblastos cardiacos con vasos nacientes, hacía que estos se retrotrajeran (Nehls et al, 1998). Para evitar este fenómeno, se decidió añadir dos canales a los extremos, donde se embeberían los fibroblastos en el colágeno, en vez de hacerlo en los canales contiguos del canal central (fig. 10). Por tanto, este dispositivo contaba con 5 canales de siembra, además, de dos reservorios a los extremos del gel. Para aumentar las probabilidades de éxito, se diseñaron con 2 tipos de longitudes, uno de 5 postes y otro de 10.

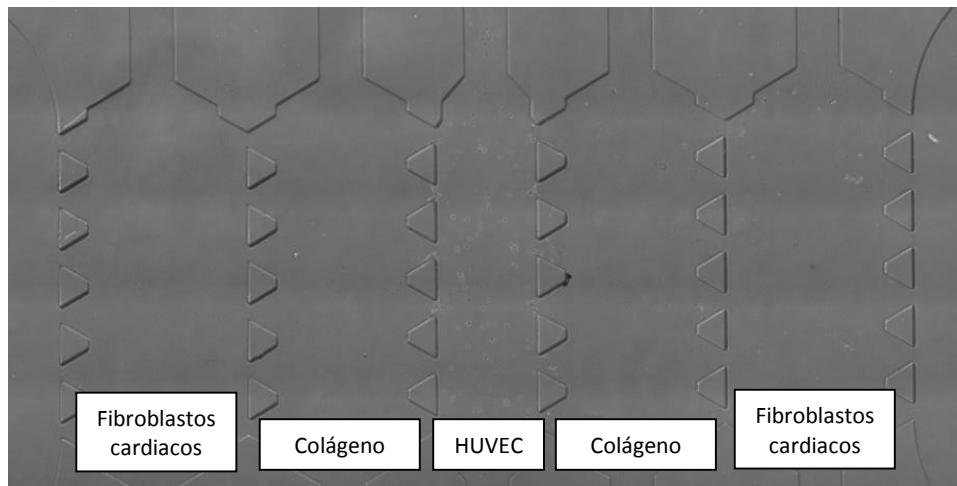


Fig. 10: Dispositivo microfluídico de 5 canales y 5 postes. En las cajas se muestra el tipo celular sembrado en cada canal.

Se realizó la siembra en geles de 2.5 mg/m de colágeno, pero al igual que con los dispositivos utilizados previamente, el gel no aguantaba unido a los postes. Por tanto, se trabajó con geles de 4 mg/ml. En este caso, aparecieron dos tipos de problemas. Por un lado, había ensayos en los que las HUVEC no se adherían a las paredes y no llegaban a formar monocapa, mientras que en los ensayos en los que sí que se adherían, el gel se soltaba de los postes. Para intentar solventar ambos problemas, se realizó un pre-tratamiento con suero:medio (FCS:EGM-2, 1:1) durante las 24 horas a 37°C para intentar aumentar la adherencia de las HUVEC por el colágeno, y también, se modificó el protocolo de sellado de dispositivos, aumentando el tiempo de incubación de PDL a 8, 16 y 24 horas. El tratamiento con suero no mostró ninguna diferencia respecto a los dispositivos sin suero. El aumento de tiempo de incubación con PDL, al igual que en los dispositivos anteriores, generó toxicidad celular (fig. 11).

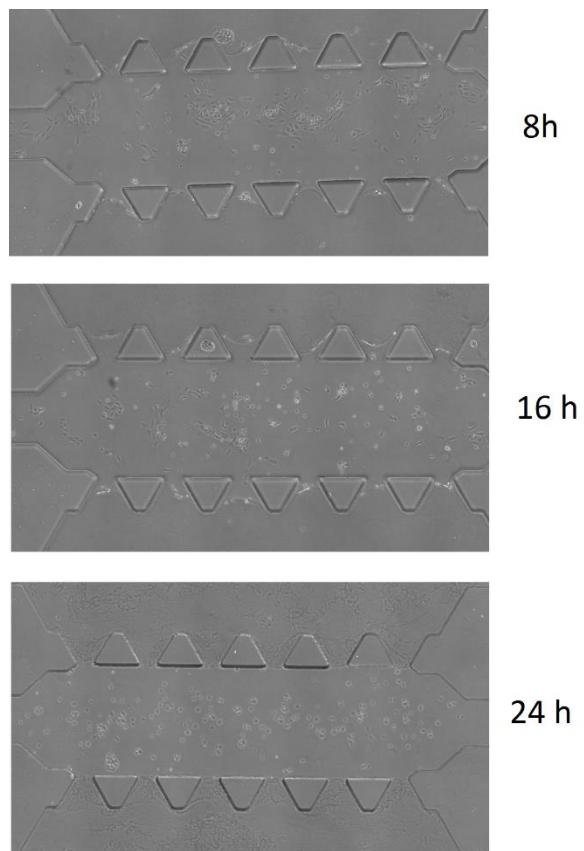


Fig. 11: Siembra de monocapa en horizontal en condiciones de $2.5 \cdot 10^6$ cel/ml y 4 mg/ml de colágeno en dispositivos de 5 canales y 5 postes, variando el tiempo de incubación de PDL en el sellado de los dispositivos de 4 horas a 8, 16 y 24 h.

Tras todas las modificaciones que se realizaron en el protocolo de siembra, ninguna de ellas fue exitosa, por lo que se consideró utilizar otro método de estudio de la angiogénesis. Sin embargo, es cierto que en una variación, se consiguió mantener la monocapa durante una semana (fig. 12), e incluso estimular la angiogénesis con un gradiente de VEGF (15 ng/ml). Esto se obtuvo por serendipia, sembrando $2.5 \cdot 10^6$ HUVEC/ml en un gel de colágeno de 3.22 mg/ml, concentración resultante tras el olvido de adicionar medio diluyente, ya que se esperaba trabajar con geles de 2.5 mg/ml. Sin embargo, pese a numerosos intentos, no se consiguió replicar de nuevo.

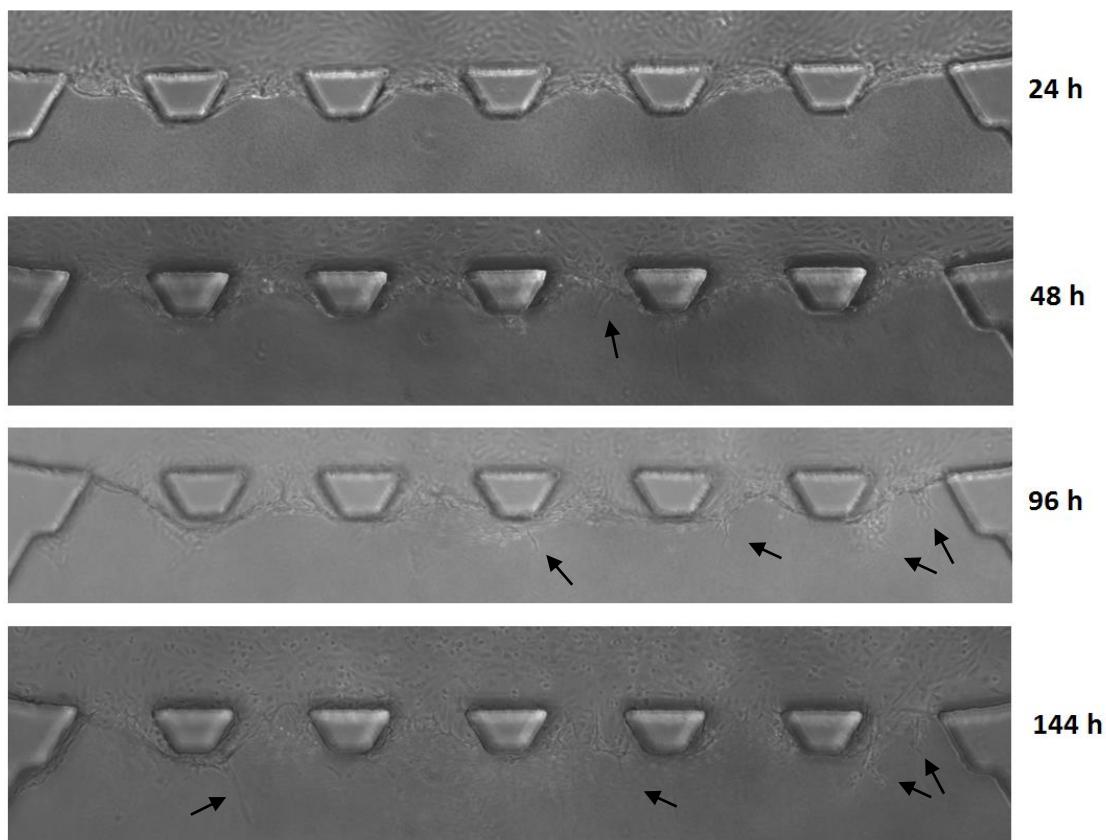


Fig. 12: Mantenimiento de la monocapa de HUVEC, generada por el protocolo de siembra en horizontal, durante una semana. Las flechas indican los vasos nacientes (sproutings).

En la figura 12 se observa que a las 24 horas, las HUVEC se han replicado cubriendo la totalidad del canal central y formando una monocapa adherida al gel de colágeno. A partir de las 48 horas, se puede observar el inicio de la generación y de un único vaso naciente, pero a las 96 horas, se aprecian numerosos sproutings nuevos. Finalmente, a las 144 h, 6 días tras el cultivo de las HUVEC, los sproutings siguen creciendo, pero la monocapa se mantiene difícilmente, ya que muchas células se han adherido a la superficie cristalina, creciendo en 2D y rompiendo las uniones de ésta con el gel.

Aunque no se ha podido optimizar la técnica de sembrado de monocapa para el análisis de angiogénesis, esta forma de estudio sigue siendo muy prometedora. Recientemente, se ha publicado un nuevo protocolo de sellado de dispositivos microfluídicos que aumenta la adherencia de los postes con el gel de colágeno (CITAR PAPER Q MANDO

MANU), que puede ser muy útil para que el desarrollo de esta línea de investigación continúe,

2.2. Optimización de esferoides de HUVEC

Otra forma habitual para el estudio de la angiogénesis, es mediante la formación de esferoides (Heiss et al, 2015; Stahl et al, 2005), conjuntos de células unidas estrechamente que actúan como único elemento. Para la generación de estos esferoides, se recurrió a la técnica de gota colgante, en la cual se cultivan células endoteliales en una gota que contiene matrigel, para darle aumentar la adhesión celular. Este cultivo se realiza en una superficie no adherente y boca abajo. De esta forma, dado que las HUVEC son células adherentes y no tienen una superficie a la que unirse, tienden a agregarse entre ellas, formando esferoides.

En primer lugar, había que determinar el tamaño de gota que podía mantener las condiciones del incubador, sin que ésta se evaporara. Para ello, se depositaron gotas colgantes de agua 5, 10 y 15 μ l y se observó que aguantaban durante más de 1 semana sin evaporarse.

El segundo paso era determinar la concentración adecuada de HUVEC, por lo que se realizaron gotas colgantes de $5 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^5$ cel/ml (fig. 13) en un volumen de 25 μ l (volumen utilizado por el protocolo puesto a punto de la siembra de esferoides de osteoblastos en el laboratorio). A las 24 horas, las HUVEC a concentración de $5 \cdot 10^4$ cel/ml se ven muy separadas y no forman ningún tipo de agregado, posiblemente debido a la baja concentración, mientras que si se aumenta la concentración a $5 \cdot 10^5$ cel/ml, las HUVEC empiezan a agregar, aunque sin llegar a formar esferoides. A las 48 horas, las HUVEC a $5 \cdot 10^4$ cel/ml forman pequeño aglomerados, pero éstos no crecen con el paso del tiempo (72 horas). En cambio, a $5 \cdot 10^5$ cel/ml, los agregados van aumentando de tamaño y espesor, hasta finalmente formar esferoides. A las 120 horas, los esferoides empiezan a deshacerse, debido a la falta de nutrientes, ya que el medio se está agotando. Se ha considerado que el día óptimo es a las 96 horas, ya que se obtienen esferoides de tamaño medio y gran compactación.

	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
$5 \cdot 10^4$ cel/ml					
$5 \cdot 10^5$ cel/ml					

Fig. 13: Siembra de esferoides en gota colgante a densidades de $5 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^5$ cel/ml.

Se muestra imágenes de su crecimiento hasta las 120 horas.

Cabe destacar una estructura peculiar que se muestra al sembrar HUVEC a alta concentración, a $5 \cdot 10^5$ cel/ml, a partir de las 48 horas (fig. 14). Las HUVEC parecen agregar formando una estructura circular, cuyo interior queda hueco. Esta forma de interacción recuerda a la disposición de las células endoteliales al formar vasos. Con el paso de los días, estas estructuras aumentan su espesor, y el interior pasa de estar hueco a albergar un pequeño esferoide en él. Esta estructura no parece haber sido estudiada previamente, ya que no se encuentran referencias a ella en la bibliografía. Para un comenzar un análisis sobre estas estructuras se podría realizar una tinción de actina, lo que permitiría diferenciar la disposición del citoesqueleto de las células formando el esferoide y de las que lo rodean. Otros ensayos interesantes serían la determinación de la expresión génica o proteica de ambos tipos, para conocer sus diferencias metabólicas.

	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
$5 \cdot 10^5$ cel/ml				

Fig. 14: Desarrollo de la estructura circular formada al cultivar HUVEC a $5 \cdot 10^5$ cel/ml en gota colgante.

Tras la formación en gota colgante, los esferoides serán embebidos en geles de colágeno de 4 mg/ml e introducirse en dispositivos microfluídicos para la estimulación de la angiogénesis. Sin embargo, el puerto de carga tenía un diámetro inferior al de los esferoides, e incluso la anchura de los canales no es lo suficientemente grande, haciendo que éstos se disgregaran al introducirlos en el dispositivo (fig. 15). Se observa que estos pequeños agregados que se forman no tienen gran cohesión, y pese a su estimulación con VEGF, no se induce ningún tipo de cambio en su estructura.

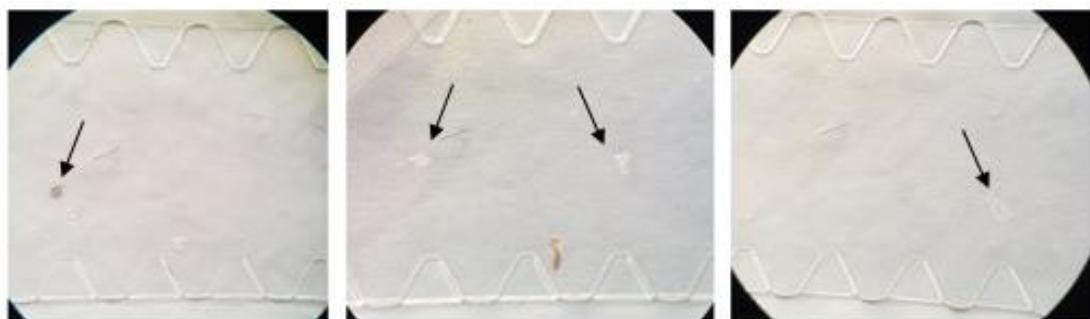


Fig. 15: Siembra de esferoides, cultivados en gota colgante durante 96 horas, en dispositivo microfluídicos. Los esferoides se disgregan formando pequeños agregados (flechas).

Para el cultivo de esferoides en dispositivos microfluídicos, sería necesario el diseño de una nueva geometría, por lo que este estudio será una posible futura línea de investigación en este grupo. Como alternativa, los esferoides se sembraron en placas de 96 pocillos. Otros estudios sugieren el uso de bajas concentraciones de colágeno, para favorecer la formación de vasos nacientes (Heiss et al, 2015). Por tanto, se sembraron varios pocillos con esferoides en geles de 2.5 mg/ml y otro de 4 mg/ml. Ambas condiciones fueron estimuladas con VEGF, además de incluir un control negativo sólo de medio EGM-2 (fig. 16). En cuanto a la estimulación de angiogénesis, no se mostraron diferencias en los distintos tratamientos, ni con la variación de densidad de colágeno, ni con la estimulación con VEGF. Esto puede deberse a que la concentración de colágeno sigue siendo demasiado elevada, y las HUVEC no son capaces de formar vasos nacientes. Otra posibilidad es que se observa que los esferoides han tendido a adherirse al fondo del pocillo, formando estructuras en 2D, en vez de mantenerse tridimensionalmente,

por lo que el mecanismo de angiogénesis se ve interferido. Una sugerencia para solventar este problema es el depósito de una capa inicial de colágeno, y una vez polimerizada, la adición del esferoide embebido en colágeno. De esta forma, el esferoide no podría unirse al fondo, ya que éste está cubierto por una superficie tridimensional de colágeno. Sin embargo, sí que se observa diferencia en la densidad de los esferoides, siendo más compactos a mayor concentración de colágeno.

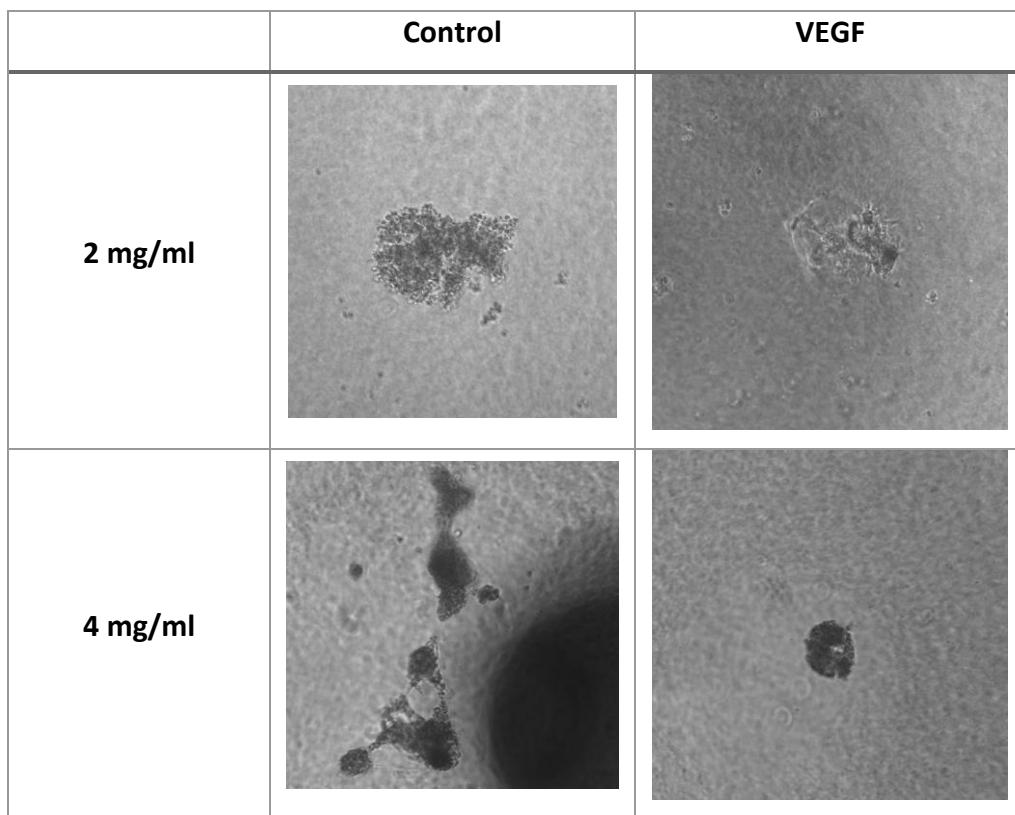


Fig. 16: Siembra de esferoides en placa de 96 pocillos. Se utilizaron concentraciones de colágeno de 2 y 4 mg/ml, y estimulación con medio o VEGF.

Aunque no se ha conseguido la optimización del cultivo de esferoides en geles de colágeno, la puesta a punto va por buen camino. Se espera que tras el diseño de los nuevos dispositivos o el estudio en mayor profundidad de la siembra en placas de 96 pocillos, se obtenga un método fiable de estudio de la angiogénesis.

2.3. Optimización de una red endotelial

Hasta ahora, se ha intentado estudiar el efecto de los fibroblastos en condiciones de hipoxia sobre la angiogénesis. Sin embargo, se ha querido dar un paso más allá y estudiar su efecto sobre la formación de una red endotelial. Para ello, se pretendía cocultivar fibroblastos cardiacos sanos y en hipoxia con células endoteliales o utilizar medio condicionado con las células endoteliales, y observar las posibles diferencias. Sin embargo, el primer paso era la optimización de la formación de una red endotelial.

Se siguió el protocolo de Chen et al. (2012), que consiste en la siembra de una alta densidad de HUVEC en geles de fibrina, y sin estimulaciones externas, las HUVEC son capaces de interaccionar entre sí formando una red. Las células comienzan a adherirse entre ellas tras la siembra, observándose pequeñas aglomeraciones a las 24 horas (fig. 17). A las 48 horas las HUVEC empiezan a elongarse e interaccionar con células vecinas, formando complejos alargados (fig. 17). Estas formaciones conectan entre ellas a las 72 horas, formando estructuras de mayor tamaño (fig. 17). Sin embargo, a partir del cuarto día, se observa que las células, en vez de continuar con la formación de la red endotelial hasta formar lúmenes, comienzan a romper sus uniones y morir por apoptosis (fig. 17). Una posible consecuencia de la incapacidad de generar redes vasculares puede ser el alto pasaje de las células HUVEC utilizadas (pasaje 9). Se recomienda utilizar pasajes menores, ya que las células endoteliales tienden a ser más senescentes al aumentar el pasaje (Chen et al, 2012).

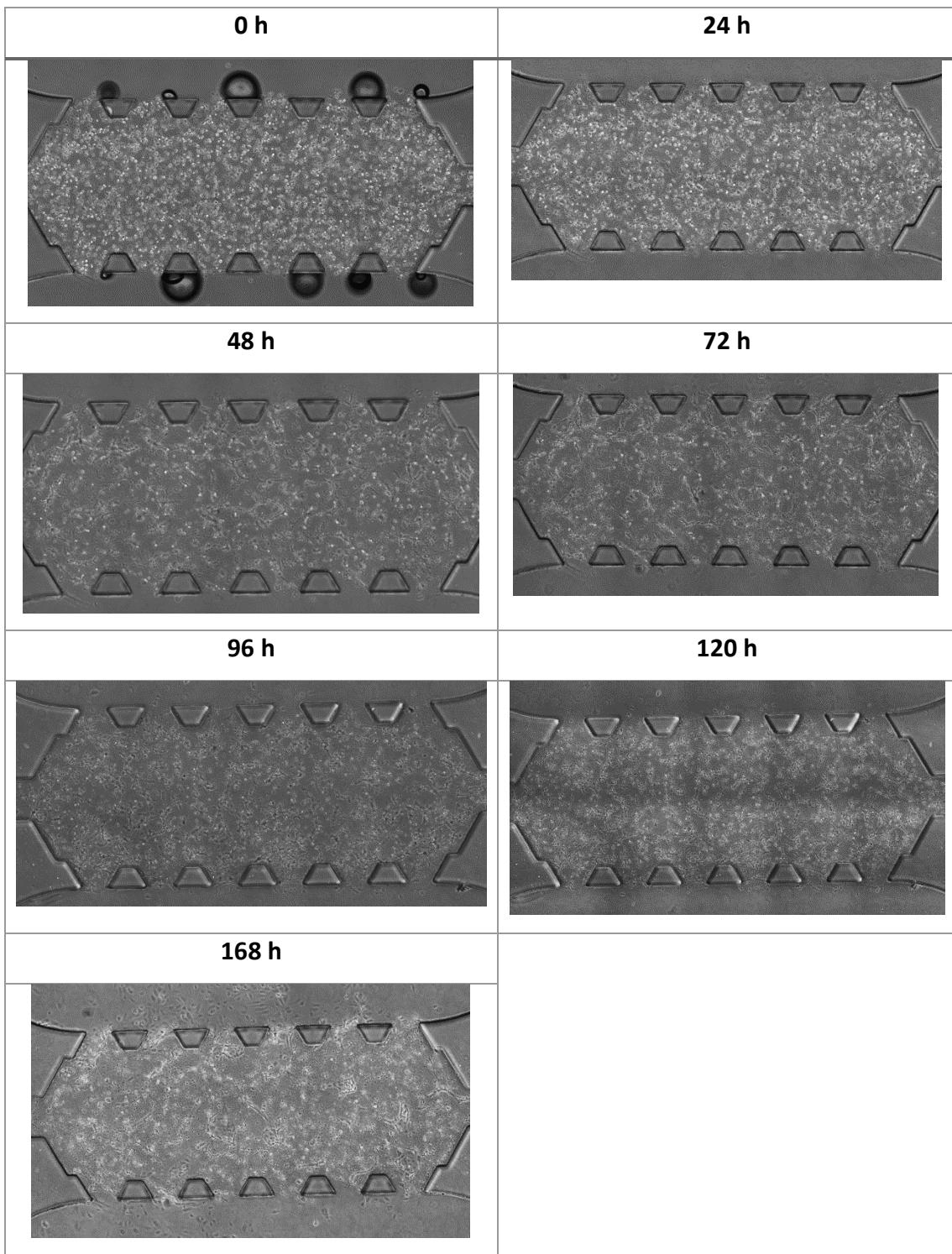


Fig. 17: Desarrollo de una red endotelial de HUVEC en dispositivos microfluídicos durante 1 semana. Fotos tomadas a día 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 7.

Sin embargo, este ensayo es muy prometedor para el estudio de la relación entre la comunicación celular entre las HUVEC para la formación de redes endoteliales y la

señalización emitida por células adyacentes en condiciones específicas, como los fibroblastos cardiacos en hipoxia. Por tanto, líneas futuras de investigación incluirán la modificación y optimización del protocolo en busca de una mejoría en el mantenimiento de la red.

CONCLUSIONES

1. Los fibroblastos cardiacos en cultivo tridimensional adoptan una forma más alargada que los dermales que les permite adquirir una mayor velocidad media y efectiva.
2. Los fibroblastos cardiacos tienen una mayor fuerza contráctil que los dermales.
3. El factor PDGF quimioatrae a los fibroblastos dermales y aumenta su velocidad efectiva.
4. El factor TGF β aumenta la velocidad media y efectiva de los fibroblastos cardiacos.
5. Tanto el PDGF, como el TGF β , muestran una tendencia a disminuir la proliferación de los fibroblastos dermales y cardiacos.
6. El compuesto ciclopirox olamina (CPX) genera condiciones de hipoxia en fibroblastos cardiacos sin afectar a la viabilidad a corto plazo.
7. La formación óptima de esferoides sembrados en gota colgante es a una concentración de $5 \cdot 10^5$ cel/ml e incubados durante 96 horas.
8. La optimización de una monocapa de HUVEC, cultivo de esferoides endoteliales en geles tridimensionales y formación de redes endoteliales requieren estudios en mayor profundidad.

CONCLUSIONS

1. Cardiac fibroblasts cultures in 3 dimensions adopt a more lengthened shape than dermal ones, which let them to acquire greater mean and effective velocity.
2. Cardiac fibroblasts has a greater contractile force than dermal ones.
3. PDGF factor chimio-attracts dermal fibroblasts and increase their effective velocity.
4. TGF β factor increases mean and effective velocity in cardiac fibroblasts.
5. Both PDGF and TGF β , show a tendency to diminish proliferation in dermal and cardiac fibroblasts.
6. Ciclopirox olamina (CPX) compound generate hypoxia conditions in cardiac fibroblasts without affecting their viability in short term.
7. Optimal formation of endothelial spheroids cultured in hanging drop is at the concentration of $5 \cdot 10^5$ cel/ml and incubated for 96 hours.
8. Optimization of a HUVEC's monolayer, endothelial spheroids in three-dimensional hydrogels and formation of endothelial networks require deeper studies.

BIBLIOGRAFÍA

1. Artículos

Allen et al. (2015) **Wound healing and Growth Factors** [Online]. Disponible: <http://emedicine.medscape.com/article/1298196-overview#a3>

Anquiano et al. (2017) **Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mized collagen matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis.** PLoS One, 12(2): e0171417.

Barrientos et al. (2008) **Growth factors and cytokines in wound healing.** Wound Repair and Regeneration, 16: 585-60.

Chen et al. (2012) **On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics** (Protocol extension). Nat protoc., 7, 1247-1259.

Chen et al. (2012) **Response of fibroblasts to Transforming Growth Factor- β 1 on two-dimensional and in three-dimensional hyaluronan hydrogels.** Tissue Eng Part A, 18(23-24): 2528-2538.

Del Amo et al. (2015) **Quantification of angiogenic sprouting under different growth factors in a microfluidic platform.** Journal of Biomechanics, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.10.026i>

Del Amo et al. (2017) **Quantifying 3D chemotaxis in microfluidic-based chips with step gradients of collagen hydrogel concentrations.** Integratice Biology, 9(4): 339-349.

Halldorsson et al. (2015) **Advantages and challenges of microfluidic cell culture in poludimethylsiloxane devices.** Biosensors and Bioelectronics, 63: 218-231.

Harnett, Alderman and Wood. (2007) **The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 55(1), 90-97.

Heiss et al. (2015) **Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro.** FASEB J, 29(7): 3076-84.

Herreros et al. (2011) **Cellular cardiac regenerative therapy.** Cirugía Cardiovascular, Vol 18: 207-215.

Hien Lim et al. (2013) **Complementary effects of ciclopirox olamine, a prolyl hydroxylase inhibitor and sphingosine 1-phosphate on fibroblasts and endothelial cells in driving capillary angiogenesis.** Integrative Biolg, 5, 1474.

Hoeben et al. (2007) **Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis.** Pharmacological Reviews, 56(4): 549-580.

Hsieh-Fu et al. (2017) **Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment.** Journal of the Royal Society Interface, 14(131).

Huang et al. (2010) **Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics.** Mathematical and Computer Modelling, 52, 11-12: 2036-2042.

Kleinman and Martin. (2005) **Matrigel: basement membrane matrix with biological activity.** Semin Cancer Biol, 15(5): 378-86.

Laflamme and Murry. (2014) **Heart Regeneration.** Nature, 473(7347): 326-335.

Lal BK et al. (2012) **Altered proliferative responses of dermal fibroblasts to TGF-beta1 may contribute to chronic venous stasis ulcer.** J Vasc Surg, 37(6): 1285-93.

Leask. (2007) **TGF β , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response.** Cardiovasc Res, 74(2):207-212.

Lindner et al. (2014) **Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure.** Basic Res Cardiol, 190: 428.

Mandic et al. (2016) **Molecular Imaging of Angiogenesis in Cardiac Regeneration.** Curr Cardiovasc Imaging Rep, 9(10): 27.

Mark et al. (2010) **Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications.** Chem Soc Rev, 39: 1153-1182.

Midgley et al. (2013) **Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated Fibroblast to Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Hyaluronan (HA)-facilitated Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and CD44 Co-localization in Lipid Rafts.** J Biol Chem, 288(21): 14824-14838.

Moreno-Arotzena et al. (2014) **Inducing chemotactic and haptotactic cues in microfluidic devices for three-dimensional in vitro assays.** Biomicrofluidics, 8(6): 064122.

Moreno-Arotzena et al. (2015) **Characterization of Fibrin and Collagen Gels for Engineering Wound Healing Models.** Materials (Basel), 8(4): 1636-1651.

Moreno-Arotzena et al. (2015) **Fibroblast Migration in 3D is Controlled by Haptotaxis in a Non-muscle Myosin II-Dependent Manner.** Ann Biomed Eng, 43(12): 3025-39..

Nakatsu et al. (2003) **Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1.** Microvascular Research, 66: 102-112.

Nehls et al. (1998) **Contact-dependent inhibition of angiogenesis by cardiac fibroblasts in three-dimensional fibrin gels in vitro. Implications for microvascular network remodeling and coronary collateral formation.** Cell Tissue Res, 293: 479-488.

Penn et a. (2012) **The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review.** Int J Burns Trauma, 2(1) 18-28.

Rebouças et al. (2016) **Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges.** Arg Bras Cardiol, 107(3): 271-275.

Rouslahti. (1984) **Fibronectin in cell adhesion and invasion.** Cancer Metastasis Rev, 3(1): 43-51.

Rusconi et al. (2014) **Microfluidics Expanding the Frontiers of Microbial Ecology.** Annu rev Biophys, 45: 65-91.

Sackmann et al. (2010) **The present and future role of microfluidics in biomedical research.** Nature, 507: 181-189.

Shin et al. (2012) **Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels.** Nat Protoc, 7(7): 1247-1259.

Sigel et al. (1996) **Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by Transforming Growth Factor- β 1.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 28(9): 1921-1929.

Stahl et al. (2005) **Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: A model for bone replacement grafts.** FEBS Letters, 579(24): 5338-5342.

Thompson et al. (2011) **Mechanical Coupling Between Myofibroblasts and Cardiomyocytes Slows Electrical Conduction in Fibrotic Cell Monolayers.**

Tracy et al. (2016) **Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound.** Adv Wound Care (New Rochelle), 5(3) 119-136.

Velve-Casquillas et al. (2010) **Microfluidic tool for cell biological research.** Nano Today, 5(1): 28-47.

Zeisberg and Kalluri. (2010) **Origins of cardiac Fibroblasts.** Circ Res, 107(11): 1304-1312.

Zhao et al. (2001) **Release of pro and anti angiogenic factors by human cardiac fibroblasts, effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells.** Biochimica et Biophysica, Acta 15328: 273-282.

Zhao et al. (2011) **Platelet-Derived Growth Factor Involvement in Myocardial Remodeling following Infarction.** J Mol Cell Cardiol, 51(5): 830-838.

2. Páginas web

World Health Organization (2015). Disponible:
http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/

LiveScience (2016). Disponible: <https://www.livescience.com/34655-human-heart.html>

Henniker plasma. **Plasma Treatment of PDMS for Microfluidics** [Online]. Disponible:
<https://plasmatreatment.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-treatments/plasma-surface-activation-to-improve-adhesion/plasma-treatment-of-pdms/>

Cardio Research (2016). **El corazón y el tejido cardíaco** [Online]. Disponible:
<http://www.cardio-research.com/spanish/el-corazon-y-el-tejido-cardiaco>

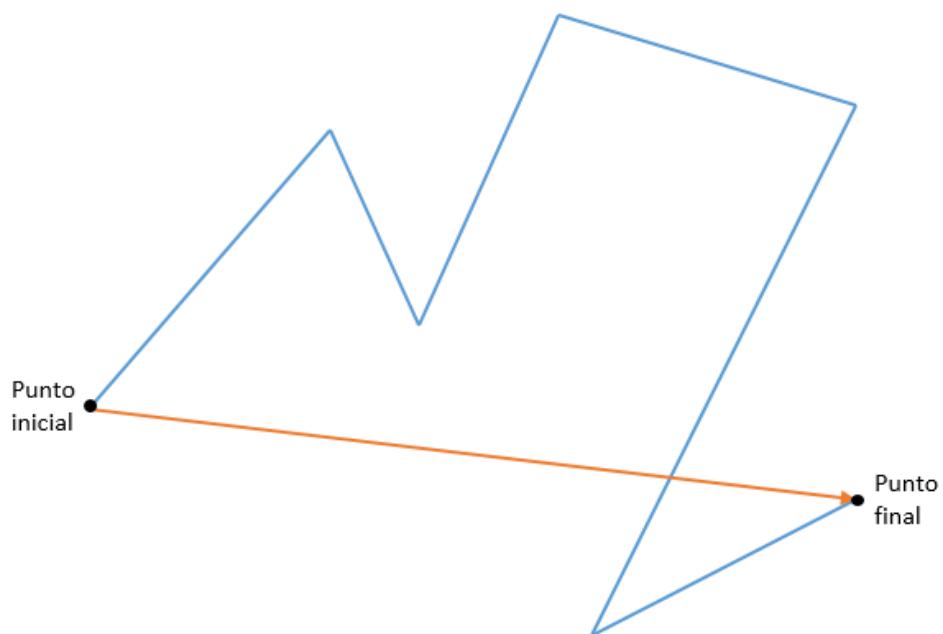
ANEXO 1

Script diseñado para el análisis estadístico de los ensayos de migración.

```
load('D:\Users\Sandra\Migración\FB      cardiacos      control\NHCFv      -'
Control\multichip_data.mat')
pos1 = glob_pos(:,1);
Vmean1 = glob_vmean (:);
Veff1=glob_veff(:);
load('D:\Users\Sandra\Migración\FB      cardiacos      PDGF\NGCFv      -'
PDGF\multichip_data.mat')
pos2 = glob_pos(:,1);
Veff2=glob_veff(:);
Vmean2 = glob_vmean (:);
load('D:\Users\Sandra\Migración\FB
TGFB\MULTICHIP_RESULTS\multichip_data.mat')      cardiacos
pos3 = glob_pos(:,1);
Veff3=glob_veff(:);
Vmean3 = glob_vmean (:);
Veff_total = NaN.*ones(537,3);
Veff_total(1:length(Veff1),1) = Veff1;
Veff_total(1:length(Veff2),2) = Veff2;
Veff_total(1:length(Veff3),3) = Veff3;
Vmean_total = NaN.*ones(38664,3);
Vmean_total (1:length(Vmean1),1)= Vmean1;
Vmean_total (1:length(Vmean2),2)= Vmean2;
Vmean_total (1:length(Vmean3),3)= Vmean3;
pos_total = NaN.*ones(179,3);
pos_total (1:length(pos1),1)= pos1;
pos_total (1:length(pos2),2)= pos2;
pos_total (1:length(pos3),3)= pos3;
%Velocidad efectiva
anova1([Veff_total(:,1),Veff_total(:,2)], ['1', '2'])
anova1([Veff_total(:,1),Veff_total(:,3)], ['1', '3'])
anova1([Veff_total(:,2),Veff_total(:,3)], ['2', '3'])
%Velocidad media
anova1([Vmean_total(:,1),Vmean_total(:,2)], ['2', '3'])
anova1([Vmean_total(:,1),Vmean_total(:,3)], ['1', '3'])
anova1([Vmean_total(:,2),Vmean_total(:,3)], ['1', '2'])
%Dirección
anova1([pos_total(:,1),pos_total(:,2)], ['1', '2'])
anova1([pos_total(:,1),pos_total(:,3)], ['1', '2'])
anova1([pos_total(:,2),pos_total(:,3)], ['1', '2'])
```

ANEXO 2

Figura explicativa sobre el análisis de la velocidad media y efectiva. La velocidad media es la distancia total recorrida por la célula a lo largo del tiempo, mientras que la velocidad efectiva indica la distancia entre el punto inicial y final, en línea recta, entre el tiempo invertido. La distancia entre el punto inicial y final siempre será menor o igual que la distancia total recorrida, por lo que la velocidad efectiva siempre será menor o igual que la velocidad efectiva.



$$\text{Velocidad media} = \frac{\text{distancia total recorrida}}{\text{tiempo}}$$

$$\text{Velocidad efectiva} = \frac{\text{distancia entre punto inicial y final}}{\text{tiempo}}$$