

Guillermo Alejandro Llamazares Prieto

Desarrollo de sistemas microfluídicos en la multiescala para el cultivo celular y tisular

Director/es

OCHOA GARRIDO, IGNACIO
FERNÁNDEZ LEDESMA, LUIS JOSÉ

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE SISTEMAS MICROFLUÍDICOS
EN LA MULTIESCALA PARA EL CULTIVO
CELULAR Y TISULAR**

Autor

Guillermo Alejandro Llamazares Prieto

Director/es

**OCHOA GARRIDO, IGNACIO
FERNÁNDEZ LEDESMA, LUIS JOSÉ**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado**

2018

TESIS DOCTORAL

*DESARROLLO DE SISTEMAS
MICROFLUÍDICOS EN LA
MULTIESCALA PARA EL
CULTIVO CELULAR Y TISULAR*

GUILLERMO ALEJANDRO LLAMAZARES PRIETO
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA 2018

Quiero dedicar este trabajo a mi madre, y hermanos.

Pero, sobre todo, a la memoria de mi padre.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis los doctores Luis José Fernández Ledesma y Ignacio Ochoa Garrido el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Quiero agradecerles el que me hayan puesto desafíos y que me hayan dado libertad para enfrentarme a ellos, lo que me ha permitido crecer como investigador y persona.

Quiero agradecerles a Clara Alcaine, Sara Olivan y Rebeca Guerrero las horas de apoyo técnico, consejos y esfuerzo que han aportado para permitirme llevar a buen puerto este trabajo. Al igual que a Roxana Subaseanu por facilitarnos a todos la vida al ser siempre una fuente de repuestas y soluciones para cualquier trámite administrativo.

Quiero agradecer la asistencia prestada por los servicios de enfermedades digestivas y de anatomía patológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza para la realización de este trabajo. En especial a los doctores Ángel Lanas, Carlos Cuesta, M^a Teresa Ramírez y Ariel Gonzalez.

A la gente del grupo GENOXPHOS de la facultad de ciencias por haberme ayudado a iniciarme en mi carrera investigadora. En especial a Patricio Fernández, Raquel Moreno y Patricia Meade.

A la gente del Wake Forest Institue for Regenerative Medicine por haberme hecho sentir como en casa, tan lejos de casa. En especial a Shay Soker por toda su dirección, ayuda y apoyo. A mis compañeros en ultramar Emma Moran, Dipen Vyas, Abritee Dhal, Matthew Brovold y Etai Sapoznik les deseo la mejor en sus proyectos.

A mis compañeros de laboratorio y ya Doctores, José María Ayuso, Rosa Monge, y María Virumbrales quiero agradecerles su cordialidad, buenos momentos, así como los consejos y discusiones científico-técnicas, a todos ellos les deseo la mejor de las suertes en los proyectos que emprendan.

Al igual que les deseo la mejor de las suertes a todos los que ahora están embarcados en este viaje que una tesis, Alodia Lacueva, Jacobo Ayuensa, Teodora Randelovic e Isabel Calatayud. Gracias por vuestra cordialidad, los buenos momentos y los ratos de ciencia. A todos, suerte, y si alguna vez necesitáis de mi ayuda a una llamada de distancia estoy.

A Diana Eneriz, Alberto Torrejon, Beatriz Olarte y Francisco Requena gracias por dejarme ayudaros durante vuestros proyectos y permitirme aprender de vosotros tanto como espero haber podido aportaros.

A la señorita Carolina Sebastián y a, la ya doctora, Cristina del Amo gracias por los buenos ratos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio (Ese proyecto NIMROD...;).

A mis hermanos del laboratorio, porque como dijo el inmortal dramaturgo: “Porque quien vierta hoy su sangre conmigo será mi hermano”, gracias. Gracias a José Luis Calavia por haber sido “el maestro” que bromeábamos que eres, gracias por haberme

ayudado, enseñado y criticado a partes iguales. Gracias por tu humildad, tu buen corazón y tu tranquilidad. Pero sobre todo gracias por tu amistad. Gracias a “La guardia de la noche” por haber guardado conmigo el muro en nuestro particular “Castle Black” en medicina. Gracias, Alan Eduardo Viguera y Sandra González por todos los buenos momentos, por haber estado ahí en los malos, por toda la ayuda del mundo y por encima de por vuestra amistad.

A mis amigos: Aitor, Armando, Chema, José Luis, Beatriz, María, Elena, Felipe y Jesús. Gracias por ser las personas que cualquiera desearía llamar amigo y cuidarme como a tal. Tengo tanto que agradecer que no sabría ni por dónde empezar.

A Diana por haber compartido estos años conmigo, por haberme ayudado a ver la luz en las noches más oscuras y a encontrar el rumbo tantas veces. Por esto y mucho más siempre te estaré agradecido.

A mi madre M^a Luz por enseñarme el valor del coraje, el esfuerzo, el sacrificio, la paciencia y la generosidad. Por todo y por más jamás seré capaz de agradecerte todo lo que me has dado. A mis hermanos Álvaro y Talía, gracias por apoyarme, por creer siempre en mí y por soñar conmigo. Pero sobre todo gracias por vuestra bondad y generosidad.

A mi padre Emiliano por haberme enseñado a soñar, a preguntarme el porqué de todo y que la curiosidad es el don más maravilloso del mundo. De no ser por ti, jamás hubiera tomado este camino. Por todo y por más, gracias.

INDICE

LISTADO DE FIGURAS	10
LISTADO DE TABLAS	13
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 MOTIVACIÓN.....	17
1.2 TÉCNICAS DE CULTIVO TRADICIONAL: EL CULTIVO BIDIMENSIONAL	18
1.2.1 EL DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS ADHERENTES	18
1.2.2 CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS ADHERENTES BIDIMENSIONALES Y SUS LIMITACIONES	19
1.3 NUEVAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR: EL CULTIVO TRIDIMENSIONAL.....	20
1.3.1 EL CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL	20
1.3.2 MODELOS Y TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL	22
1.3.3 LIMITACIONES DEL CULTIVO TRIDIMENSIONAL.....	25
1.4 NUEVAS PLATAFORMAS DE CULTIVO CELULAR: MICROFLUÍDOS.....	26
1.4.1 MICROFLUÍDICA Y MICROFABRICACIÓN	26
1.4.2 COMPORTAMIENTO FLUÍDICO EN LA MICROESCALA	27
1.4.3 APLICACIONES MICROFLUÍDICAS PARA CULTIVO CELULAR.....	30
1.4.4 VENTAJAS Y DESAFIOS DE LOS MODELOS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR.....	32
CAPÍTULO 1. DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR DESARROLLADOS EN SU-8 Y HERRAMIENTAS DE CONEXIÓN MULTIESCALA A SISTEMAS FLUÍDICOS	34
INTRODUCCIÓN.....	35
OBJETIVOS.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
DISEÑO Y FABRICACION DE LOS MICRODISPOSITIVOS EN SU-8	40
DISEÑO DE LOS ENCAPSULADOS.....	43
TIPOS CELULARES, MEDIOS DE CULTIVO.....	44
AISLAMIENTO DE HUVEC.....	45
CULTIVO CELULAR	46
SIEMBRA Y CULTIVO CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS	47
VIABILIDAD CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS.....	47
EXPERIMENTOS DE ADHESION CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS DE SU-8	48
ENSAYOS DE FLUJO EN MICRODISPOSITIVOS	49

MICROSCOPIA Y ANALISIS DE IMAGEN	50
ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....	50
RESULTADOS	51
SIEMBRA Y CULTIVO CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS DE SU-8.....	51
ADHESION CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS DE SU-8	51
MONOCAPA ENDOTELIAL A FLUJO EN MICRODISPOSITIVOS DE SU-8.....	60
DISCUSION.....	61
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	66
CAPÍTULO 2. DESARROLLO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR EN ELASTOMEROS TERMOPLÁSTICOS BLANDOS E INTEGRACION EN UN ENCAPSULADO MULTIESCALA DE CONEXIÓN A SISTEMAS FLUÍDICOS LIBRE DE BURBUJAS.....	
INTRODUCCIÓN	69
OBJETIVOS.....	73
MATERIAL Y MÉTODOS	74
DISEÑO DE UN ENCAPSULADO DESECHABLE PARA CULTIVO CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS.....	74
PROTOCOLO DE CONEXIÓN ENTRE ELEMENTOS FLUÍDICOS Y MICRODISPOSITIVO MEDIADO POR ENCAPSULADO LIBRE DE BURBUJAS.	81
PROTOCOLO DE PURGA Y CONEXIÓN ENTRE CIRCUITO FLUÍDICO Y MICRODISPOSITIVO MEDIADO POR ENCAPSULADO LIBRE DE BURBUJAS.....	82
FABRICACIÓN DEL ENCAPSULADO	84
DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL MICROPOSITIVO DE FLEXDYM/CICLOOLEFIN COPOLÍMERO E INTEGRACION EN EL ENCAPSULADO.....	84
TEST DE PRESIÓN PARA DETERMINAR LA FORTALEZA DE UNIÓN COC/FLEXDYM/POLIESTIRENO	86
TIPOS CELULARES, MEDIOS DE CULTIVO Y CULTIVO CELULAR	87
SIEMBRA, CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE FLUJO EN MICRODISPOSITIVOS	87
VIABILIDAD CELULAR EN LOS MICRODISPOSITIVOS Y MARCAJE CELULAR.....	89
MICROSCOPÍA Y ANÁLISIS DE IMAGEN	90
RESULTADOS	90
FABRICACIÓN DE LOS MICRODISPOSITIVOS, INYECCIÓN DE LOS ENCAPSULADOS E INTEGRACION MICRODISPOSITIVO/ENCAPSULADO	90
FORTALEZA DE UNIÓN ENTRE LAS INTERFASES COC/FLEXDYM™/POLIESTIRENO.....	92
FIABILIDAD DE LA INTEGRACIÓN DEL FLEXDYM™ EN EL CONJUNTO MICRODISPOSITIVO/ENCAPSULADO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL.....	93
CULTIVO Y ESTIMULACIÓN MECÁNICA POR PASO DE UN FLUÍDO SOBRE LAS CÉLULAS RENALES LLC-PK1 EN EL CONJUNTO MICRODISPOSITIVO/ENCAPSULADO	95
DISCUSION.....	98

CONCLUSIONES	104
CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE UN SISTEMA MULTIESCALA DE CONEXIÓN LIBRE DE BURBUJAS A UN CIRCUITO FLUÍDICO E INTEGRABLE EN DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR DESARROLLADOS EN ELASTOMEROS TERMOPLÁSTICOS BLANDOS.....	107
INTRODUCCIÓN	108
OBJETIVOS	109
MATERIAL Y METODOS	110
DISEÑO DE UN INTERFAZ DE CONEXIÓN FLUÍDICA MULTIESCALA E INTEGRACIÓN EN MICRODISPOSITIVOS	110
INTEGRACIÓN DE LAS INTERFACES DE CONEXIÓN EN MICRODISPOSITIVOS DE INYECCIÓN	115
PROTOCOLO DE CONEXIÓN ENTRE ELEMENTOS FLUÍDICOS Y MICRODISPOSITIVO LIBRE DE BURBUJAS.....	116
PROTOCOLO DE PURGA Y CONEXIÓN ENTRE CIRCUITO FLUÍDICO Y MICRODISPOSITIVO LIBRE DE BURBUJAS.....	118
INYECCIÓN DE ELEMENTOS MICROESTRUCTURADOS EN COP	120
FABRICACIÓN DEL MICROPOSITIVO DE COP/FLEXDYM™	121
TEST DE PRESIÓN PARA DETERMINAR LA FORTALEZA DE UNIÓN CUERPO MICROESTRUCTURADO DE COC/LÁMINA DE FLEXDYM™	122
TIPOS CELULARES, MEDIOS DE CULTIVO Y CULTIVO CELULAR	123
ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR PRESTO® BLUE DE CACO2 EN DISCOS DE FLEXDYM™	123
SIEMBRA, CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE FLUJO EN MICRODISPOSITIVOS	125
MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN	126
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	127
RESULTADOS	127
VIABILIDAD DEL FLEXDYM™ COMO SUSTRATO DE CULTIVO PARA CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON CACO2	127
INYECCIÓN DEL CUERPO MICROESTRUCTURADO DE LOS MICRODISPOSITIVOS Y FABRICACIÓN DE LOS MICRODISPOSITIVOS	129
FORTALEZA DE UNIÓN ENTRE LAS INTERFASES COC/FLEXDYM™ EN EL MICRODISPOSITIVO	130
FIABILIDAD DE LA INTERFAZ DE CONEXIÓN FLUÍDICA Y MICRODISPOSITIVO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL.....	131
CULTIVO Y ESTIMULACIÓN MECÁNICA POR EL PASO DE UN FLUÍDO DE LAS CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON CACO2 EN EL MICRODISPOSITIVO	133
DISCUSIÓN.....	135
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	139
CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UN BIORREACTOR MULTIESCALA PARA LA PRESERVACIÓN EX VIVO DE MUESTRAS DERIVADAS DE BIOPSIAS DE CARCINOMA COLORECTAL.....	142

INTRODUCCIÓN	143
OBJETIVOS	146
MATERIAL Y METODOS	146
DISEÑO DEL BIORREACTOR MICROFLUÍDICO Y FABRICACIÓN.....	146
CULTIVO CELULAR	149
CULTIVO 3D DE CELULAS TUMORALES HCT 116-GFP A ALTA DENSIDAD COMO MODELO TUMORAL.....	149
PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS DE CARCINOMA COLORECTAL	150
MANTENIMIENTO DE BIOPSIAS/MODELOS TUMORALES EN BIORREACTOR A PERFUSIÓN	151
DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CULTIVOS 3D DE HCT 116-GFP ...	153
PROCESAMIENTO HISTOLOGICO DE LAS BIOPSIAS DE COLÓN Y TINCIÓN CON HEMATOXILINA / EOSINA.....	153
IMMUNOFUORESCENCIA Y MARCAJE FLUORESCENTE	154
MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN	154
ANÁLISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS.....	155
RESULTADOS	155
MANTENIMIENTO EN BIORREACTOR DE CULTIVOS 3D DE HCT 116-GFP A ALTA DENSIDAD COMO MODELOS DE TUMOR.....	155
EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL BIORREACTOR COMO SISTEMA FLUÍDICO PARA EL MANTENIMIENTO EX VIVO DE BIOPSIAS DE TUMOR.....	156
MANTENIMIENTO DE LA DENSIDAD CELULAR DE BIOPSIAS DE TUMOR EX VIVO EN BIORREACTOR	158
MANTENIMIENTO DE LA HETEROGENEIDAD CELULAR EN BIOPSIAS DE TUMOR EX VIVO EN BIORREACTOR	159
DISCUSION.....	162
CONCLUSIONES	167
CONCLUSIONES	170
BIBLIOGRAFÍA.....	176

LISTADO DE FIGURAS

Figura I.1. Diferencias entre la interacción celular en microambientes 2D y 3D.

Figura I.2. Modelos y técnicas de cultivo 3D.

Figura I.3. Modelos microfluídicos para simular la fisiología endotelial.

Figura I.4. Reconstrucción de la estructura alveolar a través de la combinación de técnicas microfluídica con técnicas de microfabricación.

Figura 1.1. Composición química de diversos polímeros empleados en la fabricación de dispositivos microfluídicos y de cultivo celular.

Figura 1.2. Fabricación de dispositivos microfluídicos en SU-8.

Figura 1.3. Encapsulado para la conexión de dispositivos microfluídicos de SU-8 a un circuito fluídico externo.

Figura 1.4. Diagrama de bloques mostrando la posición relativa de los distintos componentes del circuito fluídico entre sí.

Figura 1.5. Adhesión y viabilidad celular de preosteoblastos MC3T3 en microdispositivos de SU-8.

Figura 1.6. Adhesión y viabilidad celular de células epiteliales renales en microdispositivos de SU-8.

Figura 1.7. Análisis de la morfología celular durante la adhesión de preosteoblastos MC3T3 en microdispositivos de SU-8.

Figura 1.8. Análisis de la morfología celular durante la adhesión de células epiteliales renales LLC-PK1 en microdispositivos de SU-8.

Figura 1.9. Monocapa de HUVEC a flujo en microdispositivos de SU-8.

Figura 2.1. Estructura elastómero termoplástico blando.

Figura 2.2. Burbujas en dispositivos microfluídicos dedicados a cultivo celular.

Figura 2.3. Renderizado de las distintas piezas del encapsulado.

Figura 2.4. Esquema gráfico del protocolo de conexión entre elementos fluídicos y microdispositivo mediado por encapsulado libre de burbujas

Figura 2.5. Esquema gráfico del protocolo de purga y conexión entre circuito fluídico y microdispositivo mediado por encapsulado libre de burbujas.

Figura 2.6. Esquema de fabricación del microdispositivo Flexdym™/COC e integración con el encapsulado.

Figura 2.7. Fabricación del encapsulado e integración microdispositivo/encapsulado.

Figura 2.8. Test de presión para evaluar la fortaleza de unión entre las interfases COC/Flexdym™/poliestireno.

Figura 2.9. Evaluación experimental del comportamiento del conjunto microdispositivo/encapsulado.

Figura 2.10. Cultivo y estimulación mecánica de las células del epitelio renal LLC-PK1 en el conjunto microdispositivo/encapsulado.

Figura 3.1. Renderizado del diseño de la interfaz de conexión fluídica integrable en el microdispositivo.

Figura 3.2. Integración de la interfaz de conexión fluídica libre de burbujas en distintos modelos de dispositivos microfluídicos.

Figura 3.3. Renderizado del microdispositivo de inyección de tres canales integrando las interfaces de conexión independientes para cada canal en el microdispositivo.

Figura 3.4. Esquema gráfico del protocolo de conexión entre elementos fluídicos y microdispositivo a través de la interfaz de conexión integrada en el microdispositivo.

Figura 3.5. Esquema gráfico del protocolo de purga y conexión entre circuito fluídico y microdispositivo a través de la interfaz de conexión integrada en el microdispositivo.

Figura 3.6. Esquema de fabricación del microdispositivo Flexdym™/COP.

Figura 3.7. Viabilidad del Flexdym™ como sustrato de cultivo para Caco2.

Figura 3.8. Fabricación del microdispositivo de inyección de tres canales con interfaces de conexión libres de burbujas acopladas.

Figura 3.9. Test de presión para evaluar la fortaleza de unión de la interfase COC/Flexdym™.

Figura 3.10. Evaluación experimental del comportamiento del microdispositivo y de las interfaces de conexión fluídicas integradas en este.

Figura 3.10. Evaluación experimental del comportamiento del microdispositivo y de las interfaces de conexión fluídicas integradas en este.

Figura 4.1. El microambiente tumoral.

Figura 4.2. Diseño del biorreactor para la preservación de biopsias tumorales ex vivo.

Figura 4.3. Mantenimiento en biorreactor de cultivos 3D, en colágeno, de células de carcinoma colorrectal HCT 116-GFP a alta densidad celular como simulacros de biopsias de tumor.

Figura 4.4. Evaluación experimental del comportamiento del biorreactor.

Figura 4.5. Tinción de eosina/hematoxilina de cortes histológicos de muestras derivadas de biopsias de tumor.

Figura 4.6. Mantenimiento de la heterogeneidad celular en las muestras conservadas ex vivo en biorreactor y en estático.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Condiciones del tratamiento por plasma de oxígeno para la activación superficial de los microdispositivos de SU-8 para favorecer la adhesión celular en estos.

Tabla 2.1 Condiciones del tratamiento por plasma de oxígeno para la activación superficial de termoplásticos poliméricos (COP).

Tabla 2.2. Estudios in vitro del impacto de τ sobre el citoesqueleto de actina de distintos tipos celulares renales.

Tabla 3.1 Condiciones del tratamiento por plasma de oxígeno para la activación superficial de termoplásticos poliméricos (COP) y elastómeros termoplásticos blandos (Flexdym™)

LISTADO DE ABREVIATURAS

PDMS:	Polidimetilsiloxano
Ultravioleta:	UV
DMEM:	Medio Modificado Eagle de Dubelcco
FBS:	Suero Fetal Bovino
PEN/STR:	Mezcla de antibioticos Penicilina/Estreptomicina
α MEM:	Medio Mínimo Esencial Alfa
EMB-2:	Medio Basal Endotelial-2
EGM-2:	Medio completo de crecimiento endotelial
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial Vascular
RhEGF:	Factor de Crecimiento Epidermal Recombinante
rhFGF-B:	Factor de Crecimiento Fibroblastico Recombinante Humano B
R ³ -IGF-1:	Factor de Crecimiento Recombinante Humano Insulinico-1 o R ³ -IGF-1
HUVEC:	Células humanas endoteliales de vena de cordón umbilical
PBS:	Tampón fosfato salino
EDTA:	cido etilendiaminotetraacético
DMSO:	Dimetilsulfóxido
PS:	Poliestireno
PMMA:	Polimetilmetacrilato
COC:	Cicloolefin coplmero
COP:	Ciclolefin polimerico
PVC:	Policloruro de Vinilo
ETB:	Elastomero Termoplástico Blando
TRITC:	Isocianato de tetrametilrodamina-B
CAM:	Calceina AM
PI:	Ioduro de propidio
HEPES:	cido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfonico

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MOTIVACIÓN

El cultivo de células de mamífero en el laboratorio, definido como el conjunto de metodologías y técnicas que permiten el mantenimiento y/o proliferación de células *in vitro* bajo condiciones controladas (REF), es un pilar básico en investigación en las denominadas ciencias de la vida. Esta tecnología está considerada una técnica rutinaria y ubicuamente distribuida en los laboratorios biomédicos, que con seguridad estará siendo empleada en este mismo instante por miles de investigadores en todo el mundo. Como pilar básico que constituye de la investigación biomédica, sobre el uso de esta técnica se asientan muchos de los avances obtenidos desde la segunda mitad del siglo XX en este campo. Sin embargo, resulta llamativo que pese a la revolución que supuso la introducción del mantenimiento de células *in vitro*, las metodologías y técnicas de cultivo hayan evolucionado relativamente poco desde su estandarización. Esta carencia en el desarrollo e innovación ha llevado en algunos casos al límite a esta técnica, sobre todo en cuanto a prospectiva terapéutica en el descubrimiento de nuevos fármacos, al ser incapaz de incorporar la complejidad de los sistemas biológicos (Jaroch et al. 2018). Esto hace necesario el desarrollo de sistemas *in vitro* predictivos de la respuesta celular *in vivo* (Huh et al. 2011). En especial, como se ha señalado con anterioridad, en el campo del desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos. Donde muchos candidatos terapéuticos son descartados en las fases de investigación clínica debido principalmente a una deficiente acción terapéutica o toxicidad, que los modelos clásicos de cultivo fueron incapaces de anticipar durante las fases preclínicas del desarrollo (Astashkina et al. 2012).

Los sistemas microfluídicos aplicados al cultivo celular permiten recrear de forma precisa las condiciones del entorno celular que rigen la respuesta de las células en la misma escala física en la que tienen lugar estos eventos, la microescala (Young y Beebe 2010). Esto ha permitido generar modelos de cultivo microfluídicos capaces de simular *in vivo* respuestas fisiológicas, dando lugar a la recreación de tejidos y órganos virtuales *in vitro*. Sin embargo, la difusión de estas técnicas es muy limitada. Debido principalmente a la especialización requerida para el diseño, fabricación, manejo e interpretación de resultados en sistemas microfluídicos. Esto hace necesario un esfuerzo en el desarrollo de técnicas y metodologías que permitan “democratizar”, haciendo más accesibles, el uso de sistemas microfluídicos en el campo de la investigación biomédica.

El objetivo de este trabajo es el desarrollar sistemas microfluídicos híbridos que permitan aprovechar las ventajas aportadas por los sistemas microfluídicos a través de sistemas de traducción de escalas que permitan el uso de elementos de cultivo tradicionales y/o muestras biológicas complejas en la macroescala. Empleando nuevos materiales y técnicas que permitieran una fabricación simplificada de los dispositivos microfluídicos o su industrialización en termoplásticos, material favorecido por la industria para la fabricación de elementos desechables de cultivo celular.

1.2 TÉCNICAS DE CULTIVO TRADICIONAL: EL CULTIVO BIDIMENSIONAL

1.2.1 EL DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS ADHERENTES

El cultivo de células de mamífero *in vitro* derivó a partir de las técnicas desarrolladas de cultivo de tejidos desarrolladas a partir del trabajo de en las últimas décadas del siglo XIX y principios del XX. Cuyo fin era el de mantener *in vitro* secciones de tejido con el fin de desarrollar modelos que permitieran avanzar en el estudio del comportamiento y biología del desarrollo de los organismos. Los primeros cultivos celulares derivados a partir de los explantes en cultivo, se denominaron cultivos primarios. Siendo cultivos mixtos, formados por distintas poblaciones celulares presentes en los tejidos en cultivo, con una capacidad limitada de mantenimiento y replicación y, sujetos a variaciones en la composición celular del cultivo al predominar un tipo celular sobre los otros con el tiempo. Estas células representan fidedignamente el comportamiento y expresión de las células del tejido original dependiendo de las técnicas de cultivo empleadas.

Sin embargo no fue hasta 1943 cuando Earle (Earle et al. 1943) describió el primer método para la obtención y mantenimiento de una estirpe inmortalizada de fibroblastos de ratón derivados de tejido subcutáneo. Y tras poco más de una década, en 1956 (Puck y Fisher 1956), se obtuvieron las primeras células inmortalizadas humanas HeLa, derivada de un cáncer cérvico-uterino. Las células inmortalizadas o líneas celulares, que pueden ser obtenidas en laboratorio o derivadas a partir de células tumorales, son virtualmente capaces de proliferar de manera indefinida al ser mantenidas en cultivo. Lo que permitió eliminar la constante necesidad de tejidos y permitió la estandarización de modelos celulares en investigación. Sin embargo, las mutaciones y cambios que sufren las líneas celulares para su inmortalización y cultivo las distancia en comportamiento de las células del tejido original.

El desarrollo de las primeras líneas celulares llevo al desarrollo a lo largo de las décadas de 1950 y 1960 de las técnicas para el escalado del mantenimiento de los cultivos celulares. Introduciéndose las técnicas de enzimáticas (tripsinización) que permitieron el subcultivo de células adheridas de un frasco de cultivo a otros para permitir su expansión (Dulbecco, et al 1954), métodos de criopreservación para la preservación en el tiempo de las líneas celulares establecidas o el desarrollo de formulaciones de medios de cultivo para el mantenimiento de líneas celulares que siguen empleándose hoy en día. Paralelo al desarrollo de estas técnicas fueron el desarrollo de los primeros reactores de cultivo para automatizar y escalar el cultivo celular (Kruse Jr. 1972), así como el desarrollo de los primeros frascos y placas de cultivo en poliestireno (Amstein y Hartman 1975). Lo que supuso una revolución que permitió sustituir el material de vidrio reutilizable empleado con anterioridad por el uso de termoplásticos desechables.

La introducción del cultivo celular no solo supuso una revolución a nivel de investigación, como ejemplos de la aplicación del cultivo celular más allá de un modelo experimentales *in vitro* de laboratorio cabe destacar el enorme impacto que el cultivo celular tuvo en el desarrollo de las primeras vacunas víricas con virus atenuados. Donde los cultivos

celulares se emplearon como base para la producción de partículas víricas de manera más segura que otros modelos empleados tradicionalmente. Lo que permitió el desarrollo de vacunas contra la polio, la vacuna de Salk, o el virus de la rabia. El avance de las técnicas de cultivo celular y biología molecular permitió durante la década de 1980 el desarrollo de sistemas de producción proteicos celulares empleados para la síntesis de interferón, o de los hibridomas para la síntesis de anticuerpos. Lo que abrió nuevas vías terapéuticas contra infecciones víricas, enfermedades autoinmunes o cáncer.

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, tales como la terapia celular (Roybal 2018), que permite la reprogramación y/o edición genética de células del paciente, o la ingeniería de tejidos (Raya-Rivera et al. 2014), cuya finalidad es la de reparar y mejorar funciones biológicas, requieren del cultivo y mantenimiento tradicional de células durante parte del proceso. Lo que ilustra el peso que, aun a días de hoy, aportan las técnicas de cultivo celulares tradicionales en el desarrollo de nuevos conocimientos y aplicaciones en biomedicina.

1.2.2 CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS ADHERENTES BIDIMENSIONALES Y SUS LIMITACIONES

Tradicionalmente el cultivo celular se ha llevado a cabo en estático con recambios periódicos de medio para el mantenimiento celular. Las células en cultivo crecen en placas y frascos de cultivo, originalmente fabricadas en vidrio y sustituidas después por termoplásticos como el poliestireno. Siendo el uso del poliestireno tan extendido que ha llegado a considerarse como material estándar para el cultivo celular (Lerman et al. 2018). Las superficies de las placas y frascos de cultivo ofrecen soporte físico a las células para su adhesión y sobre estas las células proliferan con un idéntico acceso a los nutrientes y factores de crecimiento presentes en el medio. Esto permite un crecimiento homogéneo a lo largo de la superficie de cultivo (Edmondson et al. 2014), generando monocapas compuestas de células en crecimiento, ya que las células necróticas se despegan de la superficie de cultivo y son retiradas del cultivo en los recambios de medio.

El cultivo de células adherentes es una técnica sencilla, con un coste económico relativamente bajo y fácilmente escalable. Estas características, combinadas con la enorme cantidad de información obtenida a lo largo de décadas de uso de esta técnica, lo convierten en el modelo más común de cultivo celular empleado en investigación biomédica (Duval et al. 2017b). Sin embargo, es muy difícil extrapolar la complejidad del microambiente celular, definido como el conjunto dinámico de poblaciones celulares, factores solubles que rigen la comunicación y proliferación celular, glicoproteínas de la matriz extracelular y factores físicos, químicos y mecánicos que dictan el comportamiento de un tipo celulares en un tejido (Schmeichel et al. 1998), a la sencillez del modelo proporcionado por el cultivo en monocapa de un tipo celular sobre un soporte plástico. Como ejemplo de esta disparidad, la propia morfología celular en el cultivo bidimensional viene definida por el sustrato de adhesión a través de su composición química, rigidez, rugosidad, presencia de proteínas de la matriz

extracelular, etc. La ausencia de estos factores aleja la morfología de las células en cultivo bidimensional a la de las células en su nicho fisiológico original. Esto limita la funcionalidad celular al carecer de los estímulos matriz extracelular-célula y célula-célula que del microambiente celular que, como en el caso de los hepatocitos, define la polaridad celular y por lo tanto su actividad biológica (Roskelley et al. 1995)

Para tratar de mitigar esta falta de jerarquía en la organización de las células bidimensionales se desarrollaron sistemas híbridos de cultivo bidimensional que tratan simular la composición del sustrato celular fisiológico y/o su estructura. En el caso de los hepatocitos citado anteriormente, el cultivo bidimensional de estos se realiza comúnmente cubriendo la superficie de cultivo de una fina capa o gel de colágeno que facilite la adhesión de los mismos. Sin embargo, la viabilidad, polaridad celular y otras cualidades diferenciales de los hepatocitos cae rápidamente con el tiempo. El cultivo de los hepatocitos entre dos capas de matriz extracelular una basal y otra apical, en un formato denominado de cultivo en sándwich, preserva la funcionalidad biológica de los mismos, incrementando por ejemplo la síntesis de albumina por periodos de hasta 6 semanas comparados con los cultivos bidimensionales (Dunn et al. 2002). El cultivo en sándwich de los hepatocitos no solo permite el mantenimiento de sus cualidades diferenciales, sino que además las células establecen interacciones célula-célula que les permiten recrear estructuras tales como los canalículos biliares (LeCluyse et al. 1994). De igual manera, el control de la rigidez del sustrato en cultivos bidimensionales permitió la diferenciación de células madre mesenquimales a fenotipos neurogénicos, miogénicos u osteogénicos (Engler et al. 2006) señalando la importancia de la naturaleza no sólo química sino también física y mecánica del sustrato.

Esta disparidad de comportamiento limita la capacidad prospectiva del modelo de cultivo bidimensional en el desarrollo de nuevos fármacos al presentar unos niveles de eficacia y toxicidad durante las fases experimentales que resultan inaceptables al trasladarse a las fases clínicas (Verjans et al. 2017). Lo que ha llevado al desarrollo de nuevos métodos y técnicas que tratan de generar modelos de cultivo celular *in vitro* más próximos al comportamiento celular definido por el microambiente celular.

1.3 NUEVAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR: EL CULTIVO TRIDIMENSIONAL

1.3.1 EL CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL

Con el objeto de sobrepasar las limitaciones del modelo tradicional de cultivo bidimensional y generar modelos de cultivo más fidedignos y prospectivos, se introdujeron los modelos de cultivo tridimensionales. Ampliando las dimensiones del cultivo celular del 2D, o 2,5D de los modelos de cultivo en sándwich, hacia la tridimensionalidad propia de los tejidos y que forma parte del microambiente celular. El potencial impacto de la expansión hacia la tercera dimensión buscando la polarización, y por lo tanto una mayor diferenciación, celular se demostró con la reversión del fenotipo tumoral de células primarias de cáncer de mama hacia uno normalizado al ser crecidas en un ambiente 3D (Petersen et al. 1992), así como la demostración de la

importancia de las interacciones entre integrinas y matriz extracelular en un ambiente 3D en al revertir el fenotipo tumoral de líneas derivadas de tumores de mama (Weaver et al. 1997). El beneficio obtenido del cultivo tridimensional pronto se trasladó hacia el campo de la biología del desarrollo e ingeniería de tejidos, al observarse como en cultivo tridimensional células madre embrionarias de ratón podían diferenciarse efectivamente hacia condrocitos al generarse interacciones célula-célula y célula-matriz similares a las producidas en las condensaciones pre-cartilaginosas observadas durante el desarrollo embrionario comparadas con las células en cultivo bidimensional (Tanaka et al. 2004).

Estas observaciones mostraron las diferencias de comportamiento entre el cultivo tradicional en 2D y el emergente cultivo 3D. En donde las células eran capaces de establecer interacciones complejas entre sí y con los elementos de la matriz extracelular donde las moléculas y receptores de adhesión se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo de la superficie celular (Cukierman et al. 2002) al contrario que en los cultivos 2D donde se concentran en la zona de unión al sustrato (Maria et al. 2007) (figura I.1). Esto permite generar modelos de cultivo celular más representativos de las condiciones del microambiente celular, motivando el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo celular. Así como la búsqueda de nuevos materiales que permitiesen recrear la compleja organización celular de los tejidos.

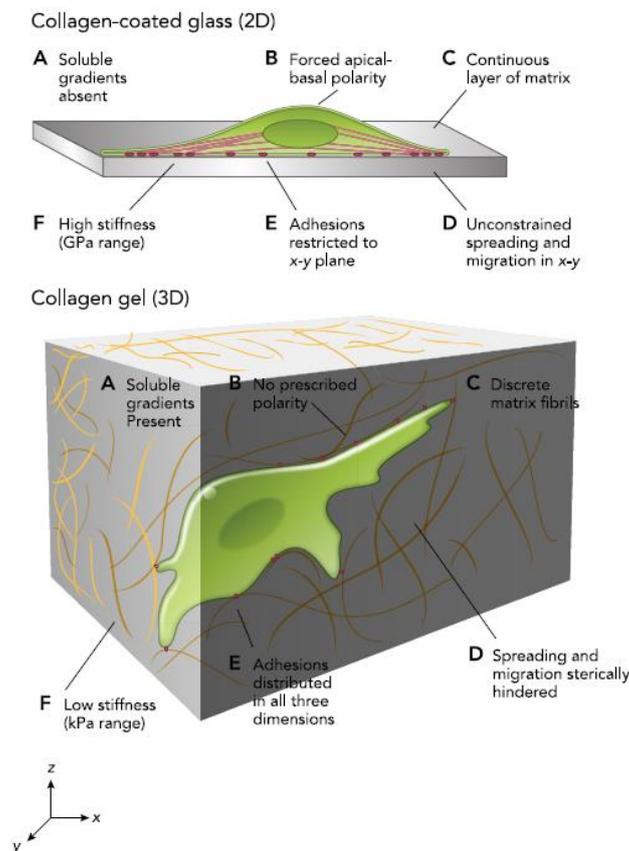


Figura I.1. Diferencias entre la interacción celular en microambientes 2D y 3D. Las diferencias de entorno modulan las señales que recibe la célula de este. Reproducido de Duval et al.2017

1.3.2 MODELOS Y TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL

Los modelos de cultivo tridimensionales buscan representar *in vitro* la funcionalidad y respuesta de las células en su nicho fisiológico. Con esta finalidad se han desarrollado múltiples metodologías y técnicas de cultivo para la generación de cultivos 3D, que permitieran recrear parte de los estímulos y condiciones bioquímicas y mecánicas del microambiente celular que modulan la respuesta celular.

El modelo más sencillo de cultivo 3D es el generado por las propias células cuando se crecen en ausencia de un sustrato de adhesión en condiciones que favorecen la agregación de las células, lo que les permite establecer uniones célula-célula, secretar matriz para generar interacciones célula-matriz y auto-organizarse en estructuras 3D denominados esferoides. Los esferoides al mantenerse en cultivo desarrollan distintas capas: 1) una externa formada por células proliferativas asíncronas con libre acceso a los nutrientes y oxígeno presentes en el medio, 2) una intermedia formada por células quiescentes sin actividad proliferativa y una actividad metabólica mermada con respecto a las células de la capa externa del esferoide, coincidiendo con el acceso limitado por difusión a través de la capa externa al oxígeno y nutrientes, y finalmente 3) la capa más interna formada por células necróticas sin acceso a nutrientes (Cui, et al 2017) (figura I.2.a)). Esta disposición en capas con acceso decreciente a nutrientes y oxígeno recrea la organización estructural de un tumor no vascularizado (Verjans et al. 2017). El uso de esferoides permitió demostrar el cambio de sensibilidad de células tumorales en función del tipo de metodología empleada en el cultivo en monocapa (2D) o en esferoide (3D), siendo los esferoides más resistentes al fármaco antitumoral 5-Fluorouracilo, el cual inhibe la proliferación celular, que las células en monocapa debido a la mayor proliferación del cultivo en 2D. Mientras que al tratar los cultivos con Tirapazamina, un fármaco tóxico en condiciones de hipoxia, los cultivo en placa fueron más resistentes al tratamiento que los esferoides debido a la ausencia de la organización 3D de estos últimos (Tung et al. 2011).

Según el tamaño y la complejidad del modelo 3D de cultivo aumenta, es necesario la introducción de un elemento de soporte o andamio. Ya que a partir de anchuras de agregado celular superiores a 1-2 mm, la zona necrótica ocupa la mayoría del volumen del agregado celular (Pampaloni et al. 2007). Debido a la ausencia de mecanismos activos que permitan la llegada de nutrientes al interior del agregado y la retirada de desechos metabólicos del mismo. Con objeto de evitar este problema se han desarrollado andamios porosos que permitan el desarrollo del cultivo celular 3D más allá de la escala de los esferoides. Dentro de los distintos tipos de andamiaje desarrollado para el cultivo 3D podemos destacar los formados por biopolímeros tanto de origen animal como vegetal. El uso de estos andamios permite determinar el papel de la matriz extracelular y la biomecánica en el desarrollo y comportamiento celular. Andamios derivados de polímeros de origen animal como el colágeno, ácido hialurónico o el sulfato de condroitina han permitido la diferenciación celular orientada hacia la regeneración de cartílago (Tamaddon et al. 2017) (figura I.2.b)), hueso (Calabrese et al.

2016) o piel (O'Brien 2011). Estos modelos de andamio son eficaces a la hora de recrear matrices extracelulares de un solo componente, pero fallan a la hora de recrear matrices extracelulares complejas, con distintas proporciones de proteínas de la matriz en función de la zona y función del tejido como, por ejemplo, en el caso del tejido hepático.

Una ingeniosa manera de resolver el problema de recrear la composición de la matriz de órganos con matrices complejas fue el uso de andamios derivados a partir de órganos descelularizados (Badylak 2002). Esto, permite recrear no solo la complejidad de componentes de la matriz sino también la estructura y topografía en la micro y nanoescala asociada a esta (Gilpin y Yang, 2017)

Estas características de los andamios generados a partir de tejidos descelularizados, ha permitido *in vitro* la recelularización dirigida en función a la posición original en el hígado de células hepáticas, endoteliales y biliares (Baptista et al. 2011) (figura I.2.c)) . En el que las células, inyectadas a través del árbol vascular del órgano, acabaron ocupando las posiciones que normalmente ocuparían en el órgano.

Una alternativa al uso de andamios para la creación de cultivos 3D es el uso de hidrogeles derivados de proteínas de la matriz extracelular tales como el colágeno, fibronectina, laminina o matrices complejas derivadas de células tumorales productoras de matriz como el Matrigel™. Estos hidrogeles, contienen un contenido acuoso similar al encontrado en tejidos y pueden estar enriquecidos en componentes bioactivos que promueven la proliferación y diferenciación celular del cultivo (KleinmanyMartin 2005). Siendo relativamente fáciles de preparar *in situ*, manipular y permitiendo la encapsulación directa de las células durante la polimerización del hidrogel. Al contrario que los andamiajes discutidos anteriormente. Los hidrogeles carecen de una estructura definida siendo mallas de proteicas entrecruzadas. Por un lado, esto permite el estudio de la remodelación de la matriz durante el desarrollo del tejido, pero por otro los hidrogeles carecen de motivos estructurales organizativos necesarios para el control de la morfología celular presentes en algunos andamios (Duval et al. 2017). Sin embargo, una interesante ventaja de los hidrogeles con respecto a los andamios es la capacidad de modular de forma sencilla las propiedades mecánicas y bioquímicas de los hidrogeles alterando la concentración y composición de las proteínas de matriz empleadas o, a través de la adición de polímeros sintéticos a la mezcla. El uso de esta aproximación, permitió modular la expresión génica de células madre obtenidas de tejido adiposo hacia un fenotipo osteogénico variando únicamente los parámetros anteriormente mencionados (Nii et al. 2013) (figura I.2.d)) .

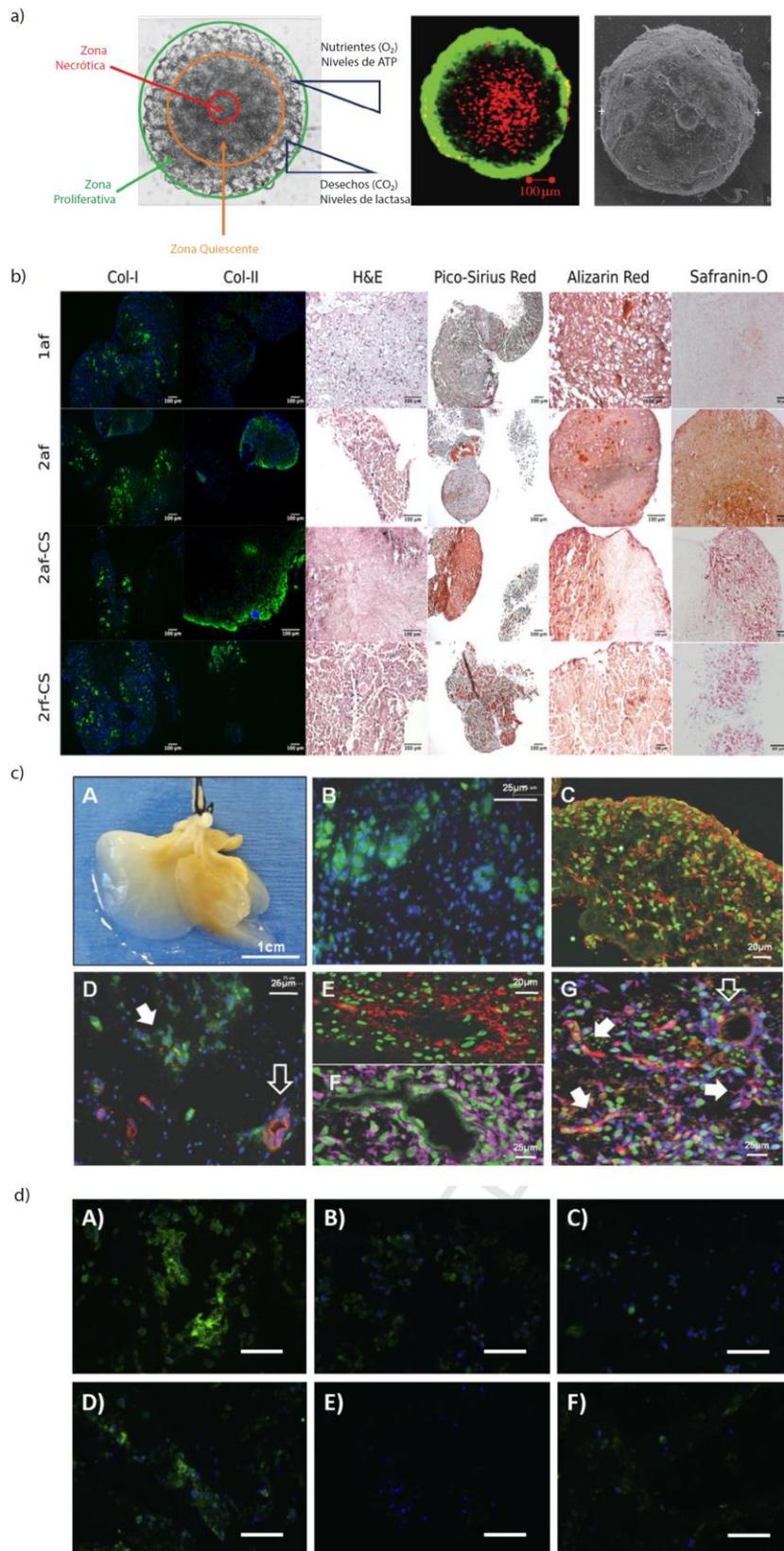


Figura 1.2. Modelos y técnicas de cultivo 3D. a) Esferoides multicelulares mostrando las distintas capas en las que se organizan. Adaptado de Cui et al. 2017 b) Andamios de colágeno empleados para la diferenciación de células madre de médula ósea en precursores condriogénicos, los depósitos de proteoglicano aparecen teñidos en Safranina-O. Adaptado de Tamaddon et al. 2017. c) Andamio descelularizados de hígado, recolonizado posteriormente con células humanas fetales hepáticas y células endoteliales humanas de cordón umbilical. Adaptado de Baptista et al. 2011. d) Hidrogeles. El uso de hidrogeles de distintas composiciones y rigideces permitió la diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo hacia un fenotipo osteogénico. Osteocalcina aparece en verde en las imágenes. Adaptado de Nii et al. 2013

1.3.3 LIMITACIONES DEL CULTIVO TRIDIMENSIONAL

A pesar de las evidentes ventajas que aportan los cultivos tridimensionales aportando un nivel de organización superior al del cultivo bidimensional y, por lo tanto, modelos experimentales más cercanos a la respuesta *in vivo* modulada por el microambiente celular. Los cultivos 3D presentan todavía una serie de limitaciones que necesitan ser superadas. Una de las principales limitaciones es la ausencia de una aproximación estandarizada al cultivo 3D (Duval et al. 2017). Mientras que los cultivos 2D son relativamente fáciles de comparar gracias a la estandarización de los métodos de cultivo y las décadas de resultados que ha generado y con los que permite contrastar, el cultivo 3D presenta una serie de variabilidades que limitan la reproducibilidad experimental entre modelos de cultivo 3D. Por ejemplo, en el caso de los esferoides el crecimiento del esferoide y por tanto del área necrótica son dependientes de las condiciones y técnicas empleadas para la generación de los mismos (Katt et al. 2016). En los andamios formados por biopolímeros la reproducibilidad entre lotes es limitada lo que puede conducir diferencias significativas entre replicas, requiriendo de técnicas alternativas de fabricación para reducir esta variabilidad (Wang et al. 2018). Mientras que en los andamios generados a partir de matrices de órganos descelularizados, la potencial pérdida de parte de las proteínas de la matriz durante el proceso de descelularización puede dar lugar a la pérdida de propiedades mecánicas del andamio con respecto al tejido original (Yanagawa et al. 2016).

La mayoría de las limitaciones, dependientes del tipo de técnica, son resultado de la relativa novedad, en comparación con las técnicas de cultivo 2D, de las metodologías de cultivo tridimensional desarrolladas y son susceptibles de ser corregidas según el desarrollo de las técnicas de cultivo tridimensional avancen. Generando, por ejemplo, soportes que permitan la homogeneización de los modelos 3D creados en el caso de los esferoides (Tung et al. 2011), o a través del desarrollo de técnicas que permitan el control de la polimerización (Pereira et al. 2018) y la definición estructuras o patrones en los andamios e hidrogeles que actúan como soporte del cultivo 3D (Hribar et al. 2015). Incorporando, además, un grado de automatización que permita la estandarización necesaria para homogeneizar la producción de los modelos tridimensionales (Billiet et al. 2012).

Más allá de las limitaciones técnicas propias de cada tipo de metodología para la creación de cultivos 3D, existen una serie de limitaciones intrínsecas al propio modelo de cultivo celular 3D (Tibbitt y Anseth 2009). Siendo el más crítico la disponibilidad de oxígeno, ya que los efectos difusivos del oxígeno a través de tejidos son inferiores a los 100 μm (Palsson y Bhatia 2004) en tejidos metabólicamente activos, lo que limita la capacidad proliferativa celular. Además, la presencia de defectos o heterogeneidades en los hidrogeles o andamios que ofrecen soporte a las células pueden desencadenar en la formación de gradientes de concentración, difícilmente controlables, que acentúan la heterogeneidad en la muestra. Por ejemplo, al limitar la distribución de factores de crecimiento o compuestos con actividad biológica a interrogar en el cultivo 3D.

Finalmente, las técnicas tradicionales empleadas para la observación microscópica celular o para el análisis de la función celular, proteica y genética ven limitada en el cultivo 3D debido al limitado acceso a las células. Por ejemplo, el entorno 3D de crecimiento limita el acceso de marcadores fluorescentes y anticuerpos a las células limitando la capacidad de unión a estas. Además, la dispersión de la luz en el gel por la presencia de células a distintos niveles en el gel complica la visualización por microscopía.

Tanto en el caso del cultivo 2D como en el caso del cultivo 3D, la mayoría de las limitaciones son derivadas de falta de grados de control (estructurales, mecánicos, bioquímicos, etc.) presentes en el microambiente celular que define el comportamiento de las células en su nicho fisiológico. Esto ha llevado al desarrollo de nuevas plataformas de cultivo *in vitro* que buscan generar respuestas prospectivas del comportamiento *in vivo* celular. A través del cultivo 2D y/o 3D bajo unas condiciones finamente controladas para recrear las propias del microambiente celular.

1.4 NUEVAS PLATAFORMAS DE CULTIVO CELULAR: MICROFLUÍDOS

1.4.1 MICROFLUÍDICA Y MICROFABRICACIÓN

Como se ha discutido con anterioridad, los modelos de cultivo, tanto 2D como 3D, deben la mayoría de sus limitaciones a la incapacidad de incorporar de forma controlada factores del microentorno tisular. La principal razón de esta discrepancia entre el modelo experimental y el microentorno es la diferencia de escala entre ambos. Mientras que los modelos de cultivo 2D y 3D se manipulan mayoritariamente en la macroescala. Los eventos que condicionan el comportamiento celular son muchas veces dependientes de modificaciones en el microambiente celular en una escala espaciotemporal completamente distinta, la microescala (Young y Beebe 2010). Por ejemplo, las células que crecen en monocapa carecen de los estímulos mecánicos aportados por la matriz extracelular que vía integrinas permiten la transmisión de estos estímulos al citoesqueleto celular (Janmey y McCulloch 2007). Pero también, carecen de los estímulos provenientes de los cambios mecánicos producidos por la circulación de fluidos sobre las células, generalmente bajo un régimen de flujo laminar asociado a la microescala, como en el caso del flujo de sangre sobre el endotelio. Que son transmitidos de célula a célula a través de las uniones vía cadherinas (Tzima et al. 2005). De igual manera, aunque los sistemas 3D aportan un nivel de conexión célula-célula y/o célula-matriz similares a los presentes en el microambiente celular. Estos son incapaces de generar de manera estable y controlada gradientes de compuestos solubles que van a definir el comportamiento celular. Siendo dependientes únicamente de la concentración de las especies en el medio de mantenimiento del cultivo y del papel de la difusión a través del modelo de cultivo 3D.

Con el fin de generar modelos de cultivo celular más precisos a la hora de incorporar las propiedades y detalles únicos del microambiente celular, en la última década se ha producido un importante avance en la recreación del microambiente celular a través de la aplicación combinada de dos técnicas, la microfluídica y la microfabricación. La

microfluídica se puede definir como la ciencia que permite la manipulación de pequeños volúmenes de líquido, en el rango de los microlitros a los nanolitros, en canales microfabricados, generalmente inferiores al milímetro en alguna de sus dimensiones (Huh et al. 2011). Lo que permite recrear las condiciones de flujo y difusión en una escala y condiciones próximas a la microescala celular. El desarrollo de dispositivos de microfluídica para cultivo celular se realizó paralelo al desarrollo de las técnicas de microfabricación y prototipado de microdispositivos. Las técnicas de microfabricación, desarrolladas inicialmente para la fabricación de sistemas microelectromecánicos en la industria de semiconductores, permiten la fabricación de elementos en un rango que varía desde la micra hasta el centímetro (Whitesides et al. 2001) con una elevada relación de aspecto (Aoun et al. 2014). Las técnicas de microfabricación fueron primero adaptadas a la fabricación con materiales compatibles con el cultivo celular y el desarrollo de prototipos de microfluídica. Integrándose, después, el uso de biomateriales para la fabricación de elementos microestructurados aplicables en ingeniería de tejidos (Khademhosseini et al. 2006). La combinación de ambas técnicas ha permitido generar sistemas microfluídicos de cultivo celular que permiten dotar al investigador de herramientas para la simulación y el control de las condiciones propias del microambiente celular. De una forma prácticamente imposible de alcanzar por modelos tradicionales de cultivo (Elfaki et al. 2017).

1.4.2 COMPORTAMIENTO FLUÍDICO EN LA MICROESCALA

Los sistemas microfluídicos de cultivo celular tratan de recrear parte de las condiciones del microambiente celular a través del comportamiento diferencial que tienen los fluidos en la microescala. Los fluidos al circular por los canales de los dispositivos microfluídicos poseen un comportamiento análogo al de los fluidos biológicos, como la sangre, linfa u orina, que circulan a través de vasos y conductos. El régimen de flujo de un fluido viene determinado a través del número de Reynolds (Re) que se calcula a través de la expresión:

$$Re = \frac{\rho v D_h}{\mu}$$

Donde ρ es la densidad del fluido, v es la velocidad característica del fluido, μ es la viscosidad del fluido y D_h es el diámetro hidráulico, que es función de la geometría de la sección del canal. Valores de Re inferiores a 2300 corresponden a regímenes de flujo laminar y valores mayores a 2300 corresponden a regímenes de flujo turbulento (Beebe et al. 2002). En el flujo turbulento el líquido se comporta de forma caótica y las partículas en el fluido se entrecruzan de forma aleatoria unas con otras formando pequeños remolinos, siendo el régimen de flujo más corriente en la macroescala. El flujo laminar al contrario es un flujo altamente ordenado, donde las partículas en el fluido no se entrecruzan, salvo por efecto de la difusión, viajando en líneas de flujo paralelas entre

sí. Siendo el régimen de flujo más común en la microescala de los dispositivos microfluídicos, debido al tamaño de los canales, así como en la mayoría de flujos fisiológicos.

Una de las consecuencias del flujo laminar en la microescala es la generación de perfiles definidos de tensión cortante (τ), que puede definirse como la fuerza tangencial que es aplicada en una superficie sólida que limita físicamente al fluido como resultado del desplazamiento del mismo. La tensión cortante puede representarse matemáticamente a partir de la ley de Newton de la viscosidad:

$$\tau = -\mu \frac{\partial v}{\partial x}$$

Donde τ representa la tensión cortante, μ la viscosidad del fluido, v la velocidad del fluido y x la posición en el canal. La mayoría de los canales microfluídicos tienen geometría rectangular, por lo que anterior expresión puede simplificarse a (VarmayVoldman 2015):

$$\tau = \frac{6\eta Q}{wh^2}$$

Donde τ representa la tensión cortante, η la viscosidad cinemática del fluido, Q el caudal, w la anchura de canal y h la altura. Esta expresión muestra la importancia de la altura, normalmente dimensión limitante, en el valor del módulo de la tensión cortante, donde pequeños cambios de la altura del canal incrementan el valor de esta. Esto tiene especial importancia en la presencia de burbujas en los canales de los microdispositivos que reducen la altura efectiva de los canales y pueden dañar el cultivo contenido en el microdispositivo. La tensión cortante juega un papel importante en la respuesta y desarrollo de distintos tipos celulares, siendo quizás el endotelial el más estudiado. La estimulación mecánica a través del paso de un fluido para este tipo celular es crítica, al requerir de esta estimulación debido al paso de un fluido para la activación y síntesis de factores de transcripción que modularan su desarrollo (Fang et al. 2014).

Debido a la naturaleza laminar de la mayoría de los flujos fisiológicos y a la escala física de los procesos que transcurren en el microambiente celular, los procesos de difusión juegan un importante papel en el cultivo celular en la microescala. La difusión, puede modelarse en una dimensión por la ecuación:

$$d^2 = 2Dt$$

Donde d es la distancia media de difusión para una partícula, D es el coeficiente de difusión y t el tiempo. Así, la difusión resulta el mecanismo dominante solo a largos periodos de tiempo o a distancias muy cortas, como es el caso de la microescala celular y en los dispositivos microfluídicos con al menos una dimensión inferior al milímetro. Esto permite generar gradientes de concentración estables en tiempos cortos en los microdispositivos gracias al efecto de la difusión, a partir del aporte continuado de medios con diferentes concentraciones que actúan alimentando esa diferencia de concentración. Lo que, por ejemplo, permite el estudio del impacto de la concentración de oxígeno en modelos microfluídicos que buscan simular el microambiente celular en tejidos en hipoxia o tumores (Orcheston-Findlay et al. 2018).

Otra diferencia significativa entre el comportamiento de los líquidos en la microescala y la macroescala es la tensión superficial. La tensión superficial es resultado de la cohesión de las moléculas de líquido en la interfase líquido aire. Esto se ha empleado con éxito para la generación de muros virtuales que permiten el confinamiento de líquidos e hidrogeles en los microdispositivos gracias a la tensión superficial en la interfase. El comportamiento de un líquido durante el llenado de un microdispositivo puede describirse a partir de la ecuación derivada de la ecuación de Young-Laplace (Huang et al. 2009):

$$\Delta P = -2\gamma \left(\frac{\cos\theta}{W} + \frac{\cos\theta}{H} \right)$$

Donde ΔP es la diferencia de presión entre la interfase aire/líquido, γ es la tensión superficial del fluido, θ es el ángulo del contacto entre el material del que está fabricado el microdispositivo y el líquido, W es la anchura del canal y H la altura. La ecuación pone de manifiesto la importancia entre la escala y geometría del microcanal y el ángulo de contacto entre el líquido y el material del microdispositivo a la hora de diseñar sistemas microfluídicos que permitan el confinamiento de líquidos gracias a la presencia de muros virtuales (Jose Maria Ayuso et al. 2015).

El comportamiento singular de los líquidos y disoluciones en la microescala es difícilmente reproducible en los sistemas macroscópicos de cultivo celular. La capacidad de los sistemas microfluídicos de cultivo celular de operar en la microescala supone un importante avance a la hora de introducir elementos del microambiente celular que solo son relevantes a esa escala pero que tienen un gran peso en el comportamiento celular. Esto, combinado con la capacidad de controlar estos procesos gracias a la implementación de diseños complejos microfluídicos a través de técnicas de microfabricación permite acercar aún más las técnicas de cultivo *in vitro* a las respuestas celulares *in vivo*.

1.4.3 APLICACIONES MICROFLUÍDICAS PARA CULTIVO CELULAR

El desarrollo de los sistemas microfluídicos dedicados al cultivo celular permiten recrear y controlar las condiciones experimentales en la microescala, aproximando los estímulos sobre los cultivos en los microdispositivos, tanto 2D como 3D, a los estímulos generados en el microambiente celular y que rigen el comportamiento celular. Esto, permite mejorar la relevancia fisiológica de las respuestas obtenidas de estos sistemas *in vitro*. Lo que ha motivado la creación de numerosas aplicaciones microfluídicas orientadas hacia el campo de la biología celular, que buscan no solo recrear condiciones ambientales del microentorno celular (tensión cortante, gradientes de concentración, etc.), sino también, a través de la integración de técnicas de microfabricación la recreación de estructuras fisiológicas relevantes para su estudio *in vitro* (Elfaki et al. 2017). La reproducción de estos factores en dispositivos de microfluídica permite no solo el control de estas condiciones sino también, la visualización de la respuesta celular *in vitro* en sistemas fácilmente adaptables a la inspección microscópica en una resolución difícilmente obtenible en los sistemas *in vivo* (Duncombe et al. 2015).

Un ejemplo del impacto del uso de dispositivos microfluídicos en la generación de modelos *in vitro* que reproducen eventos y estructuras fisiológicas han sido los modelos diseñados para el estudio del endotelio. El cual juega un papel crítico en procesos como la angiogénesis, intravasación y extravasación que afectan a la capacidad de un tumor de expandirse más allá de su foco de origen en un proceso denominado metástasis. Aprovechando la capacidad de generar gradientes estables y controlados en el tiempo en dispositivos microfluídicos, se sometió a células endoteliales a un gradiente del factor de crecimiento endotelial vascular permitiendo la observación de fenómenos de quimiotaxis y generación de pseudópodos. La formación de estos pseudópodos y migración celular es un proceso en dos pasos interrelacionado en donde, primero, se genera un gradiente de concentración en la superficie celular que induce la formación del pseudópodo, pero es necesario un gradiente continuado para que se produzca la localización del pseudópodo, polarización celular y finalmente migración, procesos críticos en el proceso de angiogénesis (Shamloo et al. 2008). En otro trabajo, la exposición continuada a la tensión cortante resultante del flujo laminar de medio sobre una monocapa de células endoteliales, permitió observar la transmisión de la tensión cortante al citoesqueleto de las células endoteliales modificando su polarización en respuesta. Permite identificar el papel del receptor-2 del factor de crecimiento vascular endotelial como parte del complejo mecanosensor (A. D. van der Meer et al. 2010). La integración de hidrogeles confinados en canales flanqueados por canales fluídicos en los microdispositivos permitió evaluar el papel del flujo a la hora de modular el inicio de procesos angiogénicos, a través del control de gradientes del factor de crecimiento vascular endotelial y fuerzas fluídicas se permitió observar como ambos de manera separada eran capaces de iniciar eventos de angiogénesis *in vitro* así como el efecto sinérgico de la suma de ambos factores en el desarrollo de nueva vasculatura (Song y Munn 2011) (figura 1.3.a)). La incorporación a este tipo de diseño de microdispositivo de canales fluídicos separados por canales de hidrogel confinado se empleó para generar un modelo funcional *in vitro* de intravasación celular de células

tumorales y función de la barrera endotelial (Zervantonakis et al. 2012) (figura I.3.b)). Observando in vitro el papel que ejercen los macrófagos a través de la secreción del factor de necrosis tumoral alfa en el incremento de la permeabilidad de la barrera endotelial favoreciendo la intravasación tumoral en los procesos de metástasis.

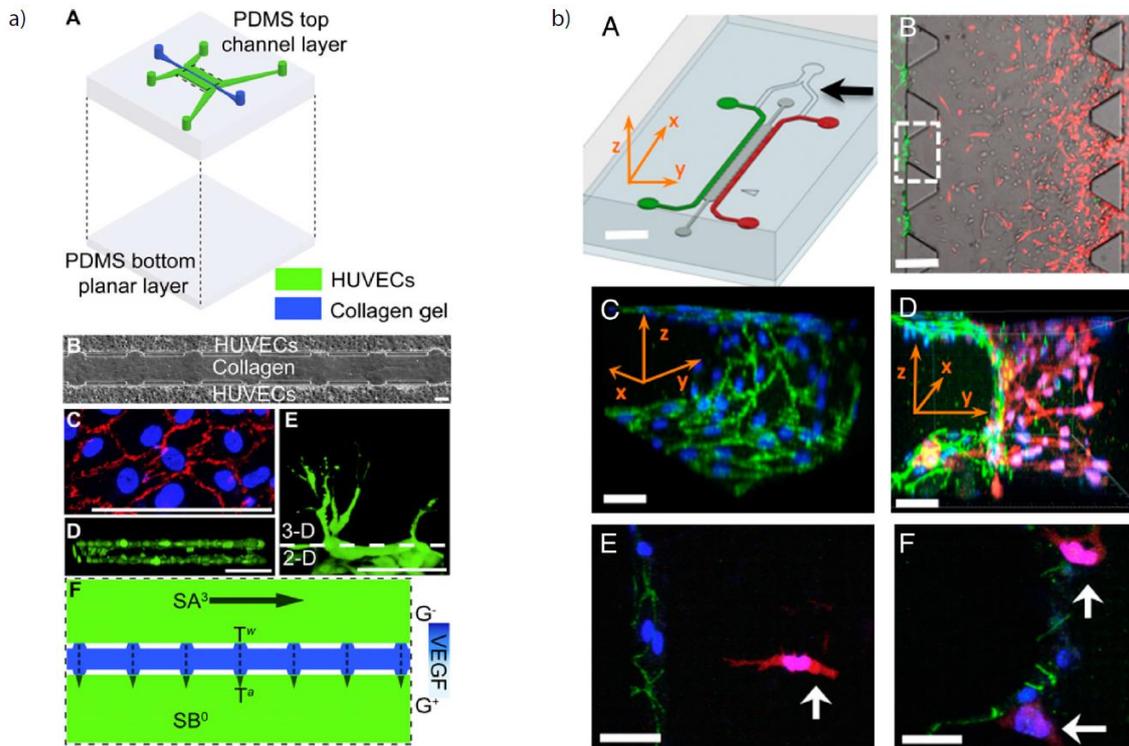


Figura I.3. Modelos microfluídicos para simular la fisiología endotelial. a) El sistema de canales fluídicos separados de hidrogel permitió determinar in vitro el inicio de la angiogénesis y relacionarlo de forma directa con las fuerzas fluidicas en el sistema. Adaptado de Song y Munn 2011. b) Un sistema de configuración similar permitió reproducir in vitro eventos de intravasación tumoral a través de una barrera endotelial y relacionarlos con la secreción del factor de crecimiento tumoral alfa por parte de macrófagos. Adaptado de Zervantonakis et al. 2012.

Este último ejemplo ilustra el avance sufrido por los modelos microfluídicos de cultivo, donde los modelos generados son capaces de recrear estructuras fisiológicas complejas al integrar distintas poblaciones celulares en distinto tipo de cultivo, 2D y 3D, compartimentalización entre fluido y tejido, etc. Esto ha motivado el desarrollo de sistemas microfluídicos que tratan de recrear la funcionalidad fisiológica de tejidos (tejido-en-chip) y órganos (órgano-en-chip). Un ejemplo de la complejidad de los modelos desarrollados fue la recreación de la estructura alveolar en un dispositivo microfluídico (Huh et al. 2010). En este modelo, dos canales separados por una membrana porosa actúan uno como el espacio aéreo alveolar y el otro como un capilar. La membrana actúa como soporte de cultivo permitiendo el crecimiento de una monocapa de células epiteliales pulmonares en el lado aéreo y una monocapa de células endoteliales en el lado vascular. A ambos lados de los canales existen dos canales diseñados para la aplicación cíclica de vacío que permite incorporar el efecto mecánico de la distensión alveolar durante la respiración (figura I.4). Permitiendo mantener las células epiteliales alveolares en una interfaz aire-liquido sometidas a estímulos

mecánicos propios del tejido. El uso de este modelo permitió observar el desarrollo *in vitro* de respuesta inflamatoria al extravasarse neutrófilos del canal capilar hacia el canal aéreo en respuesta a la presencia en este de bacterias.

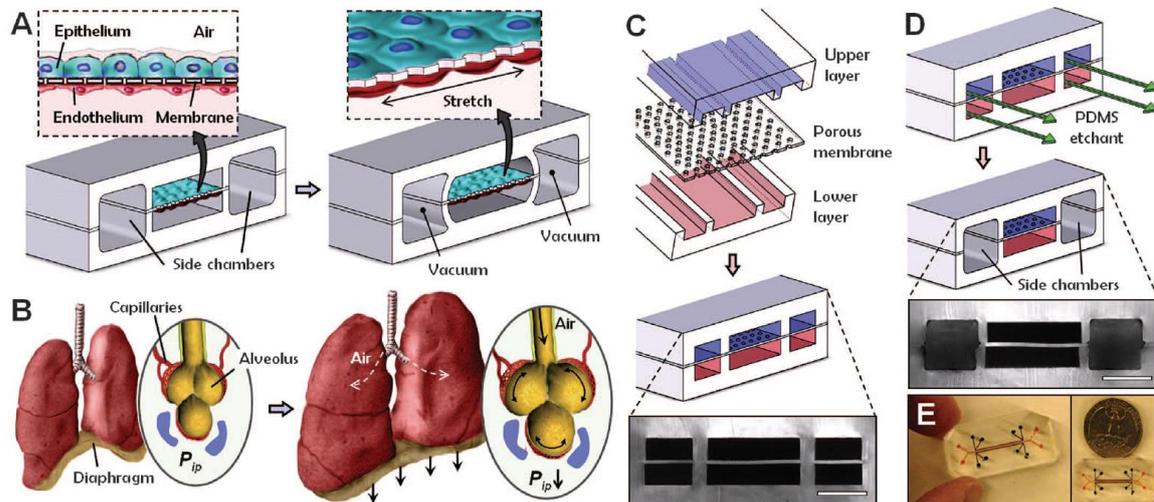


Figura 1.4. Reconstrucción de la estructura alveolar a través de la combinación de técnicas microfluidica con técnicas de microfabricación. Adaptado de Huh et al. 2010.

Este concepto de órgano-en-chip se ha utilizado para generar modelos *in vitro* de distintos órganos con diferentes grados de respuesta fisiológica *in vitro*, como son el hígado (Prodanov et al. 2016), riñón (Wilmer et al. 2016) o intestino (Shim et al. 2017) entre otros. El siguiente paso lógico tras el desarrollo de los órgano-en-chip es la integración de estos modelos para obtener una respuesta conectada entre los distintos órganos y tejidos modelizados *in vitro*, con el objetivo de generar el denominado cuerpo-en-chip que permitiese evaluar, por ejemplo, el papel de la toxicidad de un determinado fármaco en otros tejidos tras su metabolización hepática. Esto, proporcionaría a los investigadores con una poderosa herramienta prospectiva *in vitro* para el estudio de la respuesta a nivel de sistemas u organismo.

1.4.4 VENTAJAS Y DESAFIOS DE LOS MODELOS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR

Los sistemas microfluídicos de cultivo proporcionan múltiples ventajas sobre los modelos tradicionales que van más allá de la capacidad de recrear y controlar con precisión las condiciones del microambiente celular. Debido al pequeño tamaño de las estructuras en los microdispositivos, los volúmenes de muestra y de reactivos necesarios para el experimento se reducen considerablemente en comparación con los métodos tradicionales, lo que supone una ventaja a la hora de utilizar células y/o reactivos de difícil obtención. Son compatibles con el uso de microscopía y debido al reducido volumen interno permiten una alta resolución de las muestras en su interior, incluso en

cultivos 3D. Son escalables a sistemas de alto rendimiento automatizables sin necesidad de elevadas superficies de inmovilización en comparación con los métodos tradicionales.

Sin embargo, el uso de los sistemas microfluídicos tienen una serie de desventajas generales con independencia del modelo: 1) debido a la elevada relación superficie volumen en los canales microfluídicos las pérdidas de muestra debido a adsorción inespecífica en la superficie del canal puede llegar a ser significativa, 2) debido también a las dimensiones de los canales y microestructuras internas de los microdispositivos estos pueden verse bloqueados por la entrada de burbujas de aire o materiales sólidos en suspensión inhabilitando el microdispositivo, 3) son incompatibles con operaciones que requieran del procesamiento de muestras en grandes volúmenes debido a la diferencia de escalas, 4) la mayoría de elementos convencionales para la manipulación de líquidos en la macroescala no son compatibles con los sistemas microfluídicos por incapacidad de traducir ambas escalas, 5) el uso de microdispositivos requiere de un elevado grado de especialización, sobre todo en las fases de diseño y fabricación, que limitan la difusión de la técnica y, 6) en comparación con los cultivos tradicionales, tanto 2D como 3D, la cantidad de datos en literatura que permita poner los resultados en contexto es muy limitada, careciendo en muchas ocasiones de estándares para comparar resultados entre distintos dispositivos o de controles adecuados que otorguen robustez a los resultados obtenidos en microdispositivos.

CAPÍTULO 1. DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR DESARROLLADOS EN SU-8 Y HERRAMIENTAS DE CONEXIÓN MULTIESCALA A SISTEMAS FLUÍDICOS

INTRODUCCIÓN

Al igual que cualquier otro proceso de fabricación, el desarrollo de dispositivos de microfluídica requiere de continuas iteraciones de los procesos de diseño, fabricación y validación hasta el desarrollo de un prototipo final de microdispositivo que cumpla con todos los criterios a considerar tanto fluídicos como arquitectónicos y funcionales. Esto obliga a la utilización de materiales y técnicas que permitan la fabricación de prototipos de manera robusta, rápida y económica. Tradicionalmente, los dispositivos de microfluídica para aplicaciones de cultivo celular han sido fabricados mayoritariamente en PDMS (polidimetilsiloxano) (El-Ali, et al. 2006) (figura 1.1.a)) un organosilicato polimérico flexible de la familia de los siloxanos o siliconas. El PDMS posee una serie de características que explican su elección mayoritaria como material en el prototipado y fabricación a escala de laboratorio de dispositivos de microfluidos para cultivo celular: 1) El PDMS es considerado biocompatible y ha sido testado en múltiples tipos celulares distintos (Song y Munn 2011)(Lee, et al. 2007)(Gumuscu et al. 2017), 2) Es un polímero transparente (240 nm a 1100 nm) con una baja autofluorescencia (Piruska et al. 2005) lo que facilita la observación de las células en los microdispositivos por microscopia, siendo compatible con el uso de marcadores fluorescentes, así como de técnicas de inmunofluorescencia, 3) Es permeable al paso de gases lo que permite mantener el cultivo en el interior del microdispositivo en condiciones de oxigenación y carbonatación propias de cultivo incluso en microdispositivos sellados, 4) Es fácilmente moldeable con capacidad de reproducir estructuras en la escala micrométrica con gran precisión (Schmid and Michel 2000) de manera rápida y con un coste muy bajo de producción por microdispositivo, 5) Es capaz de unirse fuertemente a otra superficie de PDMS o cristal tras la activación del PDMS por un tratamiento de plasma, lo que permite el sellado o cierre de los canales del microdispositivo de manera sencilla, 6) Una vez polimerizado el PDMS es flexible, lo que permite la deformación de los microcanales mecánicamente así como la integración de válvulas fluídicas en el microdispositivo. Además, permite la conexión a prueba de fugas de conectores directamente en el microdispositivo, lo que permite su conexión a un circuito fluídico externo para la perfusión de fluidos a través de los canales del microdispositivo.

A pesar de las ventajas que ofrece el PDMS y de su ubicua implantación en la fabricación a pequeña escala de dispositivos microfluídicos de cultivo celular, el PDMS presenta una serie de inconvenientes que limitan su uso en distintas aplicaciones: 1) La biocompatibilidad del PDMS es dependiente del grado de curado de este, siendo tóxico cuando se encuentra libre en forma monomérica, 2) Debido a su naturaleza puede adsorber moléculas hidrofóbicas, lo que puede resultar en contaminaciones cruzadas cuando dos o más compuestos son aplicados secuencialmente o en la pérdida de concentración de compuestos empleados a muy baja concentración pero con elevada actividad biológica (B. J. van Meer et al. 2017), 3) El PDMS sufre procesos de envejecimiento y recuperación del perfil hidrofóbico con el tiempo, alterándose la naturaleza de la superficie afectando la humectabilidad y por lo tanto al comportamiento capilar de medios de cultivo y otras soluciones acuosas, 4) La permeabilidad a gases del PDMS hace difícil controlar la concentración de oxígeno en el

interior del microdispositivo en condiciones de cultivo de hipoxia o anoxia. Además, la permeabilidad del PDMS al vapor de agua hace difícil controlar la evaporación en los microdispositivos. 5) La flexibilidad del PMDS permite su deformación debido al paso de fluido a través de los canales, lo que puede alterar la respuesta biomecánica de distintos tipos celulares frente al estímulo producido por el paso del fluido (Moore, et al. 2017), 6) Es muy complicada la deposición de metales en PDMS lo que limita la integración de sensores *in situ* en los microdispositivos, 7) La inyección industrial a altas presiones, empleada tradicionalmente en termoplásticos, es incompatible con el uso de PDMS (Mukhopadhyay 2007), lo que limita el escalado de un diseño funcional en PDMS a producción industrial.

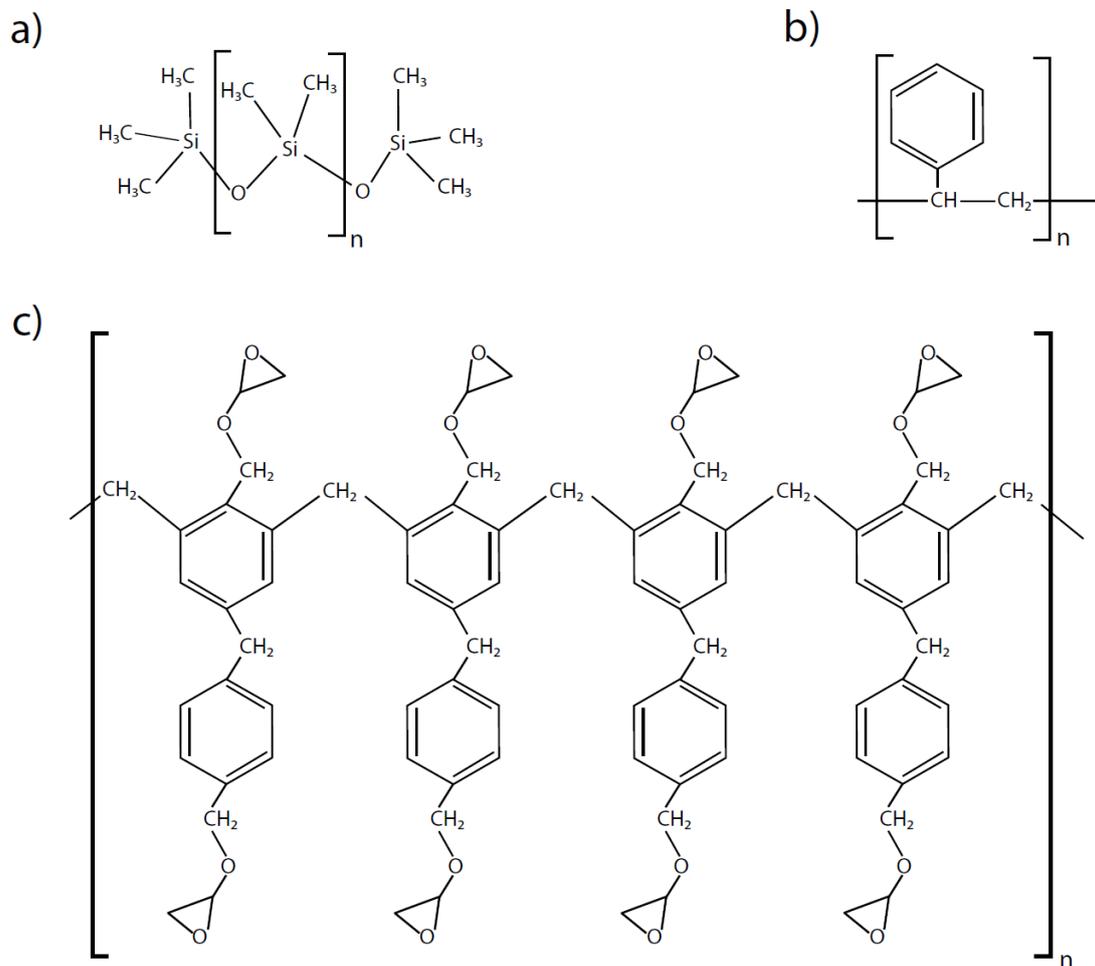


Figura 1.1. Composición química de diversos polímeros empleados en la fabricación de dispositivos microfluidicos y de cultivo celular. a) Polidimetilsiloxano (PDMS), b) Poliestireno y c) SU-8. En todos los casos la unidad monomérica se representa entre corchetes.

Además de las limitaciones que tiene el PDMS, es necesario también valorar que el mundo del cultivo celular está mayoritariamente dominado por termoplásticos. Siendo el poliestireno (figura 1.1.b)) el material más empleado en la fabricación de material para cultivo celular. Esto limita la capacidad de extrapolación de los datos obtenidos en un microdispositivo de PDMS y compararlos con los obtenidos en poliestireno, debido tanto al distinto comportamiento mecánico de ambos materiales, como la diferente

rigidez entre ambos materiales, sino también químico, la activación de la superficie de poliestireno para cultivo celular por plasma es irreversible al contrario que en el caso del PDMS. Todo esto, impulsa la necesidad de buscar nuevos materiales de prototipado que permitan el desarrollo de dispositivos de microfluídica a pequeña escala en unas condiciones no solo extrapolables o comparables a las obtenidas en soportes clásicos de cultivo fabricados en termoplásticos. Sino también, como herramienta de prototipado frente al comportamiento del microdispositivo en un material más cercano en comportamiento a los empleados por la industria, lo que permitiría la producción de los dispositivos de microfluidos industrialmente.

Una alternativa al uso de PDMS podría ser el empleo de SU-8 (figura 1.1.c)), una fotorresina epoxi negativa ampliamente empleada en el desarrollo de componentes microelectrónicos y sistemas microelectromecánicos (Perdigones et al. 2014)(Ezkerra et al. 2011)(Kang et al. 2017), así como en la fabricación de moldes maestro para el moldeo de dispositivos de microfluídica en PDMS (Lake et al. 2015). El SU-8 comparte muchas de las atractivas cualidades de los termoplásticos, como el poliestireno, para el desarrollo de elementos de cultivo celular, combinadas con las propiedades y técnicas de microfabricación únicas de las fotorresinas: 1) El SU-8 tiene unas excelentes cualidades ópticas siendo transparente por encima de los 360 nm con una ligera autofluorescencia en la región visible del espectro, 2) El SU-8 polimerizado presenta elevada resistencia química a la mayoría de químicos y reactivos empleados en un laboratorio de cultivo celular (incluyendo ácidos, bases y solventes orgánicos) así como una excelente estabilidad térmica y mecánica, 3) El SU-8 es impermeable a gases, lo que permite controlar la concentración de oxígeno en el interior del dispositivo así como reducir evaporación al mínimo, 4) Es posible depositar metales sobre el SU-8 lo que permite la integración monolítica de sensores y electrodos en los microdispositivos para la obtención de medidas *in situ* sobre el cultivo, 5) Las técnicas de fotolitografía permiten la producción de estructuras con una elevada relación de aspecto (altura/anchura)(Deng et al. 2000), que serían mecánicamente inestables en PDMS.

Debido a las características únicas del SU-8, este se ha empleado para el desarrollo de microagujas neuronales combinadas a electrodos (Altuna et al. 2013)(Fernández et al. 2009) como herramientas para el estudio neuronal *in situ* o de dosificación de fármacos en el cerebro de forma mínimamente invasiva. Lo que ha motivado la realización de múltiples estudios para evaluar la biocompatibilidad del SU-8 con resultados en ocasiones contradictorios. Uno de los primeros estudios (Vernekar et al. 2009) en evaluar la compatibilidad de cultivo celular de neuronas corticales primarias procedentes de embriones de rata sobre superficies de SU-8 determino la toxicidad del material sin tratar o sometido a un tratamiento de plasma de oxígeno para incrementar el perfil hidrófilo de las superficies. En un estudio posterior, en cambio, se demostró la compatibilidad del SU-8 con el cultivo de células derivadas de glioma de rata (Nemani et al. 2013) así como una ausencia tanto de interacción con el tejido del hospedador, como de respuesta *in vivo* por parte del sistema inmunitario de este tras la implantación del material polimerizado en ratas. Ambos estudios, identifican potencialmente al fotoiniciador, hexafluoroantimoniato de triarilsulfonio presente en la formulación del

SU-8, como el principal causante de toxicidad por parte del material, pero difieren en la capacidad del material polimerizado de liberar fotoiniciador al medio tras su análisis por ICP-masas estando en consecuencia los resultados con el efecto citotóxico observado. Trabajos posteriores soportan la viabilidad del uso del SU-8 como material de fabricación para prototipos empleados en cultivo celular tanto de microestructuras de soporte para el cultivo (Torrejon et al. 2013) como de dispositivos de microfluídica para el confinado de geles y el crecimiento de células en estos en un ambiente de hipoxia/privación de nutrientes (Jose Maria Ayuso et al. 2015). Sin embargo, no existe en literatura ejemplos de dispositivos de cultivo microfluídicos íntegramente fabricados en SU-8 en los que se realice adhesión directa celular al SU-8. El desarrollo de un dispositivo de estas características permitiría el estudio *in vitro* de la respuesta epitelial en un modelo que carece por un lado de las limitaciones mecánicas del PDMS, en las que dependiendo del diseño del microdispositivo, pueden interferir al evaluar la respuesta de un epitelio a la estimulación mecánica mediada por la presión ejercida sobre las células resultante del paso de un fluido. Además, la escasa permeabilidad del SU-8 a gases permitiría estudiar las respuestas celulares en hipoxia o anoxia en un modelo que permitiría el control preciso de la concentración de oxígeno en el interior de este. Esto, facilitaría el estudio de fenómenos tan cruciales como la angiogénesis o la metástasis, en los que las condiciones de oxigenación del tejido determinan la respuesta celular (Muz et al. 2015), bajo unas condiciones de control imposibles de alcanzar en dispositivos basados en PDMS debido a su elevada permeabilidad gaseosa. Finalmente, la integración directa de sensores no destructivos en el dispositivo de SU-8, para el estudio de la respuesta celular *in situ* a los estímulos anteriormente mencionados, permitiría la monitorización a tiempo real y de manera continua de los cambios fenotípicos inducidos tras la estimulación del cultivo. Sobrepasando tanto a los métodos clásicos de cultivo, que carecen de la flexibilidad y control de las condiciones de cultivo aportadas por los dispositivos de microfluídica, como a los dispositivos basados en PDMS, para los cuales, además de su inestabilidad mecánica y elevada permeabilidad a gases, la inserción de sensores monolítica requiere de complejas estrategias alternativas de fabricación.

OBJETIVOS

Evaluar el potencial del SU-8 como material para el prototipado rápido de dispositivos de microfluídica destinados al cultivo celular en modelos experimentales que requieran adhesión directa celular al SU-8 tras la activación de su superficie para permitir la adhesión celular.

Determinar las ventanas de adhesión para distintos tipos celulares en los dispositivos de microfluídica de SU-8, con el objetivo de reducir el impacto de la impermeabilidad del material al paso de oxígeno antes de establecerse las condiciones de confluencia celular necesarias para iniciar la perfusión en los dispositivos.

Desarrollar las herramientas y protocolos que permitan la conexión fluídica del dispositivo a un circuito de flujo externo, permitiendo el control y la monitorización fluídica de la perfusión a través del microdispositivo.

Evaluar la viabilidad del microdispositivo, el efecto de la ventana de adhesión y de las herramientas y protocolos de conexión y perfusión a través del cultivo en condiciones de flujo de células endoteliales humanas primarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO Y FABRICACION DE LOS MICRODISPOSITIVOS EN SU-8

Los microdispositivos de SU-8 (MicroChem) se diseñaron con el objetivo de optimizar las condiciones de cultivo celular, así como el comportamiento fluídico en ellos. No solo se tuvieron en cuenta en el diseño las propias limitaciones impuestas por las técnicas de fabricación y propiedades del material, sino que también se contemplaron las limitaciones del usuario al tener que emplear elementos macroscópicos en la siembra y manipulación de líquidos en ellos. Los dispositivos se diseñaron macroscópicamente con forma rectangular y unas dimensiones de 8mm de anchura y 40 mm de longitud (figura 1.2.b), permitiendo la manipulación aceptable de los mismos. Cada microdispositivo aloja tres cámaras de cultivo independientes entre sí, lo que permitió disponer de tres replicas por microdispositivo. Las cámaras de cultivo se diseñaron con una anchura de 1mm y una longitud de 9mm, lo que resulto en una superficie efectiva de cultivo de 9mm^2 , con una altura de $300\mu\text{m}$, resultando en un volumen por cámara de $2.7\mu\text{l}$. Al ser el SU-8 un polímero impermeable al paso de gases, las dimensiones de la cámara suponen un limitante al propio cultivo, siendo solo posible el intercambio de gases y nutrientes a través de las entradas fluídicas del microdispositivo tanto de manera pasiva, por difusión, como activa, mediada por el usuario o un circuito fluídico. Las cámaras de cultivo conectan con las entradas fluídicas a través de canales de $200\mu\text{m}$ de anchura lo que limita la difusión de nutrientes y oxígeno al interior de la cámara debido a las dimensiones de los canales. Para suavizar el impacto de la tensión de cizalladura debido al paso de flujo en la zona de la entrada fluídica, debido a su vez al súbito cambio de dimensiones entre los canales de conexión y la cámara de cultivo, la porción de las cámaras más próxima a la entrada fluídica del microdispositivo se diseñaron con un ángulo de transición de 45° .

Los microdispositivos de SU-8 fueron fabricados en las instalaciones de sala blanca del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA). El proceso de fabricación (figura 1.2.b)) comenzó con la unión temporal de una lámina de $125\mu\text{m}$ de espesor de Kapton, lámina de poliimida estable a temperaturas de hasta 400°C con baja adhesión al SU-8 lo que permitirá liberar los microdispositivos tras su fabricación, a una oblea de pírex. Tras este paso, se depositó por un proceso de “*espineado*” una capa de $60\mu\text{m}$ de espesor de SU-8-50 (MicroChem). El “*espineado*” es un proceso que permite la deposición de una capa de espesor determinado de un material viscoso al verter ese material sobre un sustrato conectado a un eje de giro, en dependencia de la velocidad de giro del eje se consiguen capas de distintos espesores homogéneo del material sobre el sustrato. Tras cada proceso de “*espineado*”, se sometió a la oblea a un horneado suave de 65°C de temperatura durante 30 minutos y un enfriado progresivo y controlado hasta temperatura ambiente. Tras este proceso de horneado suave, la oblea está lista para una nueva deposición de SU-8-50 por “*espineado*”, repitiéndose el proceso hasta alcanzar la altura de SU-8 deseada para el microdispositivo añadiéndose distintas capas de $60\mu\text{m}$ y $20\mu\text{m}$ de espesor.

Una vez alcanzado el espesor necesario para actuar como base, una capa de 60 μm más una capa de 20 μm , las estructuras internas del chip se definen a través de la exposición de la nueva capa de SU-8 “*espineada*” sobre la base a un patrón de luz ultravioleta (UV) definido por las máscaras de fabricación. El SU-8 al ser una fotorresina negativa sufre entrecruzamiento de sus monómeros al ser expuestos a luz ultravioleta lo que permite definir patrones de manera selectiva en la capa “*espineada*” generando zonas de exposición a la luz UV y zonas de sombra. Estas zonas de luz y sombra se obtienen empleando lo que se denominan máscaras de fabricación, las máscaras tienen inscrito en su superficie el patrón que se desea fabricar en los microdispositivos de manera que este patrón es opaco al paso de luz. Inicialmente, los microdispositivos se fabricaron empleando máscaras de fotolitografía blandas fabricadas por impresión de alta resolución en láminas de película polimérica de (Micro Lithography Services Ltd), comúnmente empleadas en la fabricación de microcircuitos y elementos de microelectrónica empleando fotorresina negativa. Tras la fabricación de los microdispositivos se pudieron observar la presencia de patrones hexagonales en forma de panal de abeja en el interior de los mismos como resultado de interferencia de la máscara con la luz UV empleada en el curado del polímero. Por lo que se decidió incluir en el proceso de fabricación de otras máscaras de litografía duras fabricadas definiendo el patrón por deposición de metales sobre una oblea de pírex, proceso realizado en la sala blanca del INA. El patrón se definió en los microdispositivos por la exposición selectiva de áreas de estos, empleando uno de los dos tipos de máscaras en todo el proceso, a luz UV de 365nm y una dosis de exposición de 140 mJ/cm². Tras la exposición, la oblea en fabricación se sometió a un proceso de *post-horneado* calentando la oblea a 65°C durante 15 minutos y dejándola enfriar a temperatura ambiente. Este proceso se repitió hasta alcanzar la altura deseada, por adición sucesiva de capas de SU-8 y su exposición al patrón, tras lo cual los restos de SU-8 no polimerizados se eliminaron por revelado de la oblea empleando un agente revelador específico de SU-8, que disuelve el SU-8 no polimerizado o con bajo grado de polimerización. La oblea en fabricación fue sumergida en el agente revelador de SU-8 durante 8 minutos, el proceso de revelado se detuvo por inmersión de la oblea en fabricación en agua destilada para diluir el agente revelador. La oblea se sumergió después primero en alcohol isopropílico y finalmente en agua destilada, tras lo que se secó empleando una corriente de nitrógeno filtrado. Debido a las limitaciones técnicas en la altura que se puede conseguir a través de este proceso, los microdispositivos de SU-8 se fabricaron en dos partes idénticas, con la salvedad, de que una de ellas al actuar como tapa del dispositivo tiene las entradas fluídicas definidas a través de patrones en ella.

Finalmente, las dos obleas fueron alineadas para hacer coincidir las microestructuras de una de las mitades con la otra y se unieron por un proceso de termocompresión, sometiénolas a una presión de 1 bar y calentándolas a 90°C. Una vez unidas ambas mitades, los microdispositivos de SU-8, fabricados con máscaras de película polimérica de o con máscaras de pírex, se liberaron del kapton empleado como base (figura 1.2.c).

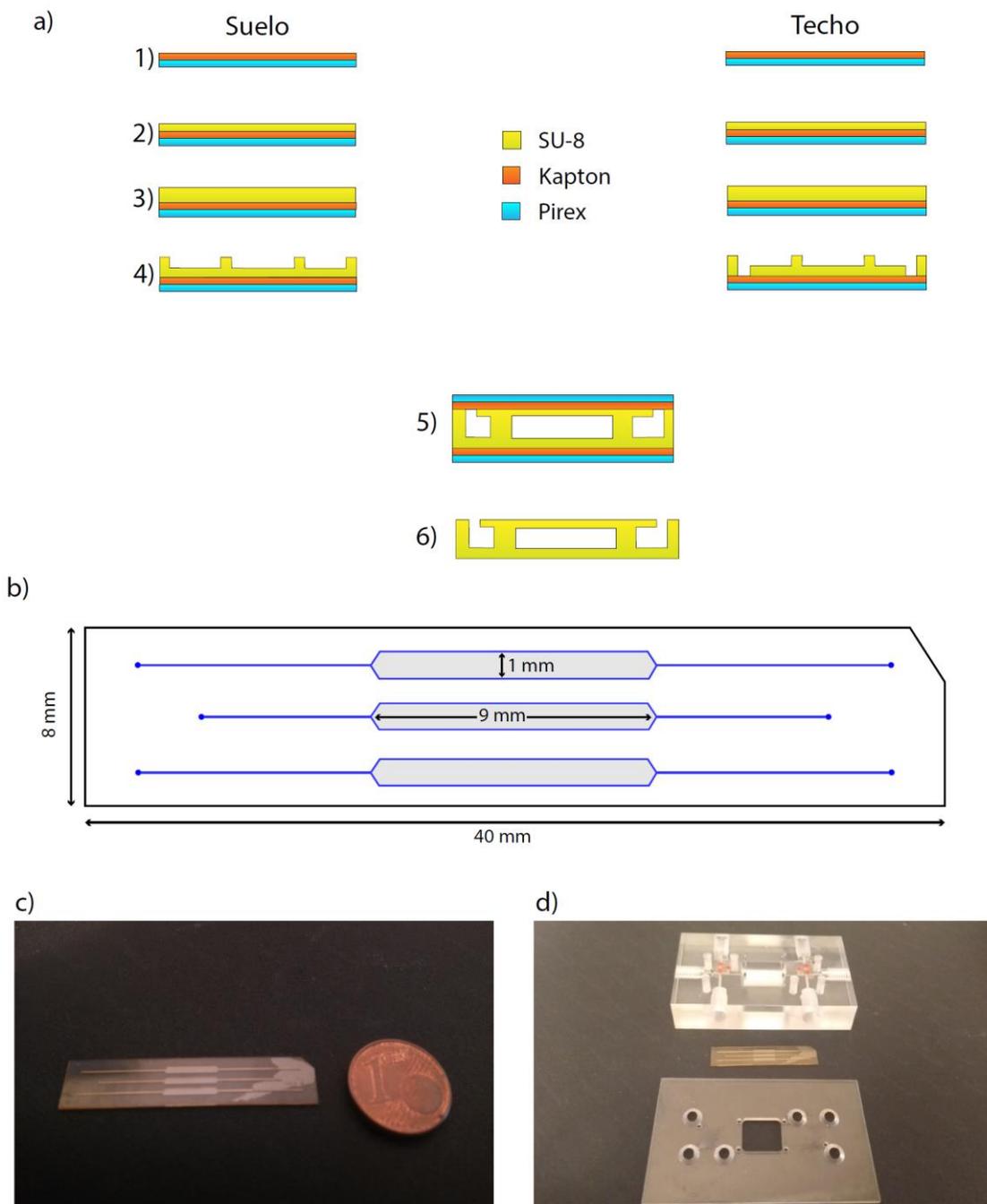


Figura 1.2. Fabricación de dispositivos microfluídicos en SU-8. a) Esquema de fabricación del microdispositivo de SU-8. El proceso de fabricación del microdispositivo se divide en dos obleas, una para el suelo y otra para el techo, que se fabrican simultáneamente. 1) El proceso comienza con la adhesión de una película de Kapton a una oblea de pírex. 2) Sobre la que se depositan capas de SU-8. 3) Hasta alcanzar la altura deseada. 4) Las microestructuras en el interior del microdispositivo, cámaras, canales, etc., se definen por exposición negativa a luz UV. 5) Ambas obleas se alinean y unen por termocompresión para formar el microdispositivo final. 6) Que es liberado del Kapton debido a la baja adhesión del SU-8 a este. **b) Esquema del diseño del microdispositivo.** **c) Fotografía de un microdispositivo de SU-8 terminado.** **d) Fotografía del encapsulado y microdispositivo de SU-8.** El encapsulado se diseñó como herramienta que permitiera acoplar el microdispositivo a un sistema de flujo en la macroescala.

DISEÑO DE LOS ENCAPSULADOS

El encapsulado, está formado por una pieza base y una pieza conectora (figura 1.2.d)), fue diseñado con unas dimensiones de anchura 40mm, altura 70mm y espesor 12mm. Lo que permite alojarlo de manera estable en un adaptador para portaobjetos regulable de platina de microscopio motorizada TI-S-E (Nikon), y así permitir la inspección óptica de las cámaras del microdispositivo. Los encapsulados fueron fabricados por el centro tecnológico IKERLAN mediante técnicas de mecanizado de precisión en metacrilato transparente, en adelante PMMA. Este material permite observar la correcta colocación del microdispositivo al cerrar el encapsulado, así como la inspección por microscopía de este.

La pieza conectora (figura 1.3.a)), posee una depresión en su cara interna que permite el alojamiento del microdispositivo y coincide en dimensiones con este. Seis canales independientes internos de diámetro de 1mm coinciden con las seis entradas fluídicas del microdispositivo y conectan con seis puertos roscados independientes, en los laterales de la pieza conectora, que permiten alojar conectores de cromatografía líquida de baja presión de poliacetal para tubos rígidos de 1,6 mm de diámetro externo (JR-040YL-10, VICI AG International) con férulas inertes de Etileno-Tetrafluoroetileno (JR-041-10, VICI AG International). La estanqueidad de la conexión entre las entradas fluídicas del microdispositivo y los canales internos del encapsulado se aseguró empleando juntas tóricas de silicona de 1,78 mm de sección y diámetro interno (BS1806-004, BARNWELL). Para facilitar la correcta colocación de las juntas tóricas entre el microdispositivo y el encapsulado, se añadieron alojamientos para las juntas en las entradas de los canales internos del encapsulado. Seis puertos roscados para tornillos de acero inoxidable de métrica 3 perpendiculares al alojamiento del microdispositivo permiten el cierre del encapsulado.

La pieza base (figura 1.3.b)) actúa como soporte del conjunto formado por el microdispositivo y la pieza conectora. El principal criterio en su diseño fue el espesor de la pieza, al incrementar la distancia del microdispositivo con respecto al objetivo del microscopio en un valor equivalente al espesor de la pieza. Para reducir interferencias en la visualización al microscopio se generó una ventana de inspección para permitir la observación directa de las cámaras del microdispositivo únicamente a través de la base de SU-8 de este. Finalmente, seis alojamientos para las cabezas de los tornillos mencionados en el párrafo anterior permiten el cierre del encapsulado (figura 1.3.b)).

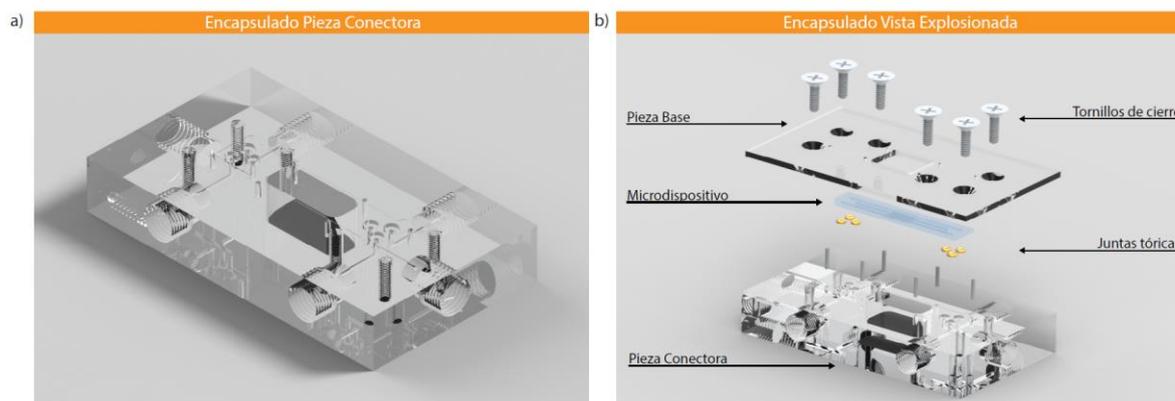


Figura 1.3. Encapsulado para la conexión de dispositivos microfluídicos de SU-8 a un circuito fluídico externo. a) Renderizado de la pieza conectora del encapsulado. La pieza conectora del encapsulado permite a través de sus canales internos la conexión de cada canal del microdispositivo a una línea de flujo de manera independiente. b) Renderizado del encapsulado y microdispositivo con todos los elementos que lo conforman y su posición relativa en el montaje. La conexión estanca entre los canales fluídicos de la pieza conectora y los canales del microdispositivo se asegura a través del uso de juntas tóricas de silicona que se deforman, aislando la conexión fluídica del exterior, durante el cierre del encapsulado con los tornillos.

TIPOS CELULARES, MEDIOS DE CULTIVO

Para realizar los experimentos de este capítulo se emplearon tres tipos celulares distintos, dos líneas celulares comerciales LLC-PK1 (CL-101™, ATCC®), MC3T3 (CRL-2593™, ATCC®) y un cultivo primario de células endoteliales HUVEC.

La línea celular epitelial LLC-PK1 es de origen porcino (*Sus scrofa*) y procede del epitelio del túbulo renal. El medio completo de crecimiento para estas células, en adelante D10, usa como base el Medio Modificado Eagle de Dulbecco bajo en glucosa (1g/L) (BE12-707F, Lonza) o DMEM suplementado con; 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (SV30143.03HI, GE Healthcare) o FBS (acrónimo del inglés *Fetal Bovine Serum*), 20mM de L-glutamina (25030024, Thermo Fisher Scientific™) y 1% (v/v) de una mezcla de antibióticos (15140122, Thermo Fisher Scientific™): penicilina (concentración final en el medio de 100 unidades/ml) y estreptomina (concentración final en el medio de 100µg/ml), en adelante PEN/STR.

La línea celular MC3T3 es de origen murino (*Mus musculus*) y está derivada de preosteoblastos de ratón extraídos de la bóveda craneal. El medio de crecimiento completo para estas células, en adelante α10, usa como base el Medio Mínimo Esencial Alfa (BE12-169F, Lonza) o αMEM suplementado con; 10% (v/v) de FBS, 20mM de L-glutamina y 1% del cóctel de antibióticos PEN/STR.

Las células humanas (*Homo sapiens*) primarias endoteliales de vena de cordón umbilical HUVEC se obtuvieron, como se explica más adelante, a partir de cordón umbilical de donantes previo consentimiento informado y a través del BIOBANCO de Aragón. El medio completo de crecimiento para estas células, en adelante EGM-2, usa como base el Medio Basal Endotelial-2 (CC-3156, Lonza) o EBM-2 suplementado con el kit de suplementos y factores de crecimiento EGM-2 SingleQuots™ Kit (CC-4176, Lonza) que se compone de; FBS (concentración final en el medio de 2% (v/v)), Factor de Crecimiento

Endotelial Vascular Recombinante Humano (VEGF), Heparina, Ácido Ascórbico, Hidrocortisona, Factor de Crecimiento Epidermal Recombinante (rhEGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico Recombinante Humano B (rhFGF-B), Factor de Crecimiento Recombinante Humano Insulinico-1 o R³-IGF-1 y una mezcla de antibióticos: sulfato de gentamicina y anfotericina B.

AISLAMIENTO DE HUVEC

Los cordones umbilicales empleados en el aislamiento de HUVEC se obtuvieron a través del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, empleándose cordones descartados para el trasplante obtenidos en el Servicio de Maternidad del Hospital Clínico Universitario Miguel Servet. La extracción de HUVEC se realizó en campana de flujo laminar para evitar contaminación y siguiendo el protocolo descrito en literatura (Davis, Crampton, and Hughes 2007) y que se resume a continuación.

En primer lugar, empleando gasas estériles se eliminó el exceso de sangre en el cordón para facilitar la inserción de una aguja hipodérmica de 21G X 40mm (4657527, BRAUN) en la vena umbilical en uno de los dos extremos del cordón. Con ayuda de un hemostato, se pinzó la aguja y se perfundió cuidadosamente con una jeringuilla de 20ml (309661, BD) medio salino de Hank (BE10-508F, Lonza) para lavar la vena de restos de sangre, poniendo especial atención en eliminar cualquier posible coágulo formado. Tras el lavado se comprobó la integridad del cordón pasando un segundo volumen de medio salino a través del cordón para comprobar que no existían fugas. La jeringuilla de 20ml se retiró de la aguja de 21G y se sustituyó por una jeringuilla de 10 ml (301604, BD) conteniendo una disolución de colagenasa (1mg/ml) (C0130, Sigma Aldrich) en medio salino de Hank. Se perfundieron 10 ml de la disolución de colagenasa a través del cordón cerrándose el extremo abierto de este con la ayuda de un hemostato cuando comenzaban a salir las primeras gotas de la disolución de colagenasa. Este proceso se realizó asegurándose de que la distensión causada en la vena al llenarse de la solución de colagenasa no fuera excesiva, lo que podría producir el desprendimiento de células musculares de la pared muscular venosa. El cordón se masajeó gentilmente con los dedos para favorecer el desprendimiento de las células endoteliales y asegurar una homogénea distribución de la disolución de colagenasa a lo largo de la vena. El cordón se sumergió en tampón fosfato salino estéril (pH= 7,4) libre de calcio y magnesio, en adelante PBS (BE17-161E, Lonza) a 37° durante 15 minutos. Tras la incubación se cortó el cordón por encima del homeostato colocado en el extremo no canulado y se recogió la solución eluída en un tubo estéril de 50ml, los restos de colagenasa en el cordón se recogieron en el tubo de 50ml perfundiendo 20ml de medio salino de Hank a través del extremo canulado. El tubo de 50ml se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, tras lo cual, se descartó el sobrenadante y el agregado celular se resuspendió en 5ml de EGM-2 y se sembró en un frasco de cultivo celular de 25 cm² de superficie. Las células se mantuvieron en cultivo, tal y como se describe en el apartado siguiente, hasta confluencia, tras lo que se tomó una pequeña alícuota para caracterizar por citometría de flujo y el resto de células se expandieron a un frasco de cultivo de 75cm².

La pureza de la extracción se determinó por citometría de flujo en el servicio de Separación celular y Citometría del Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Se determinó el porcentaje de HUVEC como la fracción de población celular positiva para los marcadores celulares CD31 y CD146 y negativa para CD45.

CULTIVO CELULAR

Todas las líneas celulares se cultivaron en su correspondiente medio de crecimiento en un incubador de CO₂ (EBERS, TEB-1000) a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera saturada de humedad. Los cultivos se mantuvieron de manera rutinaria siguiendo protocolos de cultivo en esterilidad, con cambios de medio cada 2-3 días, hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. Una vez alcanzado el nivel de confluencia deseado, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS, para desprender las células del frasco de cultivo se empleó una solución de Tripsina y ácido etilendiaminotetraacético, en adelante EDTA, en PBS añadiéndose 1ml de la solución de tripsina por cada 25cm² de superficie de los frascos de cultivo. Las líneas celulares se mantuvieron en el incubador de CO₂ el tiempo mínimo requerido para que las células se desprendieran del frasco de cultivo, en torno a unos 5 minutos, comprobándolo por microscopia. En el caso del cultivo primario, al ser más delicado que las líneas de cultivo, se procedió de igual manera, pero se mantuvieron los frascos de cultivo a temperatura ambiente para minimizar el daño a las células durante la digestión con tripsina. La solución de tripsina se neutralizó por la adición de al menos dos volúmenes de medio de crecimiento, siendo la tripsina neutralizada por factores presentes en el FBS. Para mantener los cultivos en crecimiento, las líneas celulares se pasaron a nuevos frascos de cultivo a una ratio de subcultivo de a 1:8 con respecto al cultivo original. Para el caso de las HUVEC, estas se pasaron a una densidad de $2,5 \cdot 10^3$ células por cm² de superficie del frasco de cultivo.

Para determinar la densidad celular y poder ajustar las densidades de siembra y subcultivo en las distintas suspensiones celulares se realizaron contajes celulares con ayuda de un hematocitómetro o cámara de Neubauer empleándose como colorantes de exclusión para discernir células viables de células muertas soluciones de Azul Tripan al 0,4% (p/v) en PBS (T8154, Sigma Aldrich) o Eritrosina B (87613, Sigma Aldrich) al 0,005 % (p/v) en PBS.

Para preservar las células entre experimentos estas se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido a una temperatura de -197°C. Para reducir el daño en las células debido al proceso de congelación se prepararon medios específicos de congelación para cada tipo celular por la adición de dimetilsulfóxido (D8418, Sigma Aldrich), en adelante DMSO, a una concentración final de 10% (v/v) a los respectivos medios completos de crecimiento.

SIEMBRA Y CULTIVO CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS

Para promover la adhesión celular al SU-8, la superficie de los microdispositivos se activó por exposición a plasma de oxígeno en las condiciones recogidas en la tabla 1.1 en un sistema de plasma Atto W6 (Diener). Esta activación, incrementa la energía superficial del SU-8 por la generación de grupos polares en la superficie del polímero, facilitando la interacción con las proteínas de adhesión celular y mejorando esta. Los microdispositivos de SU-8 se esterilizaron en la campana de flujo laminar por inmersión en alcohol isopropílico durante 5 minutos, tiempo en el cual se perfundió a través de las cámaras del microdispositivo alcohol isopropílico con ayuda de una micropipeta de 10 μ l. Para eliminar los restos de alcohol, los microdispositivos se sumergieron tres veces en agua destilada estéril, perfundiendo las cámaras como el paso anterior. El agua remanente en los dispositivos se aspiró y los dispositivos se dejaron secar en la campana

Tabla 1.1 Condiciones del tratamiento por plasma de oxígeno para la activación superficial de los microdispositivos de SU-8 para favorecer la adhesión celular en estos.

de flujo laminar durante 10 minutos. Ningún signo de contaminación se observó en ninguno de los dispositivos en cultivo así esterilizados.

Potencia (W)	Caudal de O ₂ (cm ³ /min)	Vacío (mbar)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
200 W	50 cm ³ /min	0,4 mbar	30 °C	60 s

La siembra celular en los dispositivos se realizó a través de las entradas fluidicas de los mismos. Un volumen de 10 μ l de suspensión celular de 2·10⁶ células/ml se perfundió con ayuda de una micropipeta de 10 μ l en cada canal actuando cuidadosamente el embolo de la micropipeta. La siembra se consideró exitosa si el total del canal al final de la siembra estaba completamente lleno de suspensión celular y no se observaron burbujas en su interior. El exceso de suspensión celular en las entradas fluidicas fue cuidadosamente retirado con ayuda de una micropipeta evitando alterar durante el proceso el volumen de suspensión celular contenido en el canal microfluidico. El dispositivo fue colocado en una placa de cultivo celular de 60mm de diámetro, cubierto cuidadosamente con medio y llevado al incubador de CO₂ para permitir la adhesión celular al dispositivo. Tras comprobar la adhesión celular en el microdispositivo por microscopia, las células se mantuvieron en cultivo en el interior de este el tiempo descrito para cada experimento

VIABILIDAD CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS

Para determinar la viabilidad celular en los dispositivos de microfluidica se emplearon dos marcadores fluorescentes, uno de viabilidad celular y otro de muerte celular. Como marcador de viabilidad se empleó Calceina-AM (Thermo Fisher Scientific C1430). La Calceina-AM es un reactivo derivado de la calceina no fluorescente capaz de difundir de manera libre a través de la membrana celular y pasar al citoplasma donde esterasas

intracelulares inespecíficas transforman la Calceina-AM en calceina que presenta una intensa fluorescente en verde (Excitación/Emisión= 495/515 nm), permitiendo distinguir así las células viables. La solución de stock de Calceina-AM se preparó disolviendo Calceina-AM (pm: 994,87 Da) en DMSO a una concentración final de 1mg/ml (1,005 mM).

Como marcador de muerte celular se empleó yoduro de propidio (Sigma Aldrich, P4170), que es un agente intercalante que al unirse a los ácidos nucleicos presenta fluorescencia en rojo (Excitation/Emision = 535/617 nm). Al contrario que la Calceina-AM, el yoduro de propidio no puede difundir libremente a través de la membrana citoplasmática, por lo que solo podrá unirse al ADN nuclear cuando la integridad de la membrana citoplasmática se encuentre comprometida, permitiendo distinguir así las células no viables al marcar en rojo los núcleos de estas. La solución de stock de yoduro de propidio se preparó disolviendo yoduro de propidio (pm: 668,39 Da) en DMSO a una concentración de 2mg/ml (2,992 mM). La solución de marcado se obtuvo diluyendo en 1ml de PBS, 3 μ l de la solución de stock de Calceina-AM (concentración de trabajo 3 μ M) y 2 μ l de la solución de stock de yoduro de propidio (concentración de trabajo 5 μ M).

Para marcar las células en el interior de los dispositivos, 10 μ l de la solución de marcado se inyectó en los dispositivos cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta de 10 μ l a través de las entradas fluídicas del dispositivo hasta desplazar todo el volumen de líquido previamente alojado en los canales. Se incubaron las células de 5 a 10 minutos con la solución de marcado, seguidamente se hizo un lavado del canal con PBS y finalmente se llenaron los canales con el medio de cultivo correspondiente a la línea celular. La viabilidad en el interior del dispositivo se observó empleando un microscopio de fluorescencia Nikon-Ti Eclipse (Nikon).

EXPERIMENTOS DE ADHESION CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS DE SU-8

Para evaluar las ventanas de adhesión en los dispositivos microfluídicos de SU-8 se emplearon dos líneas celulares distintas, MC3T3 y LLC-PK1. Los dispositivos de microfluídica en SU-8 se sembraron siguiendo el protocolo de siembra y cultivo celular descrito anteriormente. Tras la siembra, se tomaron dispositivos (n=9) a distintos tiempos: 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas, para cada línea celular. Para evaluar la adhesión y la viabilidad del cultivo se realizó una tinción de viabilidad siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Para cada serie de dispositivos, línea celular y tiempo, se tomaron imágenes de microscopía de cada canal para determinar el porcentaje de viabilidad, número de células por campo y evaluar la morfología de estas. Como control de adhesión positiva, se sembraron 1ml de la suspensión celular empleada para la carga de los dispositivos en placas de 60mm de diámetro de cultivo celular comprobándose la adhesión de las células a las 4 horas. Debido a las variaciones observadas tras la fabricación de los microdispositivos empleando máscaras poliméricas, se repitieron los experimentos de adhesión en microdispositivos de SU-8 fabricados con máscaras de

pírex para evaluar el posible impacto de la fabricación con un tipo u otro de máscara en la adhesión celular.

ENSAYOS DE FLUJO EN MICRODISPOSITIVOS

Para los experimentos en flujo se empleó el cultivo primario de HUVEC debido a su relevancia como modelo vascular. Las células fueron sembradas y mantenidas en cultivo en los microdispositivos (n=3) tal y como se describe en el apartado correspondiente. Una vez alcanzada confluencia en los canales del dispositivo y de disponer de una monocapa de HUVEC, los microdispositivos se conectaron al circuito fluídico que contiene todos los elementos necesarios para permitir la perfusión de medio a través de los canales del microdispositivo. Todos los elementos del sistema fueron esterilizados previo su uso, bien en autoclave para aquellos elementos resistentes a la temperatura o bien por lavados con alcohol etílico al 70% en agua destilada y agua destilada estéril. Ningún signo de contaminación se observó en los sistemas a flujo así esterilizados.

Como fuente de presión para impulsar el líquido se empleó la línea de aire a presión de las instalaciones del I3A, capaz de generar una presión estable y continuada de hasta 6 atmósferas de presión. El circuito fluídico empleado estaba compuesto, en orden desde la fuente de presión, de: un filtro de acetato de celulosa estéril de 0.20 μ m de poro (JZ-02915-90, Cole-Parmer) con el objeto de filtrar contaminantes procedentes de la línea de aire a presión, un manómetro de 0 a 2 atmósferas para regular la presión de aire, una botella de pírex de 100 ml, que actuó como reservorio del medio de cultivo, con cuello de botella GL45 que permite acoplar una tapa roscada para cromatografía líquida de alta presión con tres puertos GL14 roscados (11 297 51, Duran) con adaptadores para acoplar tubos rígidos de 1,6 mm (11 298 15, Duran) de diámetro externo, un tubo de Teflon® FEP de 50 cm de 1,6 mm de diámetro externo y 100 μ m de diámetro interno, que actuó como resistencia fluídica del sistema para reducir el valor del caudal con respecto a la presión ejercida, que se conectó a un sensor de flujo LG16 (SENSRION®) para caudales de 1 a 50 μ l/min, el encapsulado descrito anteriormente, que actúa como herramienta de traducción de escala entre las estructuras en la microescala del interior del microdispositivo y los elementos macroscópicos, y finalmente, una segunda botella de pírex de 100 ml abierta a la presión atmosférica a través de un filtro de celulosa de 0.22 μ m de poro que actuó como colector del medio efluído a la salida del circuito. Todos los elementos se conectaron entre si a través de tubos rígidos de plástico (Tygon, FEP o PVC) (figura 1.4).

Tras cuatro horas de incubación para permitir la adhesión celular al sustrato, los microdispositivos se colocaron en el encapsulado diseñado para actuar como herramienta de conexión entre el microdispositivo y un sistema de flujo auxiliar externo. Durante el proceso de colocación y cierre se produjo de manera continuada la aparición de burbujas de aire en los microcanales del microdispositivo, que fueron introducidas de manera accidental durante el cierre del encapsulado. Para evitar esto, se modificó el protocolo de montaje del encapsulado cebando el sistema de flujo primero empleando

un microdispositivo de cebado sin células que permitiera la conexión fluidica del circuito fluidico a través del encapsulado y el microdispositivo. Una vez cebado el circuito fluidico completamente se procedió al cambio del microdispositivo de cebado por el microdispositivo de cultivo. Para evitar introducir aire en el interior de las estructuras del microdispositivo se colocó una gota de 2 μ l cubriendo las entradas fluidicas del microdispositivo, tras lo cual se procedió al cierre del conjunto. A pesar de las medidas tomadas para evitar insertar aire en el interior de los canales no se pudo eliminar por completo la inserción accidental de aire en los microdispositivos. Una vez conectados los microdispositivos sembrados al circuito fluidico, se impuso un flujo de 38 μ l/min, que se corresponde un valor de la tensión de corte (τ) de 0.5 dina/cm², durante un periodo de 72 horas.



Figura 1.4. Diagrama de bloques mostrando la posición relativa de los distintos componentes del circuito fluidoico entre sí. Las flechas indican la dirección de desplazamiento del fluido, bien sea aire (flechas azules) entre la fuente de presión, el nanómetro y el reservorio, o medio de cultivo desde el reservorio hasta el colector situado al final del circuito (flechas rojas).

MICROSCOPIA Y ANALISIS DE IMAGEN

Las imágenes de microscopia de fluorescencia fueron tomadas de los microdispositivos en la zona de los canales usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E (Nikon) acoplado a una cámara en blanco y negro de alta resolución Luca R (Andor). Las imágenes fueron procesadas empleando dos programas de análisis y procesamiento de imágenes; el comercial NIS Elements Advance Research (Nikon) y el libre FIJI/ImageJ(Schindelin et al. 2012). El conteo celular en los microdispositivos se realizó empleando el plugin “cell counter” de FIJI. El análisis morfológico se realizó empleando el plugin “particle analyzer” integrado en FIJI a partir de un análisis de umbral de imágenes binarias generadas a partir de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia registrándose los valores de los descriptores morfológicos relación de aspecto, circularidad y redondez para células independientes en los microdispositivos.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el software libre R. Para cada grupo de valores se obtuvo su media aritmética y se calculó el error estándar de la media como medida de dispersión de los valores del grupo con respecto a esta. Los análisis de relación entre variables cuantitativas se obtuvieron a través de una prueba t de Student apareada con un intervalo de confianza del 5% ($p=0,05$).

RESULTADOS

SIEMBRA Y CULTIVO CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS DE SU-8

La distribución de las células tras la siembra manual a lo largo de las cámaras de cultivo resultó homogénea, sin que se observara una dispersión anómala de las células en la superficie de cultivo de los microdispositivos. Ambos tipos celulares empleados para evaluar la ventana de adhesión celular en los microdispositivos; MC3T3 (figura 1.5.a)) y LLC-PK1 (figura 1.6.a)), se distribuyeron homogéneamente a lo largo de las cámaras de cultivo sin la formación de agregados celulares ni distribuciones anormales a lo largo de la cámara debido a perfiles de flujo inesperados en el microdispositivo durante la siembra manual. Estos resultados validaron la carga manual de los microdispositivos como método de siembra, siendo la viabilidad en los microdispositivos de las células adheridas fue superior al 99% para ambos tipos celulares a tiempos de 1 a 4 horas.

ADHESION CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS DE SU-8

La aparición de pequeños patrones hexagonales en forma de panal de abeja en los dispositivos de SU-8 fabricados empleando máscaras poliméricas sugirió la posibilidad de alteraciones en la superficie del SU-8 debido al empleo de estas máscaras, al reducirse drásticamente la aparición de estos patrones al usar máscaras de pírex. Para evaluar el potencial efecto de esta variación en la superficie se determinaron las ventanas de adhesión celular para dispositivos fabricados con ambos tipos de máscaras. Se emplearon dos tipos celulares distintos, células renales LLC-PK1 como modelo de células de tipo epitelial y preosteoblastos MC3T3.

En los microdispositivos de SU-8 fabricados usando máscaras de pírex se puede observar un mayor número de células adheridas con respecto a los fabricados empleando máscaras de película polimérica para todos los tiempos (1-4 horas) y ambos tipos celulares (figura 1.5.a)) y figura 1.6.a)) En el caso de las MC3T3 (figura 1.5.b)) el número de células adheridas por unidad de superficie tras una hora de incubación fue de $248,33 \pm 35,60$ células/mm² en los dispositivos fabricados con máscaras de película polimérica frente a $298,11 \pm 18,60$ células/mm² en los dispositivos fabricados con máscaras de pírex. A las dos horas, se contabilizaron en la cámara de cultivo $208,56 \pm 21,89$ células/mm² para película polimérica frente a $335,56 \pm 11,35$ células/mm² para pírex, a las tres horas $248,89 \pm 19,69$ células/mm² para película polimérica frente a $309,89 \pm 4,95$ células/mm² y finalmente a las cuatro horas se contabilizaron $250,67 \pm 24,01$ células/mm² para película polimérica frente a $336,22 \pm 17,73$ células/mm² para pírex. Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas para los tiempos de adhesión de dos horas, tres horas y cuatro horas. En caso de las LLC-PK1 (figura 1.6.b)) las diferencia entre el número de células adheridas en la cámara por unidad de superficie entre ambos grupos fue mayor que con respecto a las MC3T3. Tras una hora en los dispositivos fabricados con máscaras de película polimérica se contabilizaron $333,67 \pm 31,06$ células/mm² frente a $580,78 \pm 40,28$ células/mm² para los fabricados empleando máscaras de pírex. A las dos horas, se contabilizaron $314,78 \pm 37,74$ células/mm² para película polimérica frente a $549,78 \pm 17,71$ células/mm² para pírex, a las tres horas $281,00 \pm 23,17$ células/mm² para película polimérica frente a

616,22 ± 19,27 células/mm² para pírex y finalmente a las cuatro horas se contabilizaron 303,44 ± 9,27 células/mm² para película polimérica frente a 711,56 ± 14,21 células/mm² para pírex.

Tras comprobar las diferencias en el número de células adheridas a lo largo del tiempo entre ambos tipos celulares, se estudió la morfología de células independientes en las cámaras de cultivo de los microdispositivos, tanto fabricados con máscara de polimérica como fabricados con máscara de pírex, durante las primeras 4 horas de cultivo a intervalos de 1 hora (figura 1.7.a) y figura 1.8.a)). Debido a que la adhesión celular puede considerarse como un fenómeno cooperativo en el que la interacción entre células puede facilitar su adhesión (McCain et al. 2012) para evaluar los parámetros morfológicos se estudiaron células aisladas. La morfología celular se evaluó a través de tres descriptores morfológicos: relación de aspecto, circularidad y redondez.

La relación de aspecto es un indicador de la polarización celular, siendo significativamente mayor para el caso de las células sembradas en dispositivos fabricados con máscaras de pírex, con respecto a las células en dispositivos fabricados con máscaras poliméricas durante las dos primeras horas de la ventana de adhesión. Para el caso de MC3T3 en microdispositivos de SU-8 (figura 1.7.b)) fabricados con máscaras poliméricas la relación de aspecto fue de 1,24 ± 0,04 frente a 2,08 ± 0,41 para los microdispositivos fabricados con máscaras de pírex en la primera hora. A las dos horas los valores de relación de aspecto fueron de 1,17 ± 0,04 en polimérica frente a 2,44 ± 0,56 en pírex. A tres horas los valores fueron de 2,54 ± 0,46 en polimérica frente a 2,87 ± 0,27 en pírex y finalmente 2,67 ± 0,53 en polimérica frente a 2,98 ± 0,68 en pírex a las cuatro horas de la siembra. En el caso de las células epiteliales (figura 1.8.b)) los valores de relación de aspecto fueron menores que los encontrados para el caso de los preosteoblastos, lo que puede ser explicado debido al comportamiento de las LLC-PK1 como célula de tipo epitelial. Aun así, se observó diferencia significativa en la relación de aspecto entre células sembradas en dispositivos fabricados con máscaras poliméricas y máscaras de pírex en las dos primeras horas de adhesión, siendo mayor en las últimas. La relación de aspecto para células epiteliales LLC-PK1 poliméricas fue de 1,24 ± 0,05 en la primera hora, frente a 1,53 ± 0,08 para pírex. En la segunda hora de adhesión los valores de relación de aspecto fueron de 1,48 ± 0,07 para polimérica frente a 1,71 ± 0,13 en pírex. En la tercera hora 1,65 ± 0,11 en polimérica frente a 1,78 ± 0,20 para pírex. Finalmente, a las cuatro horas los valores de relación de aspecto para polimérica fueron de 1,61 ± 0,08 frente a 1,63 ± 0,12 en pírex. La diferencia significativa en la relación de aspecto entre las células, tanto LLC-PK1 como MC3T3, sembradas en microdispositivos de SU-8 fabricados con máscaras de pírex respecto a las fabricadas con máscaras poliméricas en las dos primeras horas de la ventana de adhesión evaluada sugieren una interacción facilitada entre las células y el sustrato de cultivo generado por exposición a través de una máscara de pírex que frente al generado por exposición de la superficie a través de una máscara polimérica.

Consecuentemente, se encuentran diferencias significativas durante las dos primeras horas de adhesión tanto en circularidad como en redondez de las células, tanto LLC-PK1

como MC3T3, entre las células sembradas en microdispositivos de SU-8 fabricados con máscaras poliméricas como con máscaras de pírex. En el caso de la circularidad (figura 1.7.c)), las diferencias más grandes se encuentran para las MC3T3 donde los valores para células en dispositivos fabricados con máscaras poliméricas son de $0,88 \pm 0,01$ frente a $0,58 \pm 0,10$ en máscaras de pírex tras una hora de adhesión en los dispositivos. A las dos horas los valores son de $0,79 \pm 0,11$ en polimérica frente a $0,53 \pm 0,08$ en pírex. La diferencia deja de ser significativa a partir de las tres horas en donde el valor para las células en dispositivos poliméricos es de $0,58 \pm 0,09$ frente a $0,64 \pm 0,06$ en pírex. Finalmente, a las cuatro horas los valores de circularidad de células MC3T3 en polimérica fue de $0,54 \pm 0,07$ frente a $0,44 \pm 0,06$ en pírex. En el caso de las LLC-PK1 (figura 1.8.c)) la diferencia de circularidad entre las células sembradas en los distintos sustratos es menor que para las MC3T3, debido principalmente a la diferente morfología entre ambos tipos celulares. Aun así, las diferencias siguen siendo significativas entre las células sembradas en dispositivos fabricados con máscaras poliméricas y los fabricados con máscaras de pírex. Tras una hora de cultivo en los microdispositivos la circularidad de las LLC-PK1 en polimérica era de $0,88 \pm 0,01$ frente a $0,80 \pm 0,02$ en pírex. A las dos horas los valores fueron de $0,82 \pm 0,02$ en polimérica frente a $0,71 \pm 0,03$ en pírex. Al igual que para el caso de las MC3T3 a partir de la tercera hora la diferencia entre células LLC-PK1 en dispositivos de SU-8 fabricados con máscaras poliméricas con respecto a las células en dispositivos fabricados con máscaras de pírex deja de ser significativa, siendo de $0,74 \pm 0,03$ para poliméricas y de $0,74 \pm 0,04$ para pírex. Finalmente, a las cuatro horas de adhesión los valores de circularidad fueron de $0,74 \pm 0,02$ en poliméricas frente a $0,77 \pm 0,03$ en pírex. La diferencia significativa en las dos primeras horas indica una mayor capacidad de las células de extenderse y polarizarse a lo largo del sustrato y por lo tanto una mayor capacidad de interaccionar con este.

Para el caso de la redondez, descriptor morfológico que indica la proporción de células con morfología redondeada, la mayor discrepancia entre valores se da para las MC3T3 debido, una vez más, a las diferencias morfológicas de este tipo celular con las LLC-PK1. Esto se traduce en que mientras para las MC3T3 la diferencia significativa entre células en máscara polimérica y máscara de pírex se mantiene durante las dos primeras horas al igual que el resto de los descriptores morfológicos para las LLC-PK1 la diferencia es significativa únicamente tras la primera de adhesión en los microdispositivos. Para el caso de las MC3T3 (figura 1.7.d)) los valores de redondez entre células sembradas en dispositivos fabricados con máscara polimérica y máscara de pírex son de: $0,81 \pm 0,02$ en polimérica frente a $0,62 \pm 0,10$ en pírex tras una hora de adhesión, $0,85 \pm 0,02$ frente a $0,51 \pm 0,10$ a las dos horas, $0,47 \pm 0,07$ frente a $0,57 \pm 0,05$ a las tres horas y finalmente $0,44 \pm 0,07$ frente a $0,40 \pm 0,07$ a las cuatro horas. Para las LLC-PK1 (figura 1.8.d)), los valores de redondez, para células en dispositivos fabricados con máscaras poliméricas y células en dispositivos fabricados con máscaras de pírex, fueron de respectivamente: $0,80 \pm 0,02$ frente a $0,68 \pm 0,03$ a una hora, $0,72 \pm 0,03$ frente a $0,64 \pm 0,05$ tras dos horas, $0,66 \pm 0,04$ frente a $0,66 \pm 0,06$ a las tres horas y finalmente $0,66 \pm 0,03$ frente a $0,66 \pm 0,04$ tras cuatro horas de adhesión.

Los tres descriptores morfológicos elegidos para caracterizar la adhesión celular al sustrato de SU-8, relación de aspecto, circularidad y redondez, coincidieron en señalar mayor polarización e interacción más temprana de las células, tanto LLC-PK1 como MC3T3, con la superficie de las cámaras de cultivo de los dispositivos fabricados empleando máscaras de pírex.

Finalmente, se estudió la distribución de la elongación de las células adheridas en ambos tipos de microdispositivos. Para esto las células se distribuyeron en tres grupos atendiendo al criterio de relación de aspecto, se distinguieron tres grupos: BAJO nivel de polarización agrupando células con una relación de aspecto inferior a 1,5, nivel de polarización MEDIO bajo el cual se agruparon a las células con una relación de aspecto entre 1,5 y 2 y ALTO nivel de polarización para células con una relación de aspecto superior a 2. Como puede verse en la figura 1.7.e), los preosteoblastos MC3T3 tras una hora de adhesión mostraron diferencias significativas en la distribución entre las células adheridas en los microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas (BAJO= 90,87% \pm 0,74%, MEDIO= 8,13% \pm 0,25% y ALTO= 1,00 \pm 0,35%) frente a las adheridas en microdispositivos fabricados con máscaras de pírex (BAJO= 50,00% \pm 1,46%, MEDIO= 12,46% \pm 0,46% y ALTO= 37,54% \pm 0,23%), estas diferencias en la distribución en las poblaciones entre poliméricas (BAJO= 73,13% \pm 1,80%, MEDIO= 24,85% \pm 0,80% y ALTO= 2,02% \pm 0,40%) y pírex (BAJO= 33,33% \pm 2,28%, MEDIO= 33,34% \pm 1,28% y ALTO= 33,33% \pm 1,78%) se mantuvieron tras dos horas en los microdispositivos. A pesar de que el valor medio de la relación de aspecto tras tres horas de adhesión entre los dos tipos de microdispositivos no eran significativamente distintos, la distribución de las células en función de su relación de aspecto entre microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas (BAJO= 45,21 \pm 1,62%, MEDIO= 39,52% \pm 2,85% y ALTO= 22,00% \pm 1,86%) frente a los fabricados con máscaras de pírex (BAJO= 45,21 \pm 1,62%, MEDIO= 13,33% \pm 6,85% y ALTO= 47,15% \pm 3,85%) resultó si serlo, indicando diferencias en la capacidad de interacción de las células con el sustrato en dependencia de su proceso de fabricación. Finalmente, tras cuatro horas de adhesión las distribuciones se igualan entre microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas (BAJO= 16,67 \pm 1,66%, MEDIO= 36,67% \pm 1,57% y ALTO= 46,66% \pm 2,17%) y máscaras de pírex (BAJO= 15,00 \pm 1,03%, MEDIO= 40,00% \pm 2,33% y ALTO= 45,00% \pm 3,03%).

Las variaciones en la distribución de las células LLC-PK1 (figura 1.8.e)) atendiendo a su relación de aspecto fueron menores debido al carácter epitelial de las mismas, con un menor porcentaje de células en el grupo ALTO. Aun así, se pudieron observar variaciones significativas entre la distribución de las células adheridas atendiendo a su morfología desde la primera hora de adhesión en los microdispositivos, siendo significativas para todos los grupos entre los microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas (BAJO= 84,00% \pm 1,09%, MEDIO= 12,00% \pm 0,94% y ALTO= 4,00% \pm 0,64%) y máscaras de pírex (BAJO= 44,10% \pm 0,63%, MEDIO= 39,10% \pm 1,63% y ALTO= 16,00% \pm 0,83%). Esta desigualdad significativa en la distribución entre los microdispositivos fabricados con los dos tipos de máscaras diferentes, polimérica (BAJO= 63,98% \pm 1,48%, MEDIO= 28,17% \pm 0,48% y ALTO= 7,85% \pm 0,78%) y pírex (BAJO= 50,21% \pm 1,47%, MEDIO= 6,05% \pm 2,47% y ALTO= 43,74% \pm 1,76%), continuó presente tras dos horas de adhesión. Al

igual que en el caso anterior para las MC3T3, a las tres horas de adhesión en los dispositivos a pesar de que no existiera una variación significativa entre la relación de aspecto media de los dos tipos de dispositivos, si se pudo observar una variación significativa, en términos estadísticos, entre las distribuciones celulares en los dispositivos fabricados con máscaras poliméricas (BAJO= 56.11% \pm 2,14%, MEDIO= 20,01% \pm 1,11% y ALTO= 23,88% \pm 1,74%) y máscaras de pírex (BAJO= 49,90% \pm 2,06%, MEDIO= 12,60% \pm 2,56% y ALTO= 37,50% \pm 0,57%). Tras cuatro horas de adhesión en los microdispositivos, las distribuciones entre los grupos se aproximaron para ambos tipos de microdispositivos, fabricados con máscaras poliméricas (BAJO= 40,00% \pm 1,62%, MEDIO= 44,00% \pm 0,82% y ALTO= 16,00% \pm 0,75%) y pírex (BAJO= 43,75% \pm 3,10%, MEDIO= 37,50% \pm 2,10% y ALTO= 18,75% \pm 1,80%).

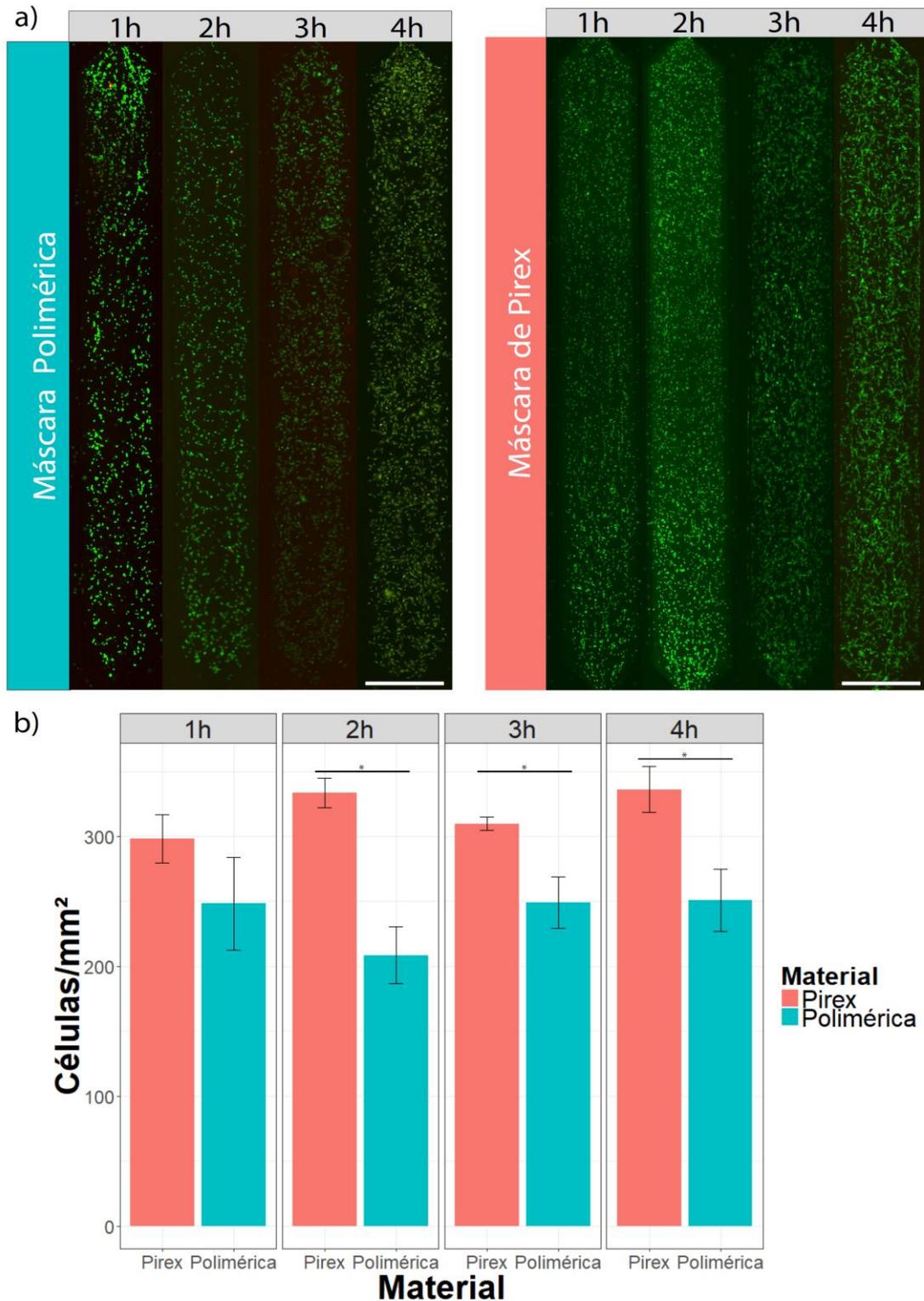


Figura 1.5. a) Adhesión y viabilidad celular de preosteoblastos MC3T3 en microdispositivos de SU-8. Imágenes compuestas de microscopía de fluorescencia a 2X de las cámaras de cultivo de microdispositivos de SU-8 fabricados empleando máscaras poliméricas o de pírex a tiempos de 1h a 4h con intervalos de 1h tras la siembra de una suspensión celular a $2,5 \cdot 10^6$ células/ml. La viabilidad celular se determinó empleando Calceína AM/Ioduro de propidio para distinguir entre células viables (verde) y no viables (rojo). La barra blanca en la imagen escala a 1mm. **b)** El gráfico de barras muestra las células adheridas por unidad de superficie a distintos tiempos para cada tipo de máscara empleada en fabricación acompañadas del error estándar de la muestra (n=100). La gráfica muestra la comparación entre materiales para cada tiempo señalando aquellas estadísticamente significativas con (*).

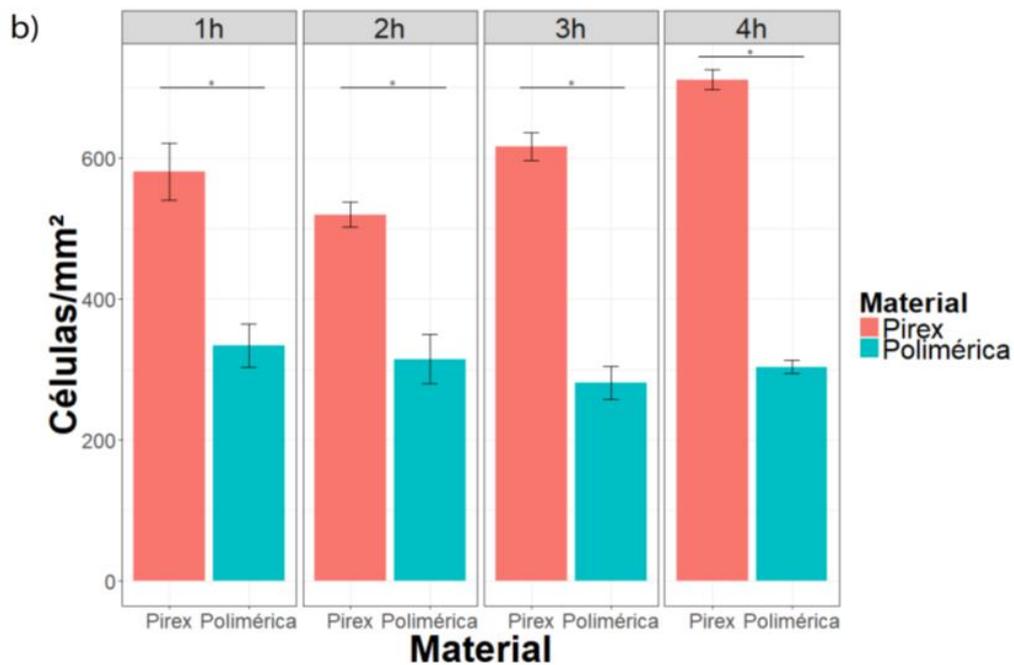
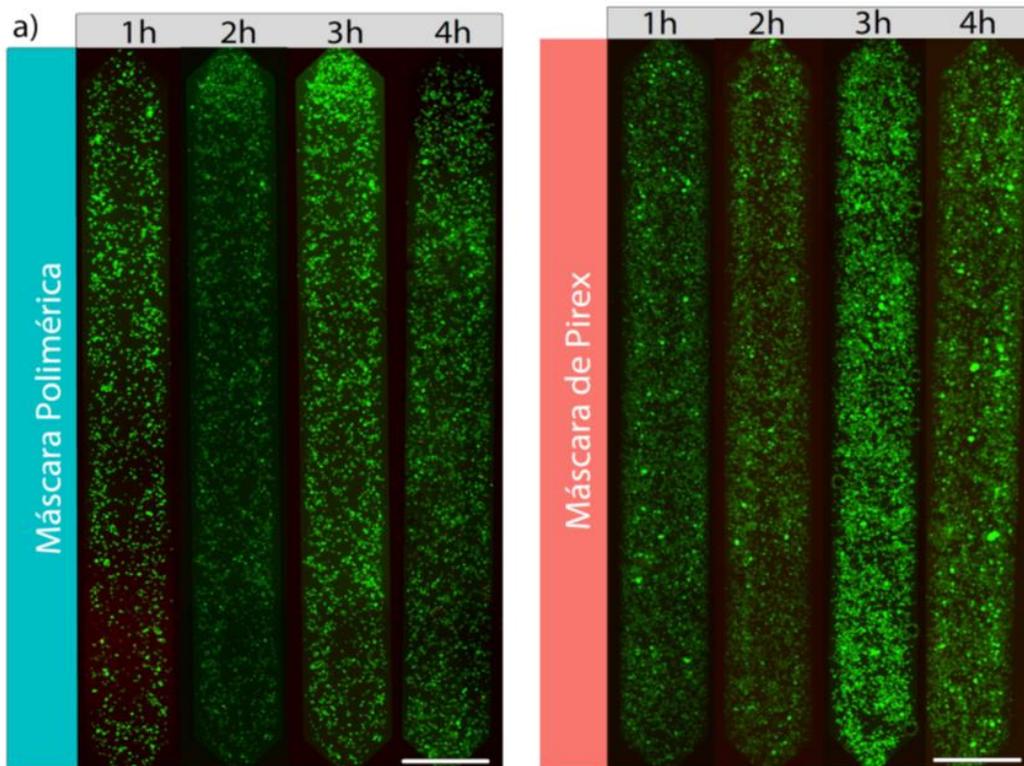


Figura 1.6. a) Adhesión y viabilidad celular de células epiteliales renales en microdispositivos de SU-8. Imágenes compuestas de microscopía de fluorescencia a 2X de las cámaras de cultivo de microdispositivos de SU-8 fabricados empleando máscaras poliméricas o de pírex a tiempos de 1h a 4h con intervalos de 1h tras la siembra de una suspensión celular a $2,5 \cdot 10^6$ células/ml. La viabilidad celular se determinó empleando Calceína AM/Ioduro de propidio para distinguir entre células viables (verde) y no viables (rojo). La barra blanca en la imagen escala a 1mm. **b)** El gráfico de barras muestra las células adheridas por unidad de superficie a distintos tiempos para cada tipo de máscara empleada en fabricación acompañadas del error estándar de la muestra ($n=100$). La gráfica muestra la comparación entre materiales para cada tiempo señalando aquellas estadísticamente significativas con (*).

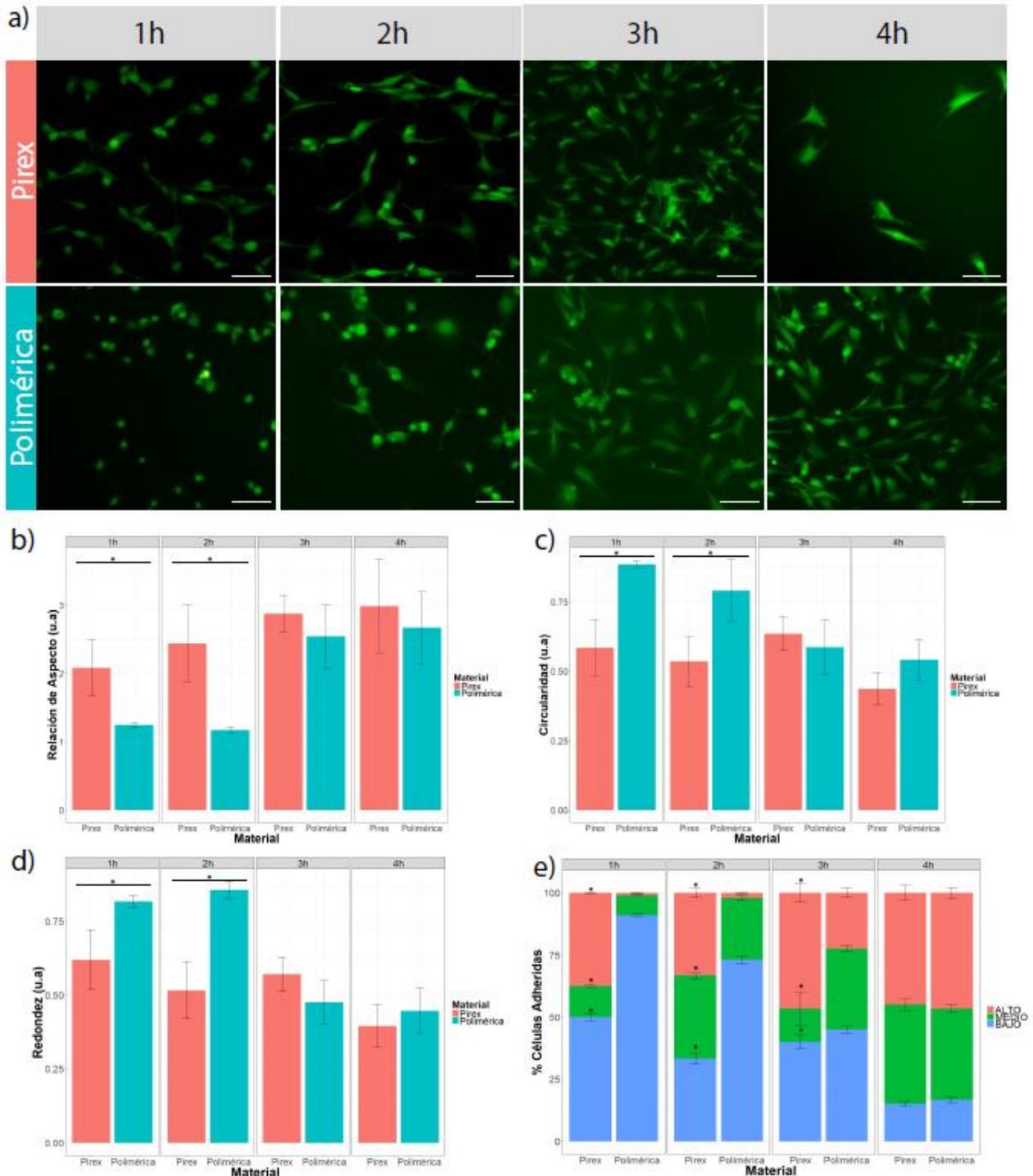


Figura 1.7. a) Análisis de la morfología celular durante la adhesión de preosteoblastos MC3T3 en microdispositivos de SU-8. Imágenes de microscopía de fluorescencia a 10X de las cámaras de cultivo de microdispositivos de SU-8 fabricados empleando máscaras poliméricas o de pírex a tiempos de 1h a 4h con intervalos de 1h tras la siembra de una suspensión celular a $2,5 \cdot 10^6$ células/ml. La viabilidad celular se determinó empleando Calceína AM/Ioduro de propidio para distinguir entre células viables (verde) y no viables (rojo). La barra blanca en la imagen escala a 100 μm. Para el análisis morfológico de las células durante la adhesión se seleccionaron 3 descriptores gráficos: **b) Relación de aspecto**, **c) Circularidad** y **d) Redondez**. Los gráficos de barras muestran el valor medio para cada descriptor gráfico acompañado del error estándar para cada grupo (n=100). **e) Porcentaje de células adheridas según su relación de aspecto**, el porcentaje de células adheridas se distribuyó en tres grupos **ALTO** (relación de aspecto >2), **MEDIO** (relación de aspecto entre 1,5 y 2) y **BAJO** (relación de aspecto <1,5). La gráfica de barras apiladas muestra el valor medio del porcentaje de células para cada grupo junto con el error estándar para cada grupo. En todos los casos las diferencias significativas entre grupos se señalan en la gráfica con (*).

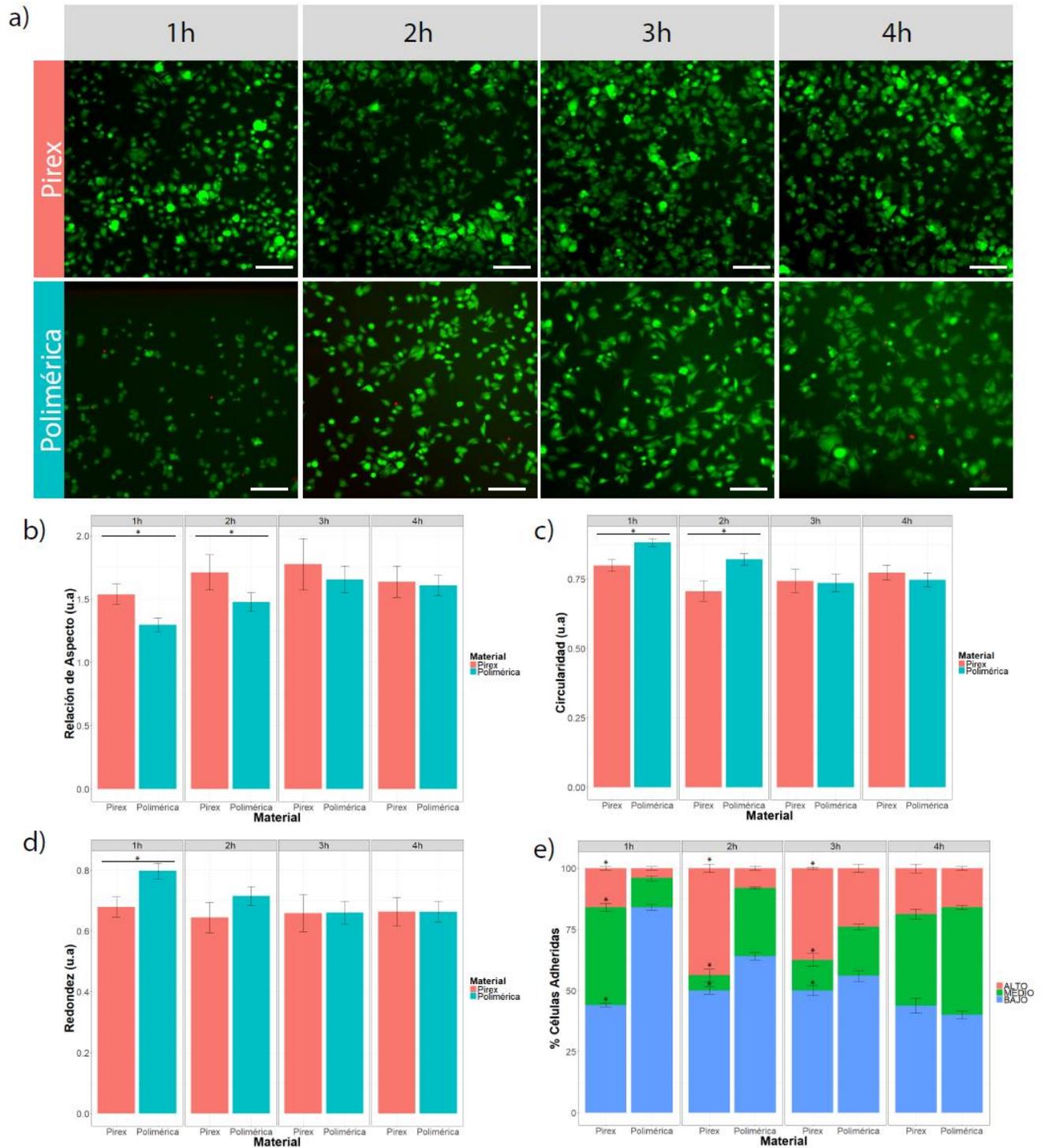


Figura 1.8. a) Análisis de la morfología celular durante la adhesión de células epiteliales renales LLC-PK1 en microdispositivos de SU-8. Imágenes de microscopia de fluorescencia a 10X de las cámaras de cultivo de microdispositivos de SU-8 fabricados empleando máscaras poliméricas o de pírex a tiempos de 1h a 4h con intervalos de 1h tras la siembra de una suspensión celular a $2,5 \cdot 10^6$ células/ml. La viabilidad celular se determinó empleando Calceina AM/Ioduro de propidio para distinguir entre células viables (verde) y no viables (rojo). La barra blanca en la imagen escala a 50 μm. Para el análisis morfológico de las células durante la adhesión se seleccionaron 3 descriptores gráficos: **b) Relación de aspecto**, **c) Circularidad** y **d) Redondez**. Los gráficos de barras muestran el valor medio para cada descriptor gráfico acompañado del error estándar para cada grupo (n=100). **e) Porcentaje de células adheridas según su relación de aspecto**, el porcentaje de células adheridas se distribuyó en tres grupos **ALTO** (relación de aspecto >2), **MEDIO** (relación de aspecto entre 1,5 y 2) y **BAJO** (relación de aspecto <1,5). La gráfica de barras apiladas muestra el valor medio del porcentaje de células para cada grupo junto con el error estándar para cada grupo. En todos los casos las diferencias significativas entre grupos se señalan en la gráfica con (*).

Las HUVEC fueron sembradas en microdispositivos fabricados con máscaras de pírex y poliméricas, obteniéndose una distribución homogénea de las células en la cámara de cultivo. Tras cuatro horas de incubación se pudo comprobar la presencia de una monocapa en los microdispositivos fabricados con máscaras de pírex como se puede observar en la figura 1.9, extendiéndose a lo largo de la cámara de cultivo del microdispositivo, sin mostrar signos evidentes de deterioro de la misma. En los microdispositivos fabricados con máscaras de pírex, se pudo observar la presencia de pequeñas áreas sin células formando parches a lo largo de las monocapas. Las células adheridas mostraron su característica morfología de “adoquines” (Morigi et al. 1995), propia de este tipo celular al formar monocapa, sin exhibir signos evidentes de estrés o muerte celular. Los microdispositivos sembrados, se conectaron a un circuito auxiliar de flujo para permitir establecer flujo a través de estos. Las HUVEC fueron sometidas a perfusión continuada de medio a una tensión de corte (τ) de 0,5 dina/cm². Transcurridas 8 horas tras la siembra y 4 de perfusión se pudo observar como los microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas la monocapa comenzaba a perder su integridad observándose retracción de la misma y arrastre de células por el flujo. En contraste, en los dispositivos fabricados con máscaras de pírex, aunque se pudo observar el arrastre de algunas células a consecuencia del flujo la integridad de la monocapa permanecía a lo largo de la cámara de cultivo. Tras 72 horas tras la siembra en los microdispositivos, en aquellos fabricados con máscaras poliméricas la monocapa había desaparecido con únicamente grupos de células agrupados en islotes y con una morfología impropia de este tipo celular. En cambio, en los dispositivos fabricados con máscaras de pírex se pudo observar la presencia de monocapas integra con células presentando la morfología característica de las células endoteliales, sin observarse signos evidentes de stress o muerte celular.

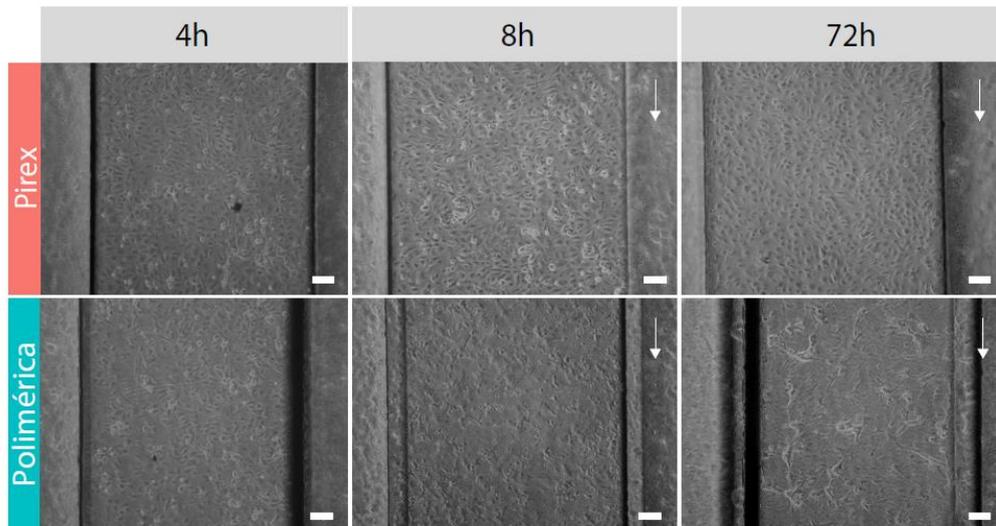


Figura 1.9. Monocapa de HUVEC a flujo en microdispositivos de SU-8. Imágenes compuestas de microscopía de campo claro empleando objetivo de 10X aumentos de monocapas de HUVEC sometidas a una τ de 0,5 dina/cm² en microdispositivos fabricados con máscaras de pírex o máscaras poliméricas. Las imágenes fueron tomadas tras el acople del microdispositivo a un circuito auxiliar de flujo mediado a través del encapsulado. En las imágenes se puede observar el estado de las monocapas a distintos tiempos medidos tras la siembra celular de los microdispositivos. La barra blanca en las imágenes escala a 1 mm, mientras que la dirección del flujo aplicado a través de los microdispositivos es señalada con una flecha blanca en las imágenes.

DISCUSION

El desarrollo de un nuevo dispositivo de microfluídica es un proceso complejo que requiere de múltiples etapas de diseño, prueba y rediseño del modelo hasta alcanzar un prototipo final. Si bien es posible simular el comportamiento fluídico en un prototipo microfluídico con precisión a través de métodos numéricos de cálculo (Rapp 2017), es muy difícil anticipar los problemas y limitaciones que pueden surgir durante la fabricación o el uso experimental de un prototipo microfluídico. Más aún, si se requiere de la interacción o conexión del prototipo con otros elementos fluídicos en desarrollo. Esto, hace necesario el disponer de métodos rápidos de prototipado que puedan integrarse a pequeña escala para la producción de prototipos a nivel de laboratorio. Siendo además deseable que los materiales empleados en el proceso sean los finales en los que se va a desarrollar el modelo final o, al menos, que compartan similitudes en cuanto a propiedades y comportamiento. La elección de materiales, para el prototipado rápido de dispositivos microfluídicos, se vuelve aún más restrictiva en el caso de dispositivos destinados al uso en cultivo celular. Donde las propiedades y composición del material pueden afectar la respuesta biológica obtenida de las células en cultivo.

Sin embargo, en el desarrollo de nuevos dispositivos de microfluídos para el cultivo celular, principalmente en el mundo académico, la gran mayoría de los prototipos están desarrollado en PDMS. En contraste, con el extendido uso del poliestireno como material base para elementos de cultivo celular. El uso de PDMS supone una limitación a la hora de trasladar un posible prototipo del mundo académico al industrial, en donde predominan los sistemas de inyección de plásticos. Además, el comportamiento

mecánico del PDMS o su permeabilidad a gases son completamente diferentes de los del poliestireno, lo que puede conducir a respuestas celulares completamente distintas en ambos materiales. En especial, al estudiar fenómenos celulares en los que una de estas diferencias juegue un papel capital en la respuesta celular. El uso de fotorresinas poliméricas como el SU-8 como material de prototipado rápido para el desarrollo de prototipos microfluídicos destinados al cultivo celular. El SU-8 se situaría en un punto medio entre las diferencias que separan el PDMS y el poliestireno. A nivel de fabricación a pequeña escala a nivel de laboratorio está más que probado su uso. Tanto, como material de elección en el desarrollo de dispositivos microelectromecánicos, dispositivos microfluídicos como en la fabricación de moldes maestros para el moldeo de dispositivos microfluídicos en PDMS. En cuestiones de propiedades del material, el SU-8 tiene un comportamiento más próximo al poliestireno u otros termoplásticos que el PDMS.

Una de las principales similitudes entre el SU-8 y termoplásticos como el poliestireno es la baja permeabilidad al paso de gases. Lo que, en parte, resulta una ventaja al evitar la evaporación del medio contenido en el microdispositivo en forma de vapor de agua como sucede en el caso del PDMS. Sin embargo, la baja permeabilidad de gases limita la renovación de oxígeno en los microdispositivos fabricados íntegramente en SU-8. Esto, permite tener un control preciso de la concentración de oxígeno en el interior del microdispositivo. Siendo la renovación de oxígeno en el interior del dispositivo posible a través de dos procesos, bien de forma pasiva a través de la difusión, que se ve muy limitada en función del diseño de las estructuras internas del microdispositivo, o de forma activa a través de cambios del medio provocados o mediados por el usuario. El recambio de medio activo en los microdispositivos requiere en primer lugar de la fijación de las células al sustrato de cultivo, para evitar arrastrar las células fuera del dispositivo durante la perfusión de medio fresco.

La adhesión celular es un proceso dinámico en el que las células establecen uniones físicas tanto al sustrato como a otras células del entorno mediante las distintas proteínas de adhesión expresadas en la membrana celular. Este fenómeno es altamente dependiente de la naturaleza tanto química (presencia de grupos polares que interaccionen con las proteínas de adhesión celular) como física (rugosidad, rigidez, etc.) de la superficie. Para evaluar el posible uso de la fotorresina SU-8 como material base para la fabricación de prototipos microfluídicos destinados a cultivo celular, se realizó un estudio a corto tiempo para evaluar la ventana de adhesión en un dispositivo íntegramente fabricado en SU-8. Inicialmente se estableció una ventana de estudio de 4 horas empleando dos tipos celulares distintos, los preosteoblastos MC3T3, con un comportamiento próximo al de fibroblastos, y las células renales LLC-PK1, de carácter epitelial. Los primeros resultados de siembra en los dispositivos, fabricados con máscaras de película polimérica, dieron lugar a valores peores a lo esperable para la adhesión celular en un sustrato polimérico cuya superficie había sido tratada para aumentar la energía libre de esta y facilitar la adhesión. Al estudiar con detalle los primeros microdispositivos se observó la presencia de patrones regulares de forma hexagonal agrupados en forma de estructuras con forma de panal de abeja. Estos

patrones se achacaron a posibles fenómenos de dispersión de la luz ultravioleta empleada para el curado de la resina al pasar por imperfecciones de la máscara de película polimérica. Por lo que se decidió repetir las máscaras en pírex como posible alternativa de fabricación observándose una reducción considerable en la aparición de patrones hexagonales en los dispositivos fabricados.

Para evaluar el posible impacto de la fabricación se decidió repetir los ensayos de adhesión usando microdispositivos fabricados con los distintos tipos de máscaras. Al comparar los resultados de adhesión de distintos tipos celulares, LLC-PK1 y MC3T3, en microdispositivos de SU-8 se pudo observar una diferencia en la adhesión celular en dependencia del tipo de máscara empleado en la fabricación de los microdispositivos. De forma consistente, se encontró un mayor número de células por unidad de área en los microdispositivos fabricados con máscaras de pírex que en los fabricados con máscaras de película polimérica a todos los tiempos (1 a 4 horas). Además, las células sembradas en los microdispositivos mostraron distinta morfología en función de la naturaleza de la máscara empleada en su fabricación. En los dispositivos fabricados con máscaras de pírex, las células comenzaron a adherirse y a cambiar de una morfología redondeada propia de células en suspensión hacia una morfología más característica de un cultivo bidimensional ya desde la primera hora tras la siembra. Mientras que en los microdispositivos fabricados con máscaras de película polimérica estos cambios necesitaron hasta 3 horas de adhesión en los microdispositivos para equipararse a los dispositivos fabricados con máscaras de pírex. Estas diferencias en la capacidad de adhesión celular sugieren que la naturaleza de la superficie puede ser dependiente del tipo de máscara empleada en la fabricación de los microdispositivos.

Para entender la posible fuente de estas diferencias es necesario considerar los cambios que sufre la fotorresina durante los pasos previos e inmediatamente posteriores a la exposición de la oblea. La composición del SU-8 50 es de un 69% (p/p) correspondiente a los monómeros de la fotorresina disueltos en γ -butirolactona y con un 10% (p/p) de una sal de hexafluoroantimoniato de arilsulfonio como fotoiniciador. Tras el proceso de "espineado" la cantidad de solvente remanente varía entre el 4% y el 24% (Martinez-Duarte and Madou 2011)(p/p) en función del espesor de la capa llegando hasta un 24% para capas mayores o iguales a 100 μm . El proceso de horneado suave de la oblea a 65°C reduce la cantidad de solvente en la resina depositada sin activar térmicamente el fotoiniciador, cuya temperatura de activación térmica es 120°C, pero por encima de 55°C punto de transición vítrea de la fotorresina sin polimerizar. Es durante la exposición a la luz UV, a una longitud de onda de 365 nm, a través de las máscaras donde se definen los canales y las cámaras internas de los microdispositivos. En este proceso el fotoiniciador genera un ácido fuerte de Lewis, en los lugares iluminados, que iniciara el proceso de polimerización en las áreas iluminadas. El siguiente proceso de horneado suave a 65°C de la oblea finaliza el entrecruzamiento de los monómeros de la matriz polimérica. La activación del fotoiniciador en el proceso de fabricación es dependiente exclusivamente de la exposición a luz UV, al no alcanzarse en ningún punto una temperatura superior a la temperatura de activación térmica del iniciador de 120°C.

Los productos de la activación del iniciador, tanto el ácido fuerte de Lewis como el anión hexafluoroantimoniato (SbF_6^-), por la presencia de antimonio (Gebel 1997)(De Boeck, et al. 2003), han sido señalados como los posibles agentes responsables de la toxicidad sobre células neuronales corticales del SU-8 completamente polimerizado (Vernekar et al. 2009). Las zonas expuestas de la fotorresina a la luz UV se enriquecen superficialmente en fotoiniciador y sus subproductos por un fenómeno de difusión lo que permite explicar la reducción del ángulo de contacto con agua de la resina polimerizada ligeramente por debajo de 90°C (Sikanen et al. 2005). Efecto que se ve incrementado al someter el material a tratamientos de plasma de oxígeno para incrementar la energía superficial del sustrato y generar grupos químicos capaces de interactuar con las proteínas de adhesión celular.

Las diferencias de comportamiento celular entre ambos juegos de microdispositivos pueden explicarse por las diferencias propias de las máscaras y su impacto en la fabricación. La resolución de las máscaras de película polimérica es dependiente de la resolución del fotoplóter empleado en su impresión y suelen presentar bordes más rugosos en las estructuras a definir (Martinez-Duarte & Madou 2011). Este fenómeno combinado con la presencia de defectos en la máscara y puede dar lugar a fenómenos de difracción de la luz UV (Stanciu 2012) y dar lugar a la presencia de material con un grado menor de polimerización en los microdispositivos, lo que puede producir un enriquecimiento por generación y difusión tanto del ácido fuerte como del SbF_6^- en el área destinada al cultivo celular así como la liberación de monómeros libres del polímero. Las máscaras de pírex al ser fabricadas por electrodeposición de metales generan bordes mejor definidos y debido a la transparencia del pírex a la luz UV son menos propensas a generar difracciones de la luz incidente al atravesar imperfecciones en la máscara.

Sin embargo, la hipótesis anterior parece no ser consistente con los valores de viabilidad obtenidos en los dos juegos de dispositivos, superiores en ambos casos al 99% para las células adheridas en los microdispositivos. Esto puede explicarse como un artefacto de la propia metodología seguida, al ser necesario teñir las células con los colorantes vitales se puede producir un arrastre de aquellas células que han resultado dañadas por contacto con los compuestos potencialmente tóxicos mencionados anteriormente o han sido incapaces de establecer interacciones con el sustrato del microdispositivo. Este lavado de células con pobre adhesión es intencionado al tratar de determinarse también que condición permitiría establecer flujo en las cámaras de manera más temprana. Si bien sería necesario determinar el potencial impacto de la toxicidad a plazos más largos, al estar este trabajo centrado en determinar la ventana de adhesión mínima de las células al material para permitir la renovación de medio en los microdispositivos. Debido a que la baja permeabilidad gaseosa del SU-8 limita el recambio de oxígeno en el interior de la cámara a la difusión mientras se permite la adhesión celular. Esta difusión se ve limitada por la longitud de los canales y la alta densidad celular sembrada en el dispositivo. Esta combinación de factores podría dar lugar a un gradiente de oxígeno debido al consumo celular en donde las células más cercanas a los canales tendrían un acceso preferencial al oxígeno que llega por difusión con respecto a las células en la

parte central de la cámara. Otra observación que parece apoyar la hipótesis de toxicidad debida al tipo de máscara empleada en la fabricación es el hecho de que para ambos tipos celulares se puede observar un incremento en el número de células adheridas en la cámara de los microdispositivos fabricados con máscaras de pírex con el paso del tiempo. En cambio, en los dispositivos fabricados con máscaras de película polimérica el número de células a lo largo del experimento disminuye en el caso de las LLC-PK1 y apenas sufre variación para el caso de las MC3T3.

La viabilidad del uso del SU-8 como material de prototipado para dispositivos de microfluídica optimizadas las condiciones de fabricación se comprobó a través de la siembra de células endoteliales primarias HUVEC en los microdispositivos fabricados con máscaras de pírex o poliméricas y su posterior mantenimiento a flujo por un periodo de 72 horas tras su siembra. Para permitir la perfusión de medio en los microdispositivos fue necesario el desarrollo de un encapsulado como elemento de conexión entre la escala microscópica del microdispositivo y la macroscópica del resto de elementos del circuito fluídico. Una de las principales limitaciones del SU-8 con respecto al PDMS es la necesidad de incorporar elementos que permitan la conexión del microdispositivo a un circuito fluídico externo. En el caso del PDMS debido a su naturaleza elástica, el circuito puede conectarse directamente al microdispositivo. Para el caso del SU-8, al igual que el de otros termoplásticos como el poliestireno, es necesario el desarrollo de elementos auxiliares que permitan realizar esa conexión.

El uso del encapsulado permitió la perfusión de medio a través del microdispositivo de manera continua durante 72 horas en células endoteliales sembradas en microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas o de pírex. En ambos microdispositivos tras cuatro horas se pudo observar la presencia de monocapas completas para el caso de los microdispositivos de SU-8 fabricados con máscaras de pírex. En cambio, en los microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas se pudo observar la presencia de pequeños parches sin células a lo largo de la monocapa establecida en los microdispositivos. Tras 4 horas de perfusión comenzaron a verse las primeras diferencias de comportamiento entre ambos tipos de microdispositivos, en los poliméricos comenzó a distinguirse retracción de la monocapa y pérdida de adhesión de las células al sustrato. En los dispositivos fabricados con máscaras de pírex, aunque si se observó arrastre de algunas células no se perdió la integridad de la monocapa. Tras 72 horas, la monocapa en los dispositivos fabricados con máscaras poliméricas había desaparecido apreciándose únicamente la presencia de pequeños islotes de células con una morfología impropia de las células endoteliales. Para los dispositivos fabricados en máscaras poliméricas se pudo observar la presencia de una monocapa continuada sin signos de deterioro y en las que las células mostraron su morfología típica de “adoquines”. Lo que sugiere que la posible toxicidad del material está ligada al tipo de superficie obtenida en función del tipo de materiales empleados en la fabricación de los microdispositivos.

La aparente toxicidad del SU-8 dependiente de las condiciones de fabricación limitan su uso como material de prototipado para fabricación de microdispositivos para

aplicaciones que requieran la adhesión celular en un microdispositivo íntegramente fabricado en SU-8. Si bien es cierto que el SU-8 se ha utilizado como sustrato de adhesión celular en diferentes en microestructuras (Torrejon et al. 2013), la relación entre la cantidad de SU-8 con respecto al volumen de medio experimental cultivo en condiciones estáticas es inferior al de las empleadas en un dispositivo íntegramente fabricado en SU-8. El cambio en las condiciones de fabricación contribuyo también en la mejora de los cultivos tridimensionales en microdispositivos de SU-8, permitiendo homogeneizar los resultados obtenidos entre distintas rondas de fabricación de microdispositivos. Esto, junto a las herramientas desarrolladas en este capítulo (encapsulados, sistemas de flujo), se empleó en el desarrollo de un modelo tridimensional para el estudio de la migración de especies celulares en gradientes autogenerados por las propias células aprovechando la baja permeabilidad de los gases del SU-8 (Jose Maria Ayuso et al. 2015).

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

La toxicidad superficial del SU-8 parece estar relacionada con la descomposición del fotoiniciador y la presencia de material no polimerizado en la cámara de cultivo. La interacción entre las máscaras y la luz UV empleada en la definición de las microestructuras del microdispositivo introduce una fuente de incertidumbre experimental, limitando el uso del material en aplicaciones que requieran de la adhesión celular a este.

La optimización de las condiciones de fabricación empleando máscaras de pírex en vez de máscaras poliméricas reduce la variabilidad en la adhesión. Incrementando de manera significativa el número de células adheridas, así como reduciendo el tiempo necesario para observarse cambios morfológicos asociados a la adhesión celular al sustrato.

El desarrollo de un encapsulado como elemento auxiliar que permitan la conexión entre la microescala del microdispositivo y la macroescala de un circuito auxiliar de flujo permiten la traducción de escalas y la realización de experimentos a flujo en condiciones controladas.

Es posible mantener monocapas de células endoteliales primarias, HUVEC, a flujo en dispositivos fabricados en SU-8 empleando máscaras de pírex por tiempos de hasta 72h preservando la morfología y la viabilidad celular. En los microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas, la integridad de la monocapa comienza a verse comprometida en las primeras horas de perfusión, habiendo desaparecido la monocapa a las 72h.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR EN ELASTOMEROS TERMOPLÁSTICOS BLANDOS E INTEGRACION EN UN ENCAPSULADO MULTIESCALA DE CONEXIÓN A SISTEMAS FLUÍDICOS LIBRE DE BURBUJAS

INTRODUCCIÓN

Una de las principales limitaciones en la aplicación de dispositivos microfluídicos como modelos experimentales destinados a cultivo celular en el campo de la investigación biomédica es la propia complejidad asociada tanto a la fabricación, como al uso de los propios dispositivos (Sackmann, et al. 2014). Como se ha visto en el capítulo anterior, la fabricación de los dispositivos por fotolitografía es un proceso costoso, en tiempo y recursos, que rinde un número relativamente bajo de dispositivos por cada iteración de fabricación comparado con las necesidades que pueden llegar a surgir en un experimental de cultivo celular (número de réplicas por condición, tipo celular, compuesto, etc.). Con la desventaja añadida de que, como se ha visto en el capítulo anterior, los procesos de fabricación pueden afectar de forma crítica a la viabilidad de uso de los microdispositivos en aplicaciones de cultivo celular. Lo que limita el uso de fotorresinas como el SU-8 en la fabricación de microdispositivos de cultivo pese a las ventajas que estas ofrecen con respecto al PDMS: estabilidad mecánica (Song et al. 2011), impermeabilidad al paso de gases y evaporación (Merkel et al. 2000), absorción de compuestos hidrofóbicos (Toepke et al. 2006) y recuperación del perfil hidrofóbico del material (Jokinen et al. 2012).

Una alternativa al uso de PDMS podría ser el uso de termoplásticos como materiales en la fabricación de dispositivos microfluídicos. Los termoplásticos no solo comparten las ventajas que ofrecen las fotorresinas como material frente al uso de PDMS, sino que además su uso está implementado universalmente en aplicaciones de cultivo celular. Termoplásticos tales como el poliestireno (PS) (usado como material base para la mayoría de los soportes de cultivo celular desechables), el policarbonato (PC), el polimetilmetacrilato (PMMA) o el cicloolefin copolímero (COC) han sido empleado con éxito no solo como material base en la fabricación de elementos de cultivo desechables comerciales (Amstein et al. 1975)(Curtis et al. 1983), sino también como materiales en la fabricación de sistemas personalizados a nivel experimental de laboratorio tanto en la escala macroscópica (Dich et al. 1992)(Lichtenberg et al. 2005) como en el desarrollo de dispositivos de microfluídos (Ogonczyk et al. 2010)(Young et al. 2011). A parte de las ventajas que ofrecen los termoplásticos como material y de su compatibilidad con aplicaciones de cultivo celular, los sistemas de escalado y fabricación a nivel industrial están muy desarrollados, lo que permitiría la producción masiva de los microdispositivos y su implementación comercial. Sin embargo, a la hora de implementar los termoplásticos en un proceso de microfabricación que permitiera el prototipado rápido y desarrollo a nivel de laboratorio es compleja. Por un lado, el coste técnico y económico de implementación de los sistemas de fabricación para termoplásticos son muy elevados, lo que limita su implementación a pequeña escala. Mientras que, por otro lado, la necesidad de unir físicamente las distintas partes que completan y cierran el microdispositivo es uno de los principales desafíos en el uso de termoplásticos como material en la fabricación de dispositivos de microfluídica. Esto es debido a que las características físicas de los microdispositivos y su finalidad como soportes de cultivo celular limitan el uso de las técnicas más comunes para la unión de piezas plásticas, tales

como la termocompresión o el pegado químico por solventes. En el caso de la termocompresión, la necesidad de preservar dimensiones y geometrías internas de los microdispositivos, para garantizar una correcta funcionalidad desde el punto de vista fluídico, dificulta su uso debido a las deformaciones sufridas por el material en el proceso de termocompresión (Tsao and DeVoe 2009). El uso de agentes químicos, generalmente solventes orgánicos, para pegar las distintas piezas del microdispositivo puede afectar negativamente las superficies destinadas al cultivo al afectar la naturaleza de las superficies a unir, bien al limitar la viabilidad del futuro cultivo por cuestiones de toxicidad o bien al afectar la transparencia óptica de la superficie impidiendo la observación por microscopía de las células en el microdispositivo.

Para tratar de solventar los problemas presentados tanto por el PDMS como material y las dificultades y limitaciones técnicas que presenta el uso de los termoplásticos, se ha introducido recientemente como material en la fabricación de microdispositivos los elastómeros termoplásticos blandos (ETBs) (Borysiak et al. 2013)(Lachaux et al. 2017). Estos elastómeros, o polímeros flexibles, son copolímeros resultantes de una combinación de bloques blandos, normalmente etileno/butileno que le otorgan propiedades elásticas propias de los elastómeros, combinados con bloques rígidos donde el termoplástico forma bloques cristalinos que otorgan a los ETBs las propiedades propias del termoplástico cristalizado (figura 2.1), variando las propiedades del material en función de la relación entre ambos bloques así como en la composición tanto de los cristales de termoplástico como de las cadenas que constituyen los bloques blandos. Así, los ETBs sitúan su comportamiento a mitad de camino entre el de los elastómeros, como

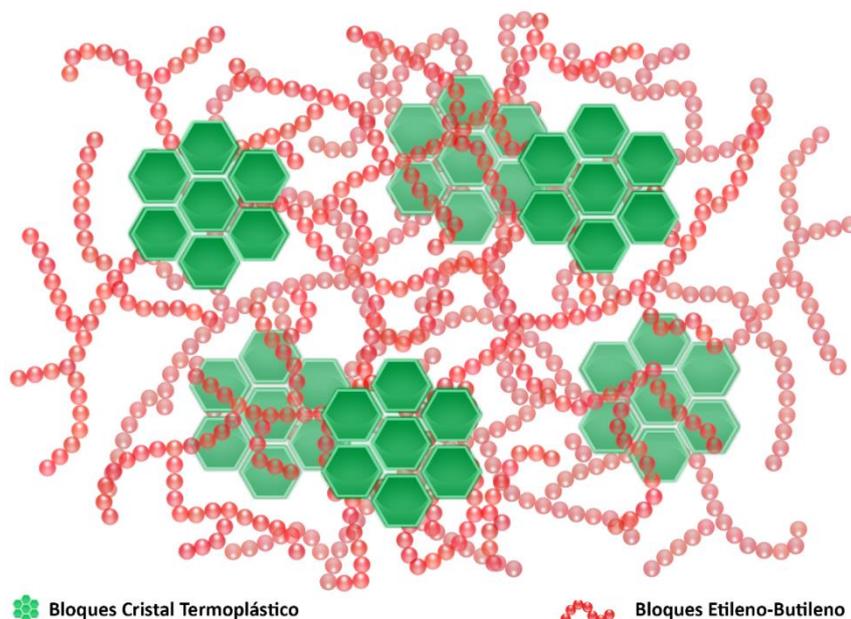


Figura 2.1. Estructura elastómero termoplástico blando. Los elastómeros termoplásticos blandos (ETBs) son copolímeros formados por dos tipos de bloques diferentes: los **bloques rígidos**, formados por cristales de termoplástico le otorgan a los ETBs sus propiedades como material. Estos bloques rígidos se encuentran dispersos en la red formada por los **bloques blandos**, normalmente Etileno-Butileno que confieren a los ETBs las propiedades características de elastómeros como las siliconas, cauchos y gomas.

las siliconas (PDMS), y los termoplásticos, como el poliestireno. Combinando en un solo material la facilidad de procesamiento propia de los elastómeros con las propiedades materiales de los termoplásticos.

Esta dualidad de comportamiento es debida a la estructura y composición de los ETBs, los bloques blandos etileno/butileno le dan al material elasticidad y permiten el moldeo del material a temperaturas y presiones bajas lo que permitiría la fabricación de microdispositivos de manera similar a la del PDMS a pequeña escala. Mientras que los bloques cristalinos de termoplástico, dispersos en la red de bloques blandos, le confieren a los ETBs las propiedades de estos materiales. Lo que permitiría la fabricación de sistemas basados en ETBs en los mismos sistemas industriales empleados para el procesamiento y fabricación de elementos en termoplásticos.

Una característica importante para la fabricación de dispositivos microfluídicos que presentan los ETBs, es la capacidad de unirse de forma reversible y cohesiva a otras superficies con las que este establezca contacto. Esta capacidad es conferida al copolímero por los bloques blandos de este, que debido a sus propiedades reológicas y viscoelásticas fluyen adaptándose a la topografía de la superficie a unirse, lo que permite la unión de los ETBs a otras superficies. Esto no solo permitiría el sellado del microdispositivo para definir las cámaras y canales en el interior de este, sino que también permitiría acoplar el microdispositivo a sistemas auxiliares que otorguen ganancia de función al conjunto, ayudando al usuario durante las fases experimentales y facilitando el uso de los dispositivos a usuarios no familiarizados con los sistemas microfluídicos.

Comparados con los sistemas macroscópicos o clásicos de cultivo, los sistemas microfluídicos de cultivo celular aportan importantes ventajas: la flexibilidad aportada por el diseño del dispositivo, el control de las condiciones experimentales, el bajo volumen requerido, la facilidad de acoplarlo a sistemas de perfusión o la capacidad de generar cocultivos de manera espacialmente controlada. Sin embargo, estas mismas características son fuente de complejidad en el uso de los microdispositivos ya que, de manera general, requieren de protocolos de cultivo propios adaptados al diseño del microdispositivo. Siendo necesario que estos protocolos permitan preservar tanto la esterilidad del cultivo como adaptarse a las condiciones óptimas de cultivo celular cultivo de temperatura (37°C), humedad (95%) y presencia de CO₂ (≈5%). Con la dificultad añadida que involucra el manejo de volúmenes en la microescala empleando herramientas de manipulación de líquidos generalmente en la macroescala, que requiere de conexión entre elementos fluídicos en distintas escalas tanto de manera manual como al conectarlos a sistemas de perfusión automatizados. En cada paso de conexión o manipulación de líquido en un dispositivo microfluídico cabe el riesgo de introducir accidentalmente aire, en forma de burbujas, en el interior del microdispositivo. Mientras en los sistemas clásicos la presencia de burbujas no suele afectar negativamente al cultivo o las condiciones de este, en los sistemas microfluídicos la inserción accidental de aire en el microdispositivo no solo limita, sino que también compromete la viabilidad experimental (figura 2.2) sobre todo en microdispositivos con

cambios internos de dimensiones y geometrías. Las burbujas atrapadas en los microdispositivos pueden alterar o incluso detener los patrones de flujo en el microdispositivo definidos por la geometría interna de este. Esto, aparte de limitar la funcionalidad fluídica del microdispositivo podría producir siembras irregulares del dispositivo, si sucede durante la fase de siembra, o limitar el acceso de medio fresco a secciones enteras del microdispositivo, generando una enorme heterogeneidad en los resultados debido al bajo número de células sembradas en el microdispositivo. Además, el paso de burbujas a través de los canales sembrados del microdispositivo pueden dañar a las células debido bien a fenómenos de tensión en la interfase aire líquido o al reducir las dimensiones efectivas de los canales y aumentando en consecuencia el valor de tensión cortante asociado al paso del fluido sobre las células.

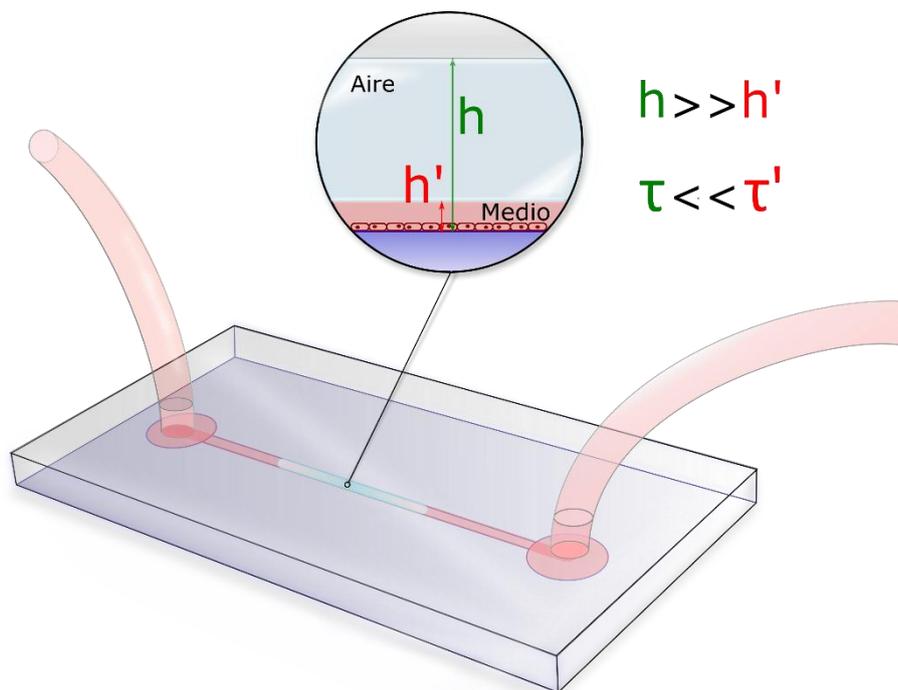


Figura 2.2. Burbujas en dispositivos microfluídicos dedicados a cultivo celular. Debido a las dimensiones de los microcanales de los microdispositivos la presencia o paso de burbujas a través de estos pueden dañar el cultivo en el dispositivo. Las burbujas de aire pueden bloquear o alterar los perfiles de flujo en los microcanales y por tanto la disponibilidad de medio al cultivo. Además, el paso de burbujas a través de los canales puede dañar al cultivo bien por efecto de la interfase aire/líquido generada, o bien al variar la altura efectiva del canal (h) por el paso de la burbuja (h') aumentando así el valor de la tensión cortante debido al paso de fluido en presencia de la burbuja (τ') con respecto al valor normal en el canal para ese caudal (τ).

La inserción accidental de aire en los dispositivos microfluídicos es un problema común en el uso de estos, y no aislado de aquellos destinados a cultivo celular. Esto es debido a la diferencia de escala entre el microdispositivo y las herramientas empleadas por el usuario para manipular líquidos en este. Este problema, aunque puede ser reducido por un usuario entrenado en el uso de sistemas microfluídicos es difícil de suprimir completamente. Para tratar de solucionar este problema, se han desarrollado múltiples estrategias para la eliminación de burbujas una vez introducidas en los dispositivos de

microfluídica a través de la integración en el microdispositivo de membranas (Skelley and Voldman 2008)(Xu, et al. 2010), trampas (Sung and Shuler 2009)(Lochovsky, et al. 2012) o canales específicos (Zheng et al. 2010) destinados a atrapar las burbujas circulantes. Sin embargo, no hay sistemas diseñados específicamente para minimizar la inserción de aire en las etapas de conexión entre elementos en distintas escalas (la microescala del dispositivo y la macroescala de los elementos de manipulación de líquidos externos).

Para tratar de solucionar este problema, se diseñó en el grupo un encapsulado que permitiera por un lado asistir al usuario en las fases de cultivo celular en un sistema microfluídico y por otro actuara como herramienta de traducción entre las escalas experimentales. Incorporando además protocolos destinados a evitar la inserción de burbujas durante las fases de conexión de elementos fluídicos maximizando así las probabilidades de éxito del experimento. Esto combinado con las propiedades autoadhesivas de los ETBs, permitirían integrar en un solo paso de fabricación el sellado del microdispositivo combinado con la unión a un sistema de encapsulado diseñado para facilitar y apoyar al usuario durante las distintas fases experimentales. Realizando este paso sin la necesidad de emplear medios internos de sellado (Ej. juntas tóricas) entre el microdispositivo y el encapsulado para garantizar la conexión fluídica estanca entre elementos.

OBJETIVOS

Determinar la viabilidad del uso de un elastómero termoplástico blando (Flexdym™) como base para la fabricación de dispositivos de microfluidos destinados a cultivo celular a través de un proceso, rápido, sencillo y fácilmente integrable en un sistema de producción de prototipos a pequeña escala.

Evaluar la viabilidad del uso de la capacidad autoadhesiva del Flexdym™ a otros materiales, permitiendo en un paso simultaneo tanto el sellado del microdispositivo como su unión a un sistema auxiliar externo, en un experimental de cultivo celular tanto en condiciones estáticas como a flujo.

Evaluar la funcionalidad del encapsulado como sistema auxiliar en el uso de dispositivos microfluídicos durante las distintas fases de cultivo en estos. Así, como de los protocolos de conexión libres de burbujas entre el microdispositivo y los elementos macroscópicos de manipulación de líquidos.

Validar el conjunto encapsulado/microdispositivo como unidad funcional en la realización de un experimental de cultivo celular tanto en condiciones estáticas como a flujo. Estudiando cambios fenotípicos de células del epitelio renal estimuladas mecánicamente por el paso de un fluido y compararlo con los resultados obtenidos mediante métodos tradicionales en la literatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DE UN ENCAPSULADO DESECHABLE PARA CULTIVO CELULAR EN MICRODISPOSITIVOS

Objetivo y consideraciones del diseño

La principal finalidad de un encapsulado para dispositivos de microfluídica es, como se ha mencionado anteriormente, la de actuar como plataforma de traducción entre la microescala de las estructuras en el interior de los dispositivos y la macroescala del usuario. Esta traducción se consigue empleando el encapsulado como adaptador entre los instrumentos usados por el usuario para manipular líquidos, tanto de forma manual (Ej. micropipeta) como automatizada (Ej. el uso de un circuito fluídico), y las microestructuras en el interior del microdispositivo. Durante la fase de diseño se decidió hacer el encapsulado compatible con el uso de micropipetas como elementos volumétricos para la dispensación de líquidos de manera manual, debido a lo extendido de su uso, su precisión en el manejo de líquidos y de ser capaces de manejar volúmenes en la microescala (1000 μl a 0.1 μl). Como elemento de conexión del circuito fluídico al encapsulado se eligieron conectores tipo barb/barb (EW-40612-43, Cole-Parmer) debido a su bajo coste y facilidad de conexión. Además, para que el uso del encapsulado tenga sentido como traductor de escalas en el sentido macroescala a microescala, los volúmenes muertos de los canales y estructuras de conexión necesarias en el encapsulado deben de ser mínimos.

Al desarrollarse experimentos de cultivo celular en dispositivos de microfluídica una de las principales causas que comprometen el éxito de estos (tanto en condiciones dinámicas como en estáticas), es la introducción de aire accidentalmente en el interior del microdispositivo. La introducción de burbujas en los microdispositivos sucede principalmente en las etapas que requieren de conexión de elementos fluídicos y/o de manipulación manual de líquidos. Por ejemplo, la siembra celular en los microdispositivos es un proceso que normalmente se realiza de forma manual, bien a través de la inyección de una suspensión celular en las que las células se adhieran a la superficie del microdispositivo o a través de la inyección de un hidrogel en el que las células se encuentran dispersas y que formaran una estructura tridimensional una vez el gel polimerice. En ambos casos, la presencia previa de burbujas o la inyección de estas al interior del microdispositivo pueden generar una distribución desigual de las células en este. Limitando así, la efectividad de la arquitectura del microdispositivo para generar unas condiciones experimentales determinadas. Como, por ejemplo, la formación de monocapas continuas en regiones definidas en el microdispositivo en el caso de cultivos bidimensionales o la localización espacial definida de hidrogeles confinados en el microdispositivo. Esto, sucede igualmente en los pasos en los que es necesario el recambio de medio o la adición de reactivos a las células en cultivo en el microdispositivo, independientemente del entorno en el que se encuentren (2D o 3D). La presencia en el interior del microdispositivo de burbujas o su inserción accidental en este paso puede alterar el perfil de flujo en el interior del microdispositivo, generando

una distribución desigual del líquido o incluso impidiendo su acceso a determinadas áreas en el microdispositivo. Además, la circulación de burbujas de aire a través del dispositivo microfluídico puede afectar negativamente a las células, bien dañándolas por el estrés superficial entre las fases líquido/gas, o bien al aumentar el valor de la tensión de corte o cizalladura (τ) debido al paso de líquido ya que la presencia de la burbuja puede alterar las dimensiones efectivas para el paso del flujo a través de los canales y/o cámaras de cultivo. La inserción accidental de burbujas en los microdispositivos puede reducirse con la formación del usuario en el uso de elementos de microfluídica pero no llega a eliminarse completamente debido a que en su mayoría su introducción está relacionada con el hecho de que la conexión se realiza entre elementos con distintas escalas físicas (macro- y microescala) y generalmente involucra varias fases durante el proceso de conexión, fases líquidas presentes en el elemento volumétrico para la dispensación de líquido (Ej. micropipeta) y el interior del microdispositivo y fase gas (aire) propia del entorno donde se realiza la conexión.

Por lo anterior, se consideró necesario implementar en el diseño estrategias o protocolos que permitieran reducir al máximo (con independencia del nivel de conocimiento del usuario en microfluídica) la inserción accidental de burbujas de aire en el interior del microdispositivo. Por ello, se desarrollaron dos protocolos: uno para las etapas de conexión y manipulación de líquidos en el microdispositivo y otro para permitir la purga del circuito fluídico *in situ* e inmediato a la conexión de este al microdispositivo, evitando así desplazar posibles burbujas de aire alojadas en el interior del circuito hacia el interior del microdispositivo. El fundamento del protocolo para evitar la inserción de burbujas durante las etapas de conexión y manipulación manual de líquidos se basa en realizar la conexión en medio líquido, evitando así la presencia de aire en la zona de la conexión que pueda ser desplazado hacia el interior del microdispositivo. En el caso del protocolo de purgado, en un primer paso se purgaría el circuito fluídico próximo a la zona de conexión, pero asegurando que el aire desplazado desde el circuito fluídico no tiene como destino final el interior del microdispositivo. Permitiendo en un segundo paso, conectar el circuito al microdispositivo aprovechando el protocolo anterior. Estos dos pasos es importante realizarlos *in situ* para evitar desplazar los elementos que conforman el circuito fluídico, ya que cambios de altura de los elementos del circuito pueden producir desplazamientos de líquido en el interior de este, que pueden traducirse en la entrada de aire en el circuito justo en la zona de conexión.

Finalmente, se decidió durante la fase de diseño que el encapsulado sirviera como soporte al usuario durante todas las fases experimentales. Desde la siembra celular de los microdispositivos hasta la obtención final de resultados experimentales por microscopia. Esta decisión, hizo necesario incluir en el diseño elementos que ayudaran al usuario a preservar la esterilidad de este, facilitasen la manipulación y conexión con el microdispositivo y permitiera la inspección óptica de los microcanales y microcámaras para monitorizar el comportamiento celular que se describen a continuación en la descripción del encapsulado y sus partes.

Diseño del encapsulado

El encapsulado se diseñó como un juego de tres piezas distintas, donde cada pieza juega un papel específico en cada etapa experimental desde la siembra celular de los microdispositivos hasta la conexión libre de burbujas entre el encapsulado y el circuito fluídico.

La pieza 1 (figura 2.3.a) se diseñó para cumplir tres papeles específicos: alojar el microdispositivo en una posición específica, permitir el acoplamiento mecánico de las otras dos piezas que forman parte del encapsulado para permitir el cierre de este y proporcionar estabilidad al conjunto encapsulado/microdispositivo cuando es manejado actuando como base.

La colocación del microdispositivo en el encapsulado es un paso crítico ya que determinará la posición de las entradas fluídicas del microdispositivo, que deberán coincidir con los canales y puertos fluídicos del encapsulado para garantizar una correcta conductividad fluídica a través del conjunto encapsulado/microdispositivo. Para garantizar la correcta colocación del microdispositivo la pieza base posee una depresión que coincide con este en dimensiones y forma y que permite el alojamiento del microdispositivo. El alojamiento tiene una ventana que permite el acceso óptico a las cámaras del microdispositivo directamente, lo que facilita la visualización por microscopía.

Para permitir el acoplamiento de las distintas piezas del encapsulado, la pieza 1 posee un juego de cuatro flechas de plástico, distribuidas por parejas, que permiten el acoplamiento mecánico directo entre esta pieza y la pieza 2. La pieza 1, también posee cuatro alojamientos pasantes, separados por parejas, para acoplar flechas proyectadas desde la pieza 3 que permitirá el cierre del conjunto encapsulado/microdispositivo. Ya que al desplazarse las flechas a través de los alojamientos y sobrepasarlos, la cabeza de las flechas ancla la pieza 3 a la pieza 1 e impide su separación.

Finalmente, las dimensiones de la pieza 1 se eligieron para asegurar la máxima compatibilidad con adaptadores y platinas regulables de microscopía y asegurar una distancia focal óptima entre el microdispositivo y los objetivos del microscopio.

La pieza 2 (figura 2.3.b) se diseñó para permitir la conexión entre las estructuras en el interior del microdispositivo y los elementos macroscópicos empleados por el investigador para la manipulación de líquidos (micropipetas). La conexión se realiza a través de puertos fluídicos independientes diseñados para alojar puntas de micropipeta de 100 μ l, permitiendo el acople de estas directamente sobre las entradas fluídicas del microdispositivo. Estos puertos, uno por cada acceso fluídico al microdispositivo, se encuentran alojados en el fondo de dos pequeños pocillos, uno para las entradas de fluido y otro para la salida. Estos pocillos tienen doble función, ya que actúan como reservorios de medio durante la fase estática del experimento y permiten, además, realizar la conexión entre la micropipeta y el microdispositivo en una continuidad líquida. Estos pocillos se encuentran a su vez alojados en un compartimento mayor

delimitado por las paredes de la pieza 2 y que actúa como reservorio del medio desplazado durante la fase de purga y conexión del circuito fluídico.

La pieza 2 se une mecánicamente a la pieza 1 por cuatro alojamientos pasantes que permiten acoplarse a las flechas proyectadas desde la pieza 1. Un segundo juego de alojamientos pasantes permite cruzar a las flechas proyectadas desde la pieza 3 la pieza 2 sin acoplarse a esta. En la pared externa de la parte superior de la pieza 2, una depresión permite colocar una junta tórica de silicona en su interior. Esta junta, que rodea por completo la parte superior de la pieza 2 tiene como finalidad establecer una unión estanca con la pared interna de la pieza 3. Esto permite aislar las estructuras internas del conjunto encapsulado/microdispositivo del exterior ayudando a preservar la esterilidad del conjunto.

A la hora de implementar el protocolo de purgado y conexión es necesario tener en cuenta que el cierre del encapsulado, como se ha visto anteriormente, se realiza desplazando las flechas proyectadas desde la pieza 3 a través de la pieza 2 hasta llegar a los alojamientos finales de las flechas en la pieza 1. Además, es en los pocillos de la pieza 2 donde se realiza la conexión libre de burbujas entre los distintos elementos fluídicos y las estructuras del microdispositivo. Esto hace necesario establecer un limitante físico al desplazamiento de la pieza 3 con respecto al conjunto de las piezas 1 y 2 para asegurar que no se produce una conexión accidental en una fase previa al purgado del circuito fluídico. Protegiendo al cultivo celular en el microdispositivo de flujos generados por el desplazamiento de la pieza 3 sobre el medio en los pocillos de la pieza 2 y estabilizando la pieza 3 en el encapsulado en una óptima para realizar el protocolo de dos pasos: purgado y conexión *in situ*. Esto define dos posiciones en el encapsulado: posición 1 donde la pieza 3 no conecta con el microdispositivo y posición 2 donde se realiza esta conexión. Esta limitación física al paso de la pieza 3 debe de poder eliminarse para poder realizar la conexión entre el microdispositivo y el circuito fluídico al pasar de la posición 1 a la posición 2.

A la hora de incorporar lo anterior en el diseño se optó por no introducir un elemento externo que actuara como limitación física del desplazamiento de la pieza 3, para evitar complicar la manipulación del conjunto encapsulado/microdispositivo. Por lo que se decidió implementar esta limitación física en la propia pieza 2, para lo cual se incorporó al diseño de la pieza 2 dos orificios cilíndricos situados en la zona donde se localizan los alojamientos de conexión y paralelos a los pocillos/reservorios que permitirán alojar un vástago proyectado desde la pieza 3. Para limitar el desplazamiento de la pieza 3, la parte superior de los orificios está cerrada por una fina membrana de plástico formada durante la inyección de la pieza que actuara como barrera física al desplazamiento. Esta membrana será perforada durante la fase de conexión del circuito fluídico al presionar la pieza 3 durante el cierre.

Por último, la pieza 3 (figura 2.3.c) se diseñó para cumplir una doble función, ayudar a preservar la esterilidad del cultivo aislando los pocillos y canales en el interior del conjunto encapsulado/microdispositivo del exterior durante las fases previas a la

conexión del circuito fluídico (posición 1) y actuar como sistema de traducción entre el circuito fluídico y el microdispositivo (posición 2).

Al sellar la pieza 3 el encapsulado durante el cierre en la posición 1 es necesario introducir un mecanismo que permita el intercambio gaseoso con el entorno y asegure una vía de escape del aire en el interior del encapsulado. El encapsulado al cerrarse herméticamente (posiciones 1 & 2) genera una sobrepresión en gas contenido en el interior de este debido al desplazamiento de las piezas, esto podría producir desplazamientos de líquido (desde los pocillos/reservorios de la pieza 2) o aire descontrolados al interior del microdispositivo. Para eliminar este potencial riesgo y permitir el intercambio gaseoso se colocó en la parte superior de la pieza 3 un puerto para acoplar un filtro de jeringa de 0.2 μm , permitiendo el intercambio de gases a través de este.

La conexión entre el microdispositivo y el circuito se consigue a través de la pieza 3, dos cilindros se proyectan desde la cara interna de la pieza 3 hacia abajo. Estos cilindros coinciden en posición con los pocillos/reservorios localizados en la pieza 2 y al igual que en estos, tres canales independientes discurren en su interior. Cada canal está destinado a unir uno de los canales en el microdispositivo a través de su conexión con el correspondiente canal colocado en la pieza 2. Originalmente el encapsulado se diseñó para emplear juntas tóricas de silicona como elementos internos de sellado en la unión entre las piezas 2 y 3. Esto requería de la colocación manual de una junta por cada canal empleado en el experimento a flujo. Estas juntas se alojarían en depresiones en situadas en la cara a conectar de los cilindros proyectados desde la pieza 3, permaneciendo sujetas a la pieza 3 por el propio encaje de las juntas en las depresiones. Sin embargo, debido a las variaciones en la tolerancia, tanto en la fabricación de las juntas como en la inyección de las piezas, las juntas no resultaron eficaces a la hora de sellar la conexión entre ambos elementos. Por ello, se decidió usar una lámina de 700 μm de Flexdym™ como medio interno de sellado. La lámina se unió a la superficie de la zona de conexión de los cilindros aprovechando la capacidad del Flexdym™ de unirse a la superficie de otros materiales. Además, siendo el Flexdym™ elástico podría absorber las variaciones de tamaño de las piezas, relacionadas con la tolerancia del proceso de inyección.

Estos canales discurren a través de la pieza 3 hasta alcanzar los puertos de conexión del encapsulado, dispuestos lateralmente para facilitar la conexión y evitar interferir en el paso de luz cuando el encapsulado es colocado en un microscopio. Estos puertos se diseñaron para el uso de conectores de tipo barb/barb que permitirían acoplar los tubos procedentes de un circuito fluídico.

Finalmente, la conexión de la pieza 3 se realiza con las otras dos piezas gracias a cuatro flechas proyectadas desde la pieza 3 hacia las otras dos flechas, cruzando la pieza 2 y anclándose en los alojamientos de la pieza 1. Para permitir el uso de las dos posiciones que se han nombrado antes, dos vástagos de plástico se proyectan desde la pieza 3 hacia la pieza 2. Estos reposan sobre la membrana que recubre los alojamientos para los vástagos en la pieza 2 asegurando la altura de la pieza 3 en la posición 1. Y romperán la

membrana al presionar la pieza 3 sobre el conjunto de las piezas 1 y 2, permitiendo desplazarse a las flechas proyectadas desde la pieza 3 hasta los anclajes en la pieza 1.

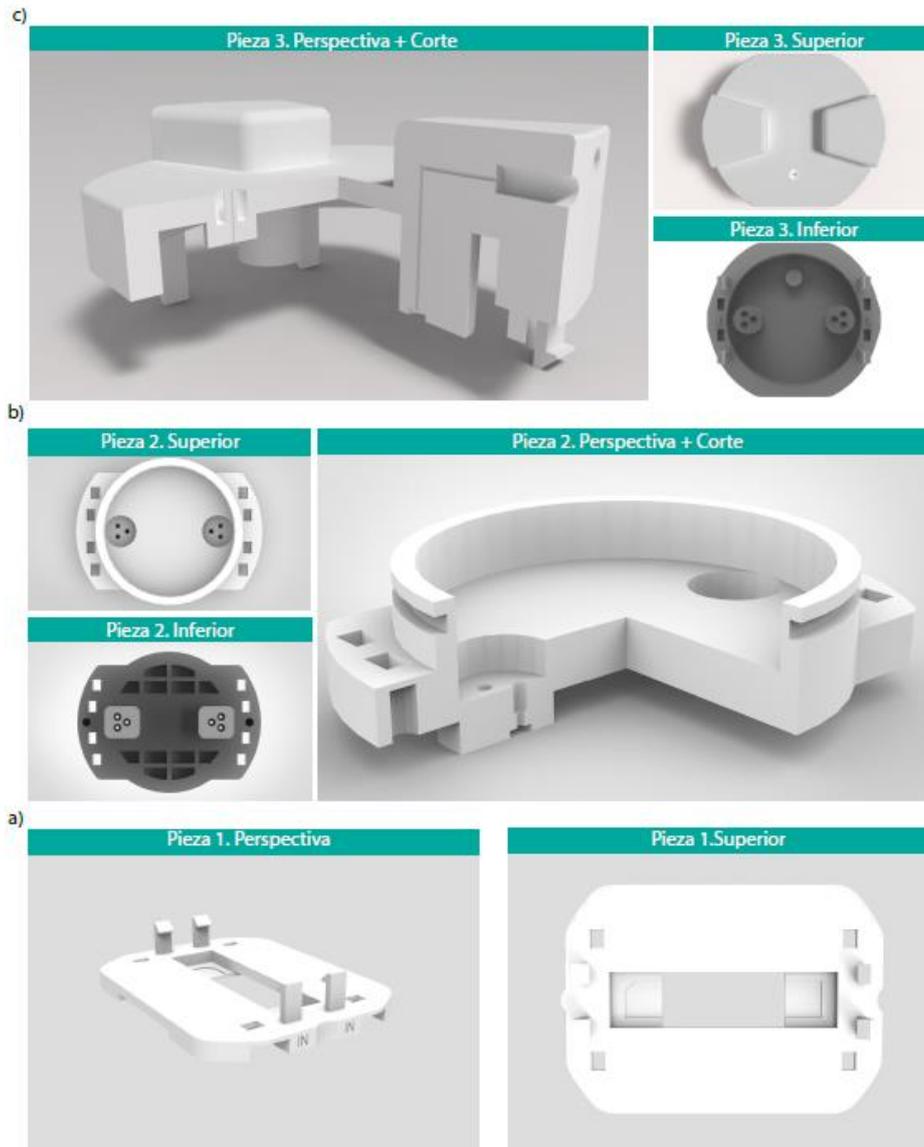


Figura 2.3. Renderizado de las distintas piezas del encapsulado. a) Vista en perspectiva y superior de la pieza 1. Pueden observarse la posición de las flechas de unión a la pieza 2 situadas dos a dos, así como los alojamientos para las flechas proyectadas desde la pieza 3. En el centro de la pieza se encuentra el alojamiento destinado a albergar y posicionar el microdispositivo, con el objetivo de facilitar su colocación y alinear la posición de las entradas de los microcanales con el resto de elementos del encapsulado, asegurando así la continuidad fluidica a través de este. **b) Vista en perspectiva y corte, superior e inferior de la pieza 2.** En la pieza 2 se encuentran los cuatro alojamientos destinados al cierre y acople de la pieza, los cuatro centrales destinados a alojar las flechas proyectadas desde la pieza 1 y los cuatro en los extremos destinados a servir de paso para las piezas proyectadas desde la pieza 3 y destino a los alojamientos en la pieza 1. Situado entre los alojamientos se encuentran los orificios cilíndricos cerrados por una membrana plástica destinados a bloquear físicamente el desplazamiento de la pieza 3, distinguiendo así entre las dos posiciones del protocolo de conexión del circuito fluidico. Puede observarse también, los puertos de conexión fluidicos que cumplen doble función, por un lado, permiten el acople de una punta de pipeta para la perfusión manual de líquido en el microdispositivo y por otro forman parte del circuito fluidico interno del encapsulado que permita el paso de fluido a través de este hacia el microdispositivo. **c) Vista en perspectiva y corte, superior e inferior de la pieza 3.** En los laterales de la pieza 3 se encuentran las flechas destinadas al cierre del encapsulado al desplazarse hacia los alojamientos de la pieza 1 y entre estas los vástagos destinados a perforar las membranas de la pieza 2. Los cilindros proyectados desde la pieza 3 terminan de formar el circuito fluidico interno del encapsulado, conectando el circuito fluidico externo desde los puertos laterales de la pieza 3 al microdispositivo.

PROTOCOLO DE CONEXIÓN ENTRE ELEMENTOS FLUÍDICOS Y MICRODISPOSITIVO MEDIADO POR ENCAPSULADO LIBRE DE BURBUJAS.

El fundamento de trabajo para conseguir una conexión entre elementos fluídicos en estático libre de burbujas (bien sea durante la conexión a un circuito fluídico o la inserción manual de líquidos en el microdispositivo) es realizar la conexión entre esos elementos en una continuidad líquida. Esto elimina la presencia de aire en la zona de conexión que pueda ser desplazado accidentalmente hacia el interior del microdispositivo. Este paso es especialmente importante en la fase de siembra del microdispositivo, donde la presencia de aire este puede afectar negativamente la distribución celular en el microdispositivo.

El punto de partida es el llenado de los pocillos/reservorios en la pieza 2, lugar donde se va a realizar la conexión fluídica, con medio de cultivo para generar la continuidad líquida mencionada anteriormente. Si el microdispositivo no se encuentra lleno de líquido, como al inicio del ensayo antes de la siembra celular, pueden generarse burbujas en el interior del microdispositivo al ser impulsado el medio en los pocillos/reservorios al interior del microdispositivo por acción combinada de la gravedad y la capilaridad. Este llenado es dependiente de la geometría interna del microdispositivo y de la naturaleza de la superficie, por lo que se pueden generar áreas donde el aire quede atrapado en el microdispositivo (figura 2.4.a)). Esto puede solucionarse purgando el interior del microdispositivo con ayuda de una micropipeta, embocando la punta a través de uno de los puertos fluídicos independientes que conectan el pocillo/reservorio con una de las entradas fluídicas del microdispositivo (figura 2.4.b)). De esta forma se aseguran: primero, una correcta conexión entre el microdispositivo y la punta de la micropipeta y segundo, la ausencia de aire en la zona de conexión. Lo que permite desplazar el aire del interior del microdispositivo por perfusión manual de medio a través de este (figura 2.4.c)) y lo prepara para los siguientes pasos. Es importante señalar que es también posible eliminar burbujas introducidas accidentalmente en el interior del dispositivo durante el resto de fases del ensayo en estático (Ej. burbujas introducidas por el usuario, contenidas en el medio a perfundir en el microdispositivo).

El procedimiento para la conexión del microdispositivo y bien, un elemento fluídico para dispensar líquido (ej. durante la siembra celular o la perfusión manual en el microdispositivo) o un circuito fluídico (figura 2.4.d) y figura 2.5.a)) comienza con el microdispositivo libre de burbujas. Para preservarlo en este estado, la conexión se realiza a través de los puertos fluídicos de la pieza 2 en la continuidad líquida generada, bien con ayuda de una micropipeta (figura 2.4.e)) con el objetivo de dispensar líquidos en el interior del microdispositivo o bien por el cierre del encapsulado, pasando de la posición 1 a la posición 2 durante la conexión del circuito fluídico (figura 2.5.c) y d)).

En el caso de la dispensación manual de líquidos, se colocaría la pieza 3 en posición 1 para aislar el interior del encapsulado/microdispositivo (figura 2.4.f)). Permitiendo su traslado fuera de la cabina de flujo laminar evitando contaminación del cultivo al aislarlo del medio externo.

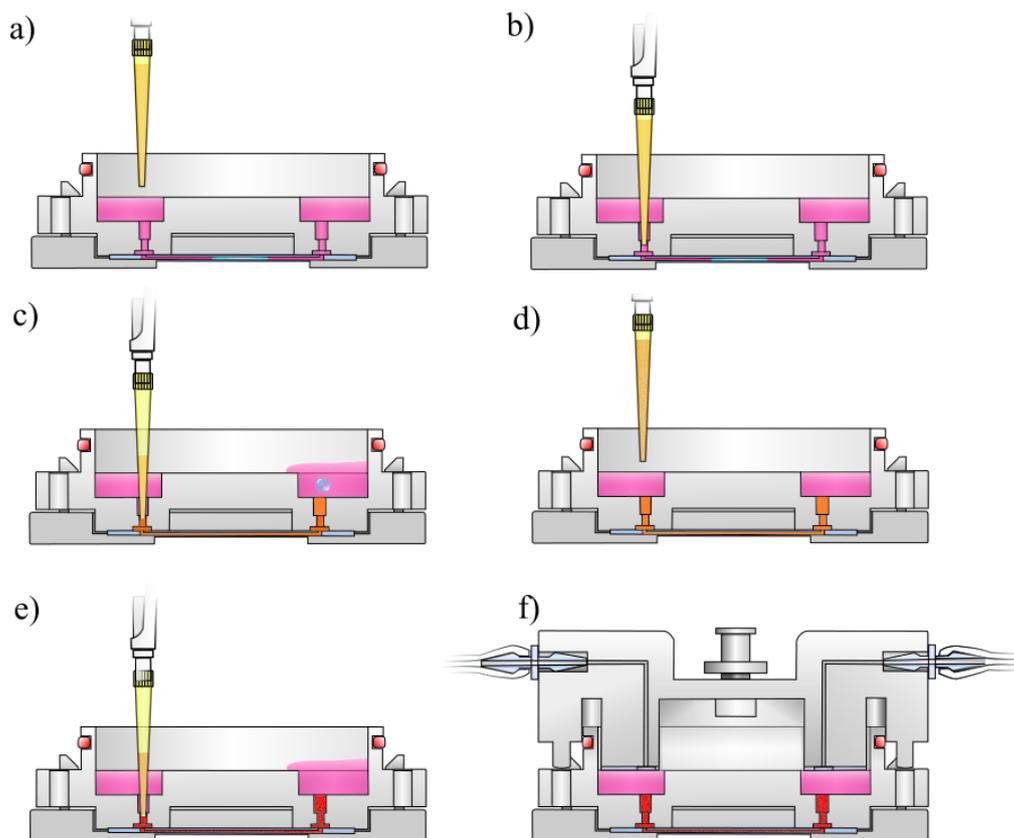


Figura 2.4. Esquema gráfico del protocolo de conexión entre elementos fluidicos y microdispositivo mediado por encapsulado libre de burbujas. **a) Llenado de los pocillos reservorios en la pieza 2.** El llenado de los pocillos es el punto de partida del protocolo al generar la continuidad líquido/líquido en la zona de conexión entre el microdispositivo y la punta de micropipeta. **b) Conexión entre el microdispositivo y la punta de pipeta.** Al realizarse en la continuidad líquido/líquido y medido por el encapsulado permite realizar la conexión entre ambos elementos evitando la inserción accidental de burbujas. **c) Purgado del microdispositivo.** Durante el proceso de llenado de los pocillos en la pieza 2 el líquido puede desplazarse hacia el interior del microdispositivo atrapando aire en el interior de este. El purgado del microdispositivo permite eliminar el aire en el interior del dispositivo. **d) Dispensación manual de líquido en el encapsulado.** Una vez establecida la continuidad líquida en la zona de conexión y purgado el microdispositivo, el sistema está listo para los sucesivos pasos de manipulación manual de líquido en el microdispositivo, como por ejemplo durante la siembra celular del microdispositivo. **e) Dispensación manual de líquido en el microdispositivo.** Tras la conexión de la punta de micropipeta al microcanal el líquido perfundido desplaza al presente inicialmente llenando las estructuras internas del microdispositivo. El volumen desplazado al pocillo de salida se retirará para equilibrar el volumen entre los dos pocillos y evitar contraflujos. **f) Cierre del encapsulado (posición 1).** En ocasiones puede ser necesario mantener el sistema en estático, por ejemplo, durante la adhesión celular al microdispositivo. Para evitar la contaminación del cultivo en el microdispositivo la pieza 3 actúa como tapa aislando el microdispositivo del exterior. La pieza 3 se mantiene en posición gracias a la presencia de las membranas en la pieza 2 que evitan el sobre-desplazamiento de la pieza 3 hacia la pieza 2, siendo esta posición el punto de partida para el protocolo de purga y conexión del circuito fluido al microdispositivo.

PROTOCOLO DE PURGA Y CONEXIÓN ENTRE CIRCUITO FLUÍDICO Y MICRODISPOSITIVO MEDIADO POR ENCAPSULADO LIBRE DE BURBUJAS.

El desplazamiento de burbujas desde el circuito fluido hacia el interior del microdispositivo puede afectar negativamente el curso del experimento, bien al dañar las células debido al paso de la burbuja por el microdispositivo o bien al alojarse en el

microdispositivo y alterar los patrones de flujo en el interior de este. La purga del circuito previo a la conexión del microdispositivo garantiza al usuario un inicio del experimental libre de burbujas, y el hacerlo *in situ* elimina el riesgo de introducir aire en el circuito en la zona de conexión debido a desplazamientos del líquido contenido en este.

El conjunto encapsulado/microdispositivo comienza en posición 1, con la pieza 3 apoyada sobre la pieza 2. Estando el desplazamiento de la pieza 3 hacia la posición de cierre del encapsulado imposibilitado por las membranas presentes en la parte 2, que cubren la entrada superior de los alojamientos para los vástagos proyectados por la pieza 3. En esta configuración se inicia la perfusión de medio a través del circuito fluidoico (figura 2.5.a)) que ira llenando la piscina en la pieza 2. El medio al circular por el circuito desplazará el aire y las burbujas presentes en este hacia la salida del circuito e incrementará el volumen de líquido en la piscina del encapsulado, generando una continuidad líquida entre los elementos a conectar de las piezas 2 y 3 (figura 2.5.b)). Las burbujas al salir del circuito por la salida de los canales en la pieza 3 pasan al medio en la piscina y por flotabilidad salen hacia la superficie de este, desplazándose fuera de la zona de conexión (figura 2.5.c)). Finalmente, la conexión entre circuito fluidoico y microdispositivo se realiza al presionar la pieza 3 para romper las membranas en la pieza 2 y poder cerrar el encapsulado en posición 2 (figura 2.5.d)).

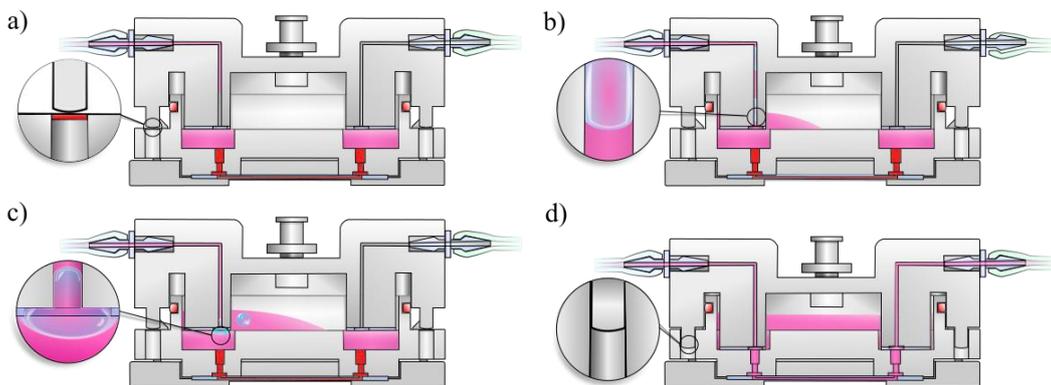


Figura 2.5. Esquema gráfico del protocolo de purga y conexión entre circuito fluidoico y microdispositivo mediado por encapsulado libre de burbujas. a) Posición 1. En punto de partida del protocolo el microdispositivo se encuentra libre de burbujas con los pocillos de la pieza 2 llenos de medio formando una continuidad líquido/líquido en la zona de conexión. La pieza 3 actúa como tapa del sistema, estando bloqueado su desplazamiento hacia la pieza dos por las membranas presentes en estas (en el detalle de la ilustración en rojo). **b) Purga del circuito fluidoico in situ.** El proceso de purga comienza con la perfusión de líquido a través del circuito fluidoico desplazando el aire presente en este y las burbujas creadas en el interior de este durante el proceso (detalle) **c)** que son liberadas al exterior mientras se genera una continuidad líquida entre los cilindros proyectados desde la pieza 3 y la zona de conexión en la pieza 2. Este proceso se continua hasta la eliminación completa de aire en el circuito y en la zona de conexión (detalle). **d) Posición 2.** Una vez purgado el circuito y generada la continuidad líquida entre los elementos de conexión de las piezas 2 y 3, se procede a la conexión del circuito y el microdispositivo libre de burbujas. Esto se consigue perforando las membranas presentes en la pieza 2 con ayuda de los vástagos presentes en la pieza 3 que se alojaran en los huecos cilíndricos de la pieza 2 (detalle).

FABRICACIÓN DEL ENCAPSULADO

Los encapsulados desechables de poliestireno se fabricaron por moldeo de plásticos por inyección (Moldes Y Plásticos de Aragón S.L). Se eligió este proceso de fabricación al ser un procedimiento extendido en la industria del sector al ser económico, rápido, efectivo y preciso para la producción de sistemas desechables. Como material de inyección para la fabricación del encapsulado se empleó poliestireno cristal de grado médico Styron™ USP IV, al ser un material ampliamente empleado en la fabricación de dispositivos médicos desechables y material de laboratorio desechable destinado al cultivo celular. Un molde de inyección fabricado en acero inoxidable fue fabricado para cada pieza del encapsulado por mecanizado de precisión. Cada molde fue después pulido a un acabado de espejo para obtener transparencia óptica en las piezas producidas. Este paso es crucial ya que cualquier rugosidad o imperfección en la superficie del encapsulado dispersará la luz que cruza la pieza afectando así la calidad de las imágenes obtenidas de las cámaras del microdispositivo al emplear técnicas de microscopía.

El proceso de inyección se realizó en una máquina de inyección de plásticos Meteor 550/270 (55 Tm) (Mateu & Solé). Los moldes se refrigeraron durante el proceso de forma continuada por inyección de agua a 15 °C. Los parámetros de presión, temperatura, etc., se optimizaron para obtener la máxima calidad en las piezas inyectadas. No se añadió ningún aditivo al plástico o al molde en ninguna de las etapas del proceso.

DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL MICROPOSITIVO DE FLEXDYM/CICLOOLEFIN COPOLÍMERO E INTEGRACION EN EL ENCAPSULADO

Los microdispositivos se diseñaron siguiendo las mismas consideraciones que en el capítulo anterior para los microdispositivos de SU-8. Los dispositivos se diseñaron macroscópicamente con forma rectangular y unas dimensiones de 8mm de anchura y 40mm de longitud, permitiendo la manipulación manual de los mismos. Cada microdispositivo aloja tres canales de cultivo independientes entre sí, lo que permitió disponer de tres replicas por microdispositivo. Los canales se diseñaron con una anchura de 1 mm y una longitud de 35 mm en los canales laterales y de 30 mm en el canal central y con una altura de 300µm, resultando en un volumen por canal de 10,5 µl y de 9 µl respectivamente. Para suavizar el impacto de la tensión de cizalladura debido al paso de flujo en la zona de la entrada fluídica, debido a su vez al súbito cambio de dimensiones entre los canales de conexión y la cámara de cultivo, la porción de las cámaras más próxima a la entrada fluídica del microdispositivo se diseñaron con un ángulo de transición de 45°.

La fabricación del microdispositivo comenzó con la fabricación de un molde maestro en SU-8 (MicroChem) por fotolitografía. El molde es un negativo de las estructuras del microdispositivo, las microcámaras y microcanales que conformaran el microdispositivo

protruyen desde la superficie del molde para permitir el grabado de estas en el material empleado para fabricar el microdispositivo (Flexdym).

El proceso de grabado comenzó colocando una lámina de Flexdym de 700 μm entre el molde maestro de SU-8 y una oblea de pírex, haciéndose vacío sobre el conjunto para eliminar bolsas de aire atrapadas entre la superficie del molde y la lámina de Flexdym. El grabado de las estructuras en el Flexdym se realizó a una temperatura de 100°C y 1 atmósfera de presión. La lámina de Flexdym se liberó del molde y los cuerpos de los microdispositivos se separaron entre sí cortando con una cuchilla. Finalmente, con ayuda de un punzón de biopsia con embolo de 1 mm (94158BPP-10F, DH), se perforaron en el cuerpo las entradas fluídicas a los canales del microdispositivo.

El cierre de los microdispositivos y su unión a la pieza 2 del encapsulado se realizó en un único paso, como suelo para los microdispositivos se empleó una lámina de 180 μm de espesor de COC con las dimensiones del microdispositivo. Las tres partes, lámina de COC, cuerpo de Flexdym y la pieza 2 del encapsulado se superpusieron con ayuda de la pieza 1 para facilitar el alineamiento de las entradas fluídicas del microdispositivo con los puertos fluídicos de la pieza 2. Una vez unido el conjunto, se retiró cuidadosamente la pieza 1 para evitar sobrepresiones en el cuerpo de Flexdym que pudiera deformar el material en el proceso de unión de las piezas (figura 2.6). El conjunto se dejó a 65°C durante 24 h para asegurar una correcta adhesión entre las piezas aprovechando las cualidades autoadhesivas del Flexdym a otros termoplásticos. Una vez unido el encapsulado y el microdispositivo se volvió a montar la pieza 1 dejando el conjunto listo.

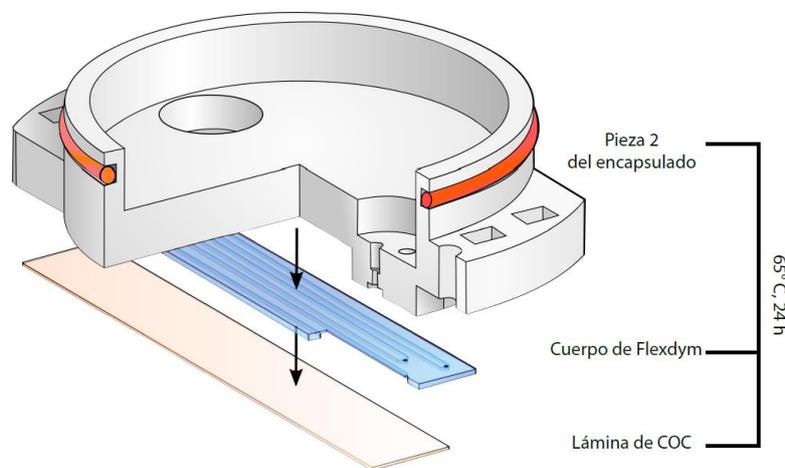


Figura 2.6. Esquema de fabricación del microdispositivo Flexdym™/COC e integración con el encapsulado. El proceso se realizó en un único paso aprovechando las cualidades autoadhesivas del Flexdym a otros termoplásticos. El cuerpo microestructurado de Flexdym, la lámina suelo de COC y la pieza 2 del encapsulado se superpusieron para formar el conjunto microdispositivo/encapsulado. Las conexiones fluídicas entre los distintos elementos se alinearon con ayuda de la pieza 1 (no mostrada en la ilustración). El conjunto se mantuvo a 65°C durante 24h para permitir la unión entre los elementos.

Se comprobó la calidad del pegado del conjunto encapsulado/microdispositivo eligiendo tres conjuntos al azar por ronda de fabricación y llenando manualmente los canales de

los microdispositivos con 20 μ l de una disolución de fluoresceína sódica (Excitación=460 nm, Emisión=515 nm) (F6377, Sigma Aldrich) al 0.5% (p/v) en agua destilada o una disolución de rodamina B (Excitación=553 nm, Emisión=627 nm) (83689, Sigma Aldrich) al 0.5% (p/v) en agua destilada. Tras lo cual, el conjunto encapsulado/microdispositivo se examinó por microscopía de fluorescencia buscando fugas o conexiones entre los canales del microdispositivo o el microdispositivo y el encapsulado.

Para garantizar la estanqueidad de la unión entre los canales de la pieza 3 y los puertos fluídicos de la pieza 2 se aprovechó la capacidad elástica del Flexdym (módulo de Young 1,35 MPa). Se cortaron discos de Flexdym de 20 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados de acero para actuar como juntas en la conexión entre la pieza 2 y 3. Los discos se colocaron sobre las columnas proyectadas desde la pieza 3 y se perforaron con ayuda de un sacabocados circular de acero de 6 mm de diámetro en las posiciones de los canales en el cilindro, para permitir el paso de flujo a través. Al igual que en el caso del microdispositivo la unión entre las piezas se realizó a 65°C durante 24h.

La estanqueidad de la conexión se comprobó eligiendo tres conjuntos encapsulado/microdispositivo al azar por ronda de fabricación. Estos se cerraron directamente a posición 2 a vacío para establecer continuidad fluídica en el circuito y se perfundieron con una disolución de fluoresceína sódica al 0.5% (p/v) a un caudal de 100 μ l/min a través del microdispositivo. Empleando una bomba de jeringuilla (NE-1600, New Era) como fuente de presión, tres jeringuillas de 5 ml como reservorio conectadas directamente con el conjunto encapsulado/microdispositivo usando tubo flexible Tygon® de diámetro interno 1,6 mm (ACG00003, Saint-Goban) a través de los conectores tipo *barb/barb* alojados en los puertos de la tapa de la pieza de conexión del encapsulado y un vaso de precipitados de 100ml, que actuaba como colector del líquido eluído del sistema a través de tubo flexible deTygon® conectado al encapsulado. La calidad de las uniones se comprobó por microscopía de fluorescencia buscando signos de fuga entre los elementos al someterlos a un caudal de 0,5 ml/min durante 5 minutos.

TEST DE PRESIÓN PARA DETERMINAR LA FORTALEZA DE UNIÓN COC/FLEXDYM/POLIESTIRENO

La fortaleza de la unión entre las interfaces de los distintos materiales que componen el conjunto encapsulado/microdispositivo (COC de la base del microdispositivo, Flexdym del cuerpo del microdispositivo y poliestireno del encapsulado) se evaluó a través de un test de fuga de líquido frente a un golpe de presión (Patrino et al. 2007)(Thompson and Abate 2013)(You et al. 2013) (n=9). Un caudal de líquido no compresible (agua destilada) generado por una fuente de presión constante se hace circular a través del conjunto encapsulado/microdispositivo conectado a un circuito fluídico. En el cual, la estructura más restrictiva al paso de líquido debido a las dimensiones físicas de esta son las cámaras del microdispositivo. Esto somete a un esfuerzo a la unión de los materiales debido a la transmisión de presión desde el fluido circulante. Se estableció un rango de presiones desde 10 kPa hasta 100 kPa con variaciones de 10 kPa. Tras estabilizarse el caudal a una determinada presión se cerró el circuito en la parte distal para conseguir la presurización

del mismo durante 1 minuto. Durante todo el proceso, se buscaron signos de fuga de líquido o debilitamiento entre las interfases (Ej. conexión fluidica entre las distintas cámaras del microdispositivo, perdida de la geometría definida de los microcanales por despegue o signos de debilitamiento en la unión de los elementos).

Como fuente de presión para impulsar el líquido se empleó la línea de aire a presión de las instalaciones del I3A, capaz de generar una presión estable y continuada de 6 atmosferas de presión. El circuito fluido empleado estaba compuesto en ambos experimentos, en orden desde la fuente de presión, de: un manómetro de seguridad de 0 a 2 atmosferas para regular la presión de aire entrante en el sistema, un manómetro digital de precisión con un rango de trabajo de 0 a 2 atmosferas de presión, una botella de pírax de 100 ml, que actuó como reservorio del líquido a impulsar a través del sistema (agua destilada), con cuello de botella GL45 que permite acoplar una tapa roscada para cromatografía líquida de alta presión con tres puertos GL14 roscados (11 297 51, Duran) adaptados para acoplar tubos rígidos de 3,2 mm (11 298 15, Duran) de diámetro externo y el conjunto encapsulado/microdispositivo descrito anteriormente. Las conexiones entre elementos se realizaron empleando tubos rígidos de 3,2 mm de diámetro externo y 1,6 mm de diámetro interno. La conexión tubo a encapsulado se realizó a través de conectores tipo barb/barb (EW-40612-43, Cole-Parmer) alojados en los puertos fluidicos de la parte de conexión del encapsulado. Finalmente, para determinar el caudal asociado a cada punto de presión, así como el valor de tensión cortante en las cámaras del microdispositivo, se repitió el mismo montaje experimental, pero dejando abierto las salidas fluidicas. Para obtener los valores de caudal en cada presión se colocó un vaso de precipitados de 500 ml colocado sobre una balanza de precisión para calcular los caudales obtenidos por pesada (n=9).

TIPOS CELULARES, MEDIOS DE CULTIVO Y CULTIVO CELULAR

Para realizar los experimentos de este capítulo se empleó la línea celular comercial LLC-PK1 (CLC-101™, ATCC®) usando como medio de crecimiento completo D10, descrito en el capítulo anterior. Las células se cultivaron de manera rutinaria siguiendo protocolos de esterilidad y se mantuvieron en un incubador de CO₂ (TEB-1000, EBERS) a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera saturada de humedad. Los cultivos se mantuvieron, con cambios de medio cada 2-3 días, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia. Las células se pasaron a una ratio de subcultivo 1:8 con respecto al cultivo original para mantenimiento de la línea celular en cultivo.

SIEMBRA, CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE FLUJO EN MICRODISPOSITIVOS

Para favorecer la adhesión celular a la superficie de COC, la lámina de COC de los microdispositivos se activó por exposición a plasma de oxígeno, las condiciones de tratamiento fueron de: potencia 200W, flujo de oxígeno 50 cm³/min, vacío en cámara

0.4 mbar, temperatura 30° C, tiempo de tratamiento 1 min en un sistema de plasma Atto W6 (Diener) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Condiciones del tratamiento por plasma de oxígeno para la activación superficial de termoplásticos poliméricos (COP).

Potencia (W)	Caudal de O ₂ (cm ³ /min)	Vacío (mbar)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
200 W	50 cm ³ /min	0,4 mbar	30 °C	60 s

Los microdispositivos se esterilizaron tras su pegado a los encapsulados de poliestireno, sumergiendo el conjunto completo en una dilución de etanol al 70% en agua durante 5 minutos. Para asegurar la esterilidad completa de los dispositivos, se perfundi6 con ayuda de una pipeta de 1000 µl etanol a trav6s de los canales de las piezas del encapsulado y los canales del microdispositivo. Se aspir6 el alcohol de los canales, tanto del microdispositivo como del encapsulado, usando una l6nea de vac6o y una pipeta Pasteur de vidrio est6ril. Para eliminar los posibles restos de alcohol, el conjunto completo se sumergi6 en agua destilada est6ril y se perfundi6 a trav6s de los canales del encapsulado y el microdispositivo con ayuda de una micropipeta de 1000 µl. Los lavados con agua destilada est6ril se realizaron tres veces. El agua se retir6 usando una l6nea de vac6o y una pipeta Pasteur de vidrio est6ril. El conjunto de encapsulado/microdispositivo se dej6 secar finalmente bajo flujo de aire est6ril en la campana de flujo laminar. No se observaron signos de contaminaci6n en ninguno de los conjuntos encapsulado/microdispositivo esterilizados de esta manera.

Los microdispositivos de Flexdym/COC se sembraron siguiendo el protocolo de siembra libre de burbujas asistido por el encapsulado descrito anteriormente. Un volumen de 20µl de una suspensi6n celular de 2,5·10⁶ c6lulas/ml se perfundi6 a trav6s de cada canal del microdispositivo de Flexdym/COC. Los conjuntos encapsulados/microdispositivos sembrados se dejaron un m6nimo de cuatro horas en el incubador de CO₂ para permitir la adhesi6n de las LLC-PK1 al microdispositivo. Una vez la adhesi6n celular se comprob6 mediante microscop6a de campo claro, los microdispositivos se mantuvieron en cultivo el tiempo necesario para la formaci6n de una monocapa continua en los canales de cultivo del microdispositivo. Cambios de medio se efectuaron cada 12 horas siguiendo el protocolo anteriormente descrito para la manipulaci6n manual de l6quidos en el microdispositivo mediado por el encapsulado.

Una vez alcanzada confluencia en los canales de cultivo, los microdispositivos destinados a la estimulaci6n mec6nica de las c6lulas epiteliales (n= 9) a trav6s del paso de fluido se conectaron al circuito flu6dico siguiendo el protocolo de conexi6n libre de burbujas explicado anteriormente. El circuito flu6dico estaba compuesto en orden desde la fuente de presi6n de: una bomba de jeringa programable de seis canales (NE-1600, New Era) como fuente de presi6n, tres jeringuillas de 50ml (309654, BD) por conjunto encapsulado/microdispositivo (una por cada canal independiente del microdispositivo)

acopladas a la bomba de jeringa que actúan como reservorio de medio y complementan la fuente de presión elegida, que conectan directamente con el conjunto encapsulado/microdispositivo usando tubo flexible Tygon® de 1,6 mm de diámetro interno a través de los conectores tipo *barb/barb* alojados en los puertos de la tapa de la pieza de conexión del encapsulado, finalmente tres tubos Falcon de 50ml (uno por cada línea de flujo independiente) actuaron como recolectores del medio perfundido a través del microdispositivo, conectados al encapsulado a través de conectores *barb/barb* y tubo de Tygon®. Tras el cebado del sistema fluídico y la conexión del circuito al microdispositivo, el sistema se colocó en un incubador de CO₂ y se perfundió durante 24 horas a una caudal de 16,1 µl/min. El valor de τ resultante en la superficie de la cámara del microdispositivo fue de 0,17 dina/cm², en el rango de las condiciones fisiológicas en el riñón (Bonvalet and de Rouffignac 1981).

Los microdispositivos designados como control se mantuvieron en estático (una vez alcanzada la confluencia en los canales de cultivo) durante 24 horas con cambio de medio manual cada 12 horas.

VIABILIDAD CELULAR EN LOS MICRODISPOSITIVOS Y MARCAJE CELULAR

La determinación de la viabilidad celular en los microdispositivos antes de comenzar la perfusión se realizó empleando los marcadores fluorescentes: calceína-AM (C1430, Thermo Fisher Scientific) a 1mg/ml en DMSO como marcador de viabilidad, yoduro de propidio (P4170, Sigma Aldrich) a 2mg/ml en DMSO como marcador de muerte celular y Hoechst 33342 (H33342) (B2261, Sigma Aldrich) a 1 µg/ml en DMSO para marcar los núcleos. El H33342 es un agente intercalante que al unirse al surco mayor se la doble hélice del ADN emite fluorescencia en azul (Excitación/Emisión = 350/461 nm) siendo capaz de atravesar la membrana celular y unirse al ADN *in vivo* permitiendo marcar la posición de todos los núcleos. Para minimizar el número de pasos de manipulación de líquidos en el microdispositivo, se combinaron todos los marcadores en una única solución de marcado a las concentraciones señaladas anteriormente.

Tras la estimulación mecánica de las células inducida por el paso de fluido las células en los microdispositivos, tanto a flujo como control, se fijaron para preservar las estructuras celulares usando una disolución de formaldehído al 10% en tampón neutro (9713.5000, WVR) durante 10 minutos. Tras lo que se permeabilizaron empleando una disolución al 1% (p/v) de saponina (47036-50G-F, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Se eligieron dos estructuras celulares para su marcaje, los microfilamentos del citoesqueleto, susceptibles de sufrir reordenamientos en respuesta a la estimulación por el flujo (Essig et al. 2001) y el núcleo celular. La actina, componente mayoritario en los microfilamentos, se marcó con faloidina conjugada con el fluorocromo isocianato de tetrametilrodamina-B (TRITC) (Excitación/Emisión = 557/576 nm) (P1951, Sigma Aldrich). La faloidina es una micotoxina extraída del hongo *Amanita phalloides* que reconoce selectivamente a la actina. Los núcleos celulares se marcaron usando H33342. El marcaje se hizo en un solo paso mezclando ambos marcadores Faloidina-TRITC a

20 μ M y H33342 a 5 μ g/ml en PBS, incubándose a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el exceso de marcaje y se llenaron los canales del microdispositivo con 20 μ l de una disolución de Mowiol® 4-88 (475904, Merck) al 12% (p/v) y glicerol (G5516, Sigma Aldrich) al 30% (p/v) como medio de montaje.

Todos los pasos que requirieron manipulación de líquidos a través de los canales del microdispositivos se realizaron empleando el protocolo de manipulación de líquidos en estático facilitado por el encapsulado descrito anteriormente.

MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN

Las imágenes de microscopía de fluorescencia y de contraste de fase de las células en las cámaras de los microdispositivos se tomaron usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E (Nikon) acoplado a una cámara de fluorescencia de alta resolución Luca R (Andor). Las imágenes se procesaron usando dos programas de análisis y procesamiento de imágenes: el comercial NIS Elements Advance Research (Nikon) y el libre FIJI/ImageJ (Schindelin et al. 2012).

RESULTADOS

FABRICACIÓN DE LOS MICRODISPOSITIVOS, INYECCIÓN DE LOS ENCAPSULADOS E INTEGRACION MICRODISPOSITIVO/ENCAPSULADO

Las distintas piezas del encapsulado fueron inyectadas con éxito sin la presencia de deformaciones mayores en las piezas debidas al proceso de inyección y posterior enfriamiento (figura 2.7.a). Los canales inyectados en el interior de las piezas del encapsulado presentaron continuidad fluidica sin signos de perforación, bloqueo o interconexión entre los mismos. La calidad de la inyección permitió el acople de la junta tórica a la pieza 2 que al cerrarse con la pieza 3 permitió aislar el interior del encapsulado. El puerto en la pieza 3 permitió el acople de un filtro de 0,20 μ m para permitir el intercambio gaseoso entre el interior del encapsulado y el exterior a través del filtro. Uno de los elementos más críticos del modelo, las membranas en la pieza 2 (destinadas a evitar el desplazamiento accidental de la pieza 3 de la posición 1 a la posición 2 en el protocolo de purga y conexión), fueron inyectadas con éxito evitando el desplazamiento de la pieza 3 y permitiendo su ruptura con facilidad al ejercer presión, permitiendo el cierre completo del conjunto microdispositivo/encapsulado. Pese al pulido espejo de los moldes, las piezas mostraron defectos en el acabado que afectaron la transparencia de las piezas y dificultaron la observación de las células en los microcanales por microscopia de campo claro (figura 2.7.a).

Los cuerpos de Flexdym™ microestructurados se pegaron con éxito tanto a las láminas de COC destinadas a sellar los microdispositivos, actuando como suelo y sustrato de adhesión celular, así como a la pieza 2 del encapsulado en un único paso por contacto directo de los elementos entre sí tras ser sometidos a una temperatura de 65°C durante

24h. Para evaluar la eficacia del pegado se inyectó a través de la pieza 2 en los microcanales soluciones de dos marcadores fluorescentes (fluoresceína y rodamina). La geometría de los microcanales se mostró perfectamente definida sin que se observaran signos de mal pegado entre la lámina y el microdispositivo o interconexión entre los microcanales (figura 2.7.b). Finalmente, para evaluar la viabilidad del conjunto y del uso de los discos de Flexdym™ como medio interno de sellado, se cerró el conjunto microdispositivo/encapsulado y se conectó a un circuito externo y se perfundió una solución de fluoresceína a 0,5 ml/min sin que se observaran signos evidentes de fuga entre los elementos (figura 2.7.c) o interconexión entre los canales del microdispositivo (figura 2.7.d).

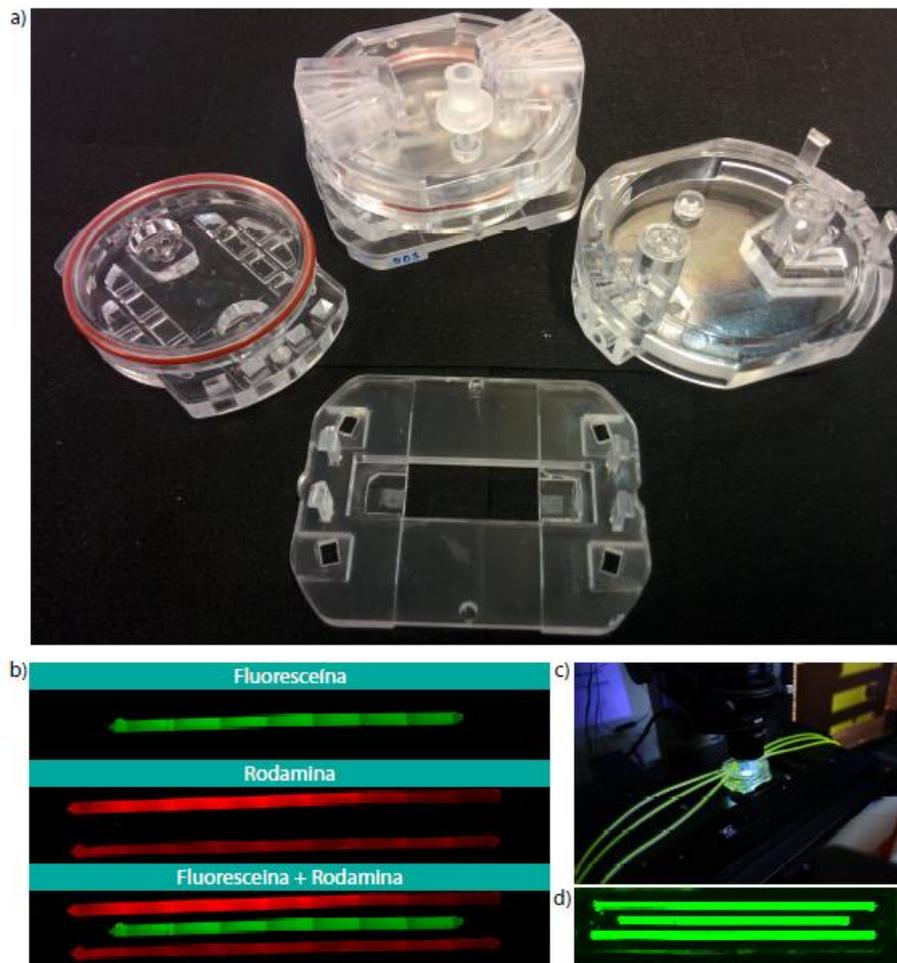


Figura 2.7. Fabricación del encapsulado e integración microdispositivo/encapsulado. a) Fotografía mostrando las distintas piezas obtenidas tras el proceso de inyección y encapsulado. Las tres piezas que forman el encapsulado fueron inyectadas sin que se observaran signos evidentes de deformación. El surco exterior en la pieza 2 permite el acople de la junta tórica que permite aislar el interior del encapsulado al acoplarse la pieza 2 a la 3. En la pieza 3 aparecen colocados los discos de Flexdym pegados a los cilindros proyectados por la pieza 3 usados como medio interno de sellado entre la pieza 2 y 3. Finalmente, se muestra el montaje del encapsulado completo con el filtro de $0,20\ \mu\text{m}$ acoplado al puerto de la pieza 3 para permitir el intercambio de gases con el exterior. **b) Imagen de microscopía de fluorescencia de las microcámaras del microdispositivo acoplado al encapsulado.** La inyección de distintos marcadores fluorescentes (*fluoresceína* y *rodamina*) en los distintos microcanales muestra la geometría definida de estos y excluye interconexión entre los mismos validando la calidad del pegado entre el cuerpo de Flexdym™ y la lámina suelo de COC. **c) Integración fluidica microdispositivo/encapsulado.** El conjunto cerrado microdispositivo/encapsulado se colocó en un microscopio de fluorescencia y se perfundió con una solución de *fluoresceína* a un caudal de $0,5\ \text{ml}/\text{min}$ durante 5 minutos sin que se observaran signos de fuga evidente entre los elementos, cruces de flujo entre las líneas fluidicas de cada canal o **d)** de interconexión entre los canales del microdispositivo.

FORTALEZA DE UNIÓN ENTRE LAS INTERFASES COC/FLEXDYM™/POLIESTIRENO

Para evaluar la fortaleza de unión de las distintas interfaces en el conjunto microdispositivo/encapsulado, la interfase entre el cuerpo microestructurado de Flexdym™ y el suelo de COC y la interfase entre el cuerpo microestructurado de Flexdym™ y el PS de la pieza 2 del encapsulado, se realizó un barrido de presiones de 10 kPa a 100 kPa con intervalos de 10 kPa con intervalos de presurización del circuito de 1

minuto. En la totalidad de los casos (n=9) el primer signo de debilitamiento del conjunto microdispositivo/encapsulado se detectó en la interfase formada por el cuerpo microestructurado de Flexdym™ y la pieza 2 del encapsulado. La presión media a la que se comenzó a detectar fuga de líquido entre los elementos de la interfase fue de $52,50 \pm 0,83$ kPa que corresponde con un valor medio de caudal de $17,3 \pm 0,27$ ml y un valor de τ de $149,93 \pm 2,34$ dina/cm² (figura 2.8).

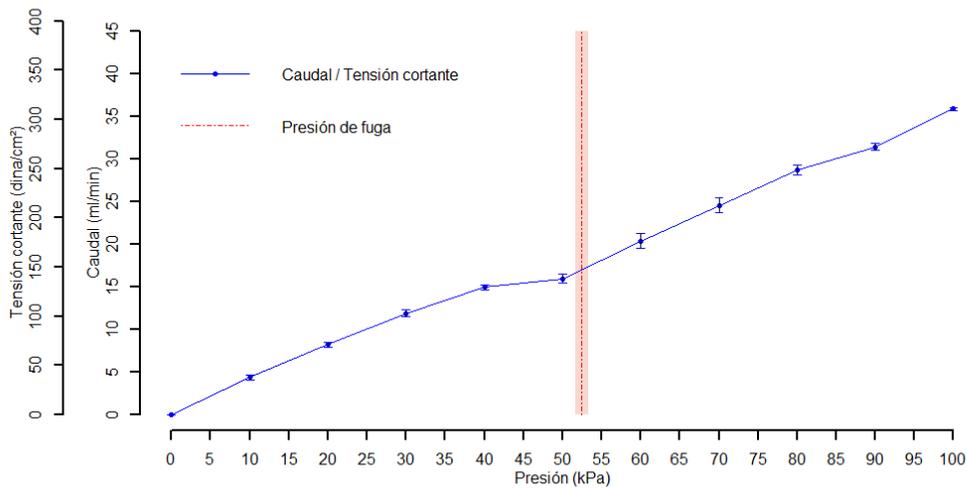


Figura 2.8. Test de presión para evaluar la fortaleza de unión entre las interfases COC/Flexdym™/poliestireno. La grafica representa la Presión (kPa) frente a Caudal (ml/min) y Tensión cortante (dina/cm²). La línea azul muestra el caudal/tensión cortante resultante para un determinado valor de presión, en cada punto se representa el error estándar de la media con las barras de error azules. La línea discontinua roja muestra el valor medio de presión en el que se observa el debilitamiento de la unión entre los elementos del conjunto microdispositivo encapsulado. El área sombreada roja representa el error estándar de la media del valor medio de presión.

FIABILIDAD DE LA INTEGRACIÓN DEL FLEXDYM™ EN EL CONJUNTO MICRODISPOSITIVO/ENCAPSULADO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL

La principal función del encapsulado es la actuar como elemento de traducción entre la escala macroscópica del usuario y la microscópica del interior del microdispositivo. Esto se consigue adaptando al entorno del microdispositivo el uso de elementos macroscópicos para dispensar o perfundir líquidos en o a través de este. En las etapas de siembra y mantenimiento del cultivo celular en el interior del microdispositivo en los que fue necesario realizar una manipulación manual de líquidos el encapsulado se adaptó perfectamente a su papel, permitiendo el correcto acople de la punta de la micropipeta (elemento volumétrico macroscópico) a las entradas fluídicas del microdispositivo. Permitiendo, una correcta dispensación de líquido en el microdispositivo al posicionar la boca de la punta de la micropipeta en contacto directo con la entrada fluídica del microdispositivo sin que se observaran debilitamiento en la unión entre el microdispositivo y la pieza 2 del encapsulado. Debido a que las entradas fluídicas en el microdispositivo se abrieron manualmente, perforando el cuerpo de Flexdym™ con un punch de biopsia, el tamaño de estas resultó mayor que la de la boca

de la punta de la micropipeta. Aun así, no se observaron fugas evidentes de medio entre la punta de la micropipeta y el encapsulado o el microdispositivo, debido al correcto acople entre en la punta de la micropipeta y las paredes del canal destinado a alojarla, sellando la conexión lo que permitió una correcta dispensación de líquido a través del microdispositivo. En estos pasos, el uso del protocolo de conexión de elementos fluídicos libre de burbujas permitió la dispensación de líquido a través de los canales del microdispositivo sin la generación o circulación de burbujas en todos los casos (figura 2.9). Permitiendo una correcta siembra en las cámaras de los microdispositivos, así como el mantenimiento del cultivo en estático en el interior del mismo.

En las etapas de conexión del microdispositivo a un circuito fluídico externo mediado por el encapsulado, el uso del protocolo de purgado combinado con el de conexión permitió la eliminación *in situ* de las burbujas contenidas en el circuito fluídico sin que fueran arrastradas al interior de las cámaras del microdispositivo. Durante el proceso de conexión de la pieza 3 al conjunto pieza2/pieza 1, no se observó la inserción accidental de aire al interior del microdispositivo (figura 2.9). La conexión entre las piezas 3 y el conjunto pieza2/pieza3, mediado a través de discos de Flexdym™ como elemento interno de sellado, permitió iniciar la perfusión en todos los casos sin que se observaran signos evidentes de fuga o flujos cruzados de una línea fluídica del circuito a otra. Sin embargo, tras 24 horas de cultivo a flujo en 6 de los 9 microdispositivos empleados se observó fuga y/o flujo cruzado en al menos uno de los canales fluídicos (figura 2.9) sin que se observara posteriormente despegue de los discos de Flexdym™ o bloqueo de los conductos fluídicos por desplazamiento de estos. Estos fallos en la conexión fluídica se observaron siempre en la unión entre la pieza 3 y el conjunto pieza 2/pieza 1, dando lugar a la aparición de fugas y/o flujos cruzados entre las líneas de flujo de cada canal del microdispositivo.

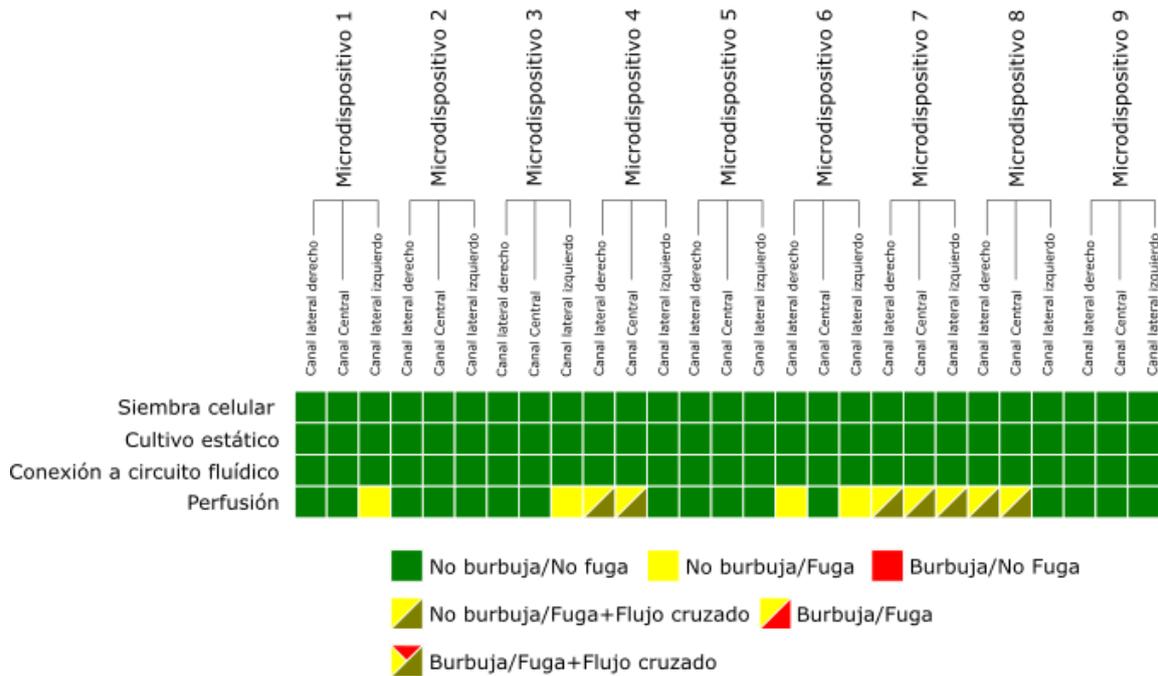


Figura 2.9. Evaluación experimental del comportamiento del conjunto microdispositivo/encapsulado. La gráfica, en formato mapa de calor, representa el comportamiento de cada microcanal en cada microdispositivo usado frente a 4 etapas diferentes del proceso experimental de cultivo y estimulación mecánica por flujo de las células renales LLC-PK1 (siembra celular, cultivo estático, conexión a circuito fluidoico y perfusión) con respecto a la integridad fluidica de la línea fluidica conectada al canal del microdispositivo (fuga, flujo cruzado entre canales o no fuga) y la presencia de burbujas en este (burbuja o no burbuja).

CULTIVO Y ESTIMULACIÓN MECÁNICA POR PASO DE UN FLUÍDO SOBRE LAS CÉLULAS RENALES LLC-PK1 EN EL CONJUNTO MICRODISPOSITIVO/ENCAPSULADO

Para simular las condiciones de estimulación mecánica debidas al paso de un fluido sobre el epitelio renal, las células LLC-PK1 se sembraron en los microdispositivos asistido por el uso de los encapsulados y protocolos desarrollados. Las células se mantuvieron en cultivo hasta formar una monocapa confluyente y continua en los canales de cultivo de los microdispositivos. Previa a la estimulación mecánica de las células en los microdispositivos se procedió a evaluar la viabilidad de las monocapas crecidas en los microdispositivos tras 48 horas de cultivo en estático con cambios de medio manuales. En los microdispositivos no se observó una pérdida de viabilidad significativa, conservándose mayoritariamente la integridad de la monocapa a lo largo de los canales de cultivo (figura 2.10). Pudiéndose observar también células adheridas no solo al suelo de COC del microdispositivo, sino también a las paredes y techos que definen los microcanales de cultivo en la pieza microestructurada de Flexdym™. Tras lo cual, las células fueron sometidas a una tensión cortante debida al paso de medio a través de los canales del microdispositivo de 0,17 dina/cm² durante 8 horas.

La evaluación del impacto de la estimulación mecánica debido al paso de flujo sobre las células renales LLC-PK1 se realizó una tinción específica de la actina, componente mayoritario del citoesqueleto. Las células LLC-PK1 no sometidas a flujo, en los microdispositivos control, mostraron pronunciadas fibras de estrés de actina citosólicas características de este tipo celular al crecer en sustratos rígidos. En cambio, en las células sometidas a flujo, se pudo observar una disminución en la cantidad de fibras de estrés de actina citosólicas y un reforzamiento de la red de actina en el dominio lateral, similar a lo observado en condiciones fisiológicas. Estos cambios fenotípicos en las células sometidas a flujo son consistentes con el comportamiento descrito en bibliografía (tabla 2.2) para estas células en condiciones de estimulación por flujo similares empleando modelos clásicos.

Tabla 2.2. Estudios in vitro del impacto de τ sobre el citoesqueleto de actina de distintos tipos celulares renales.

Ref.	Tipo Celular	Sustrato de Cultivo	τ Tiempo	Respuesta citoesqueleto de actina a τ
Essig 2001	Células primarias de ratón del tubulo proximal	Portaobjetos de vidrio	0,1 - 0,7 dyna/cm ² 24h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas
Essig 2001	Línea celular LLC-PK1	Portaobjetos de vidrio	0,1 dyna/cm ² 24h	↑ de la red lateral de actina
Friedrich 2006	Línea celular de podocitos de ratón	Portaobjetos de vidrio con revestimiento de colágeno IV	0,01 - 0,5 dyna/cm ² 20h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas
Duan 2008	Línea celular del tubulo proximal de ratón	Portaobjetos de vidrio con revestimiento de colágeno	1 dyna/cm ² 5h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas
Jang 2010	Células primarias de rata extraídas de medula renal	Membrana porosa revestida de fibronectina	1 dyna/cm ² 5h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas
Jang 2010	Células primarias de rata extraídas de medula renal	Portaobjetos de vidrio	1 dyna/cm ² 5h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas
Jang 2011	Células primarias extraídas de medula renal de rata	Membrana porosa de poliester	1 dyna/cm ² 3h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas
Cattaneo 2011	Línea celular MDCK	Portaobjetos de vidrio	2 dyna/cm ² 6h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas
Jang 2013	Células primarias humanas del tubulo proximal	Membrana porosa revestida de mezcla de proteínas de la matriz extracelular	0,2 dyna/cm ² 18h	↑ de la red lateral de actina ↓ de las fibras de estrés citosólicas

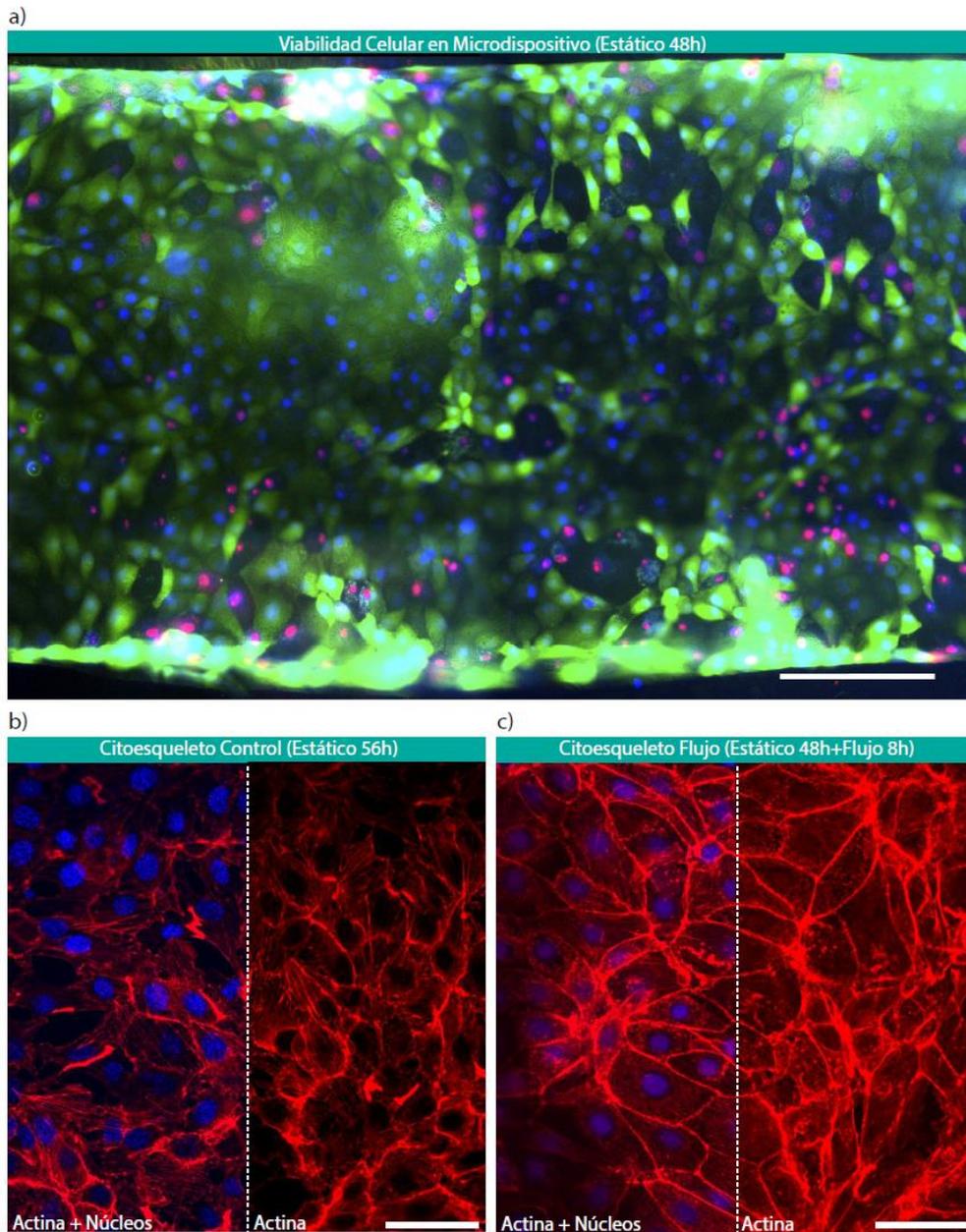


Figura 2.10. Cultivo y estimulación mecánica de las células del epitelio renal LLC-PK1 en el conjunto microdispositivo/encapsulado. a) Viabilidad celular en microdispositivo tras 48h de cultivo estático. Imagen compuesta de microscopia de fluorescencia a 100 aumentos mostrando una sección de un microcanal. La viabilidad celular se determinó usando Calceina AM/Ioduro de propidio que permite distinguir entre células viables (verde) y muerte celular (rojo), para facilitar la localización celular los núcleos de todas las células se marcaron con Hoechst33342 (azul) (la línea blanca en la imagen corresponde a 250 μ m). **b) Citoesqueleto de actina de células cultivadas en estático en microdispositivo 56 horas.** Imagen de fluorescencia a 200 aumentos de células renales LLC-PK1 en microdispositivo. La imagen se encuentra dividida por una línea blanca discontinua, la mitad izquierda de la imagen muestra la actina (rojo) y núcleos (azul), en la mitad derecha de la imagen solo se muestra la actina para favorecer la visualización de las fibras de estrés citosólicas propias de este tipo celular al crecer en sustratos rígidos (la línea blanca en la base de la imagen corresponde a 50 μ m). **c) Citoesqueleto de actina en células sometidas a flujo durante 8 horas tras 48 horas de cultivo estático en microdispositivo.** Imagen de fluorescencia a 200 aumentos de células renales LLC-PK1 en microdispositivo. La imagen tiene la misma configuración que la anterior. El lado izquierdo muestra la actina (rojo) y núcleos (azul) y el lado izquierdo solo actina para facilitar la visualización del reforzamiento de la red lateral de actina tras la estimulación por flujo (la línea blanca en la base de la imagen corresponde a 50 μ m).

DISCUSION

En las dos últimas décadas se ha producido un enorme desarrollo en el campo de la microfluídica. Especialmente, en el desarrollo de herramientas capaces de recrear microambientes (Hung et al. 2005)(Jose M Ayuso et al. 2016) y estructuras fisiológicas (Lee et al. 2007)(Hassell et al. 2018) con un nivel de complejidad difícilmente alcanzable por métodos clásicos. Sin embargo, existe una enorme disparidad entre el desarrollo de aplicaciones de microfluídica para cultivo celular y su difusión en ciencias de la vida. Una de las principales razones de esta disparidad es la propia complejidad de los sistemas microfluídicos, que requieren de equipo y personal especializado en estas tecnologías no solo para su fabricación sino para su uso.

En este trabajo se ha desarrollado un encapsulado para dispositivos de microfluidos destinados a ensayos de cultivo celular. Este encapsulado actúa como herramienta de apoyo durante todas las fases experimentales, reduciendo la complejidad de uso del dispositivo de microfluidos y ayudando al usuario a preservar la esterilidad del cultivo. La principal función del encapsulado es la de actuar como un sistema de traducción de escalas, entre la macroescala del usuario y la microescala del interior del microdispositivo. Para facilitar el uso del microdispositivo a un usuario novel, el encapsulado permite el empleo de herramientas volumétricas comunes en un laboratorio de cultivo celular (micropipeta) para dispensar líquidos de manera manual en el microdispositivo. Esto, permite al encapsulado asistir al usuario en los procesos de siembra y mantenimiento del cultivo al usuario. Para reducir la complejidad de uso del sistema, la conexión a un circuito externo que permita la perfusión de líquidos a través del microdispositivo de forma automática esta mediada a través de los propios elementos del encapsulado. Los distintos juegos de piezas del encapsulado se fabricaron por inyección de plásticos, debido a su bajo coste por pieza, rapidez de producción, reproducibilidad entre inyecciones y facilidad de escalado en la producción. Debido a estas características la inyección de plásticos se ha usado con éxito en el desarrollo de distintos sistemas microfluídicos, tanto a nivel de laboratorio como comercial.

Las piezas producidas por inyección no mostraron deformaciones u otros defectos macroscópicos debido a los procesos de inyección y enfriado de las piezas. En las piezas con elementos críticos para la inyección, tales como canales internos o las membranas presentes en la pieza 2, no se observaron alteraciones o discontinuidades mayores que pudieran afectar a la funcionalidad de las distintas partes del encapsulado. Sin embargo, pese al acabado en espejo de los moldes la superficie de las piezas mostró alteraciones que afectaron a la transparencia de la misma, llegándose a percibir los pasos de la fresa empleada en la fabricación del molde. Esto, sumado al hecho de que un haz de luz que incidiese sobre la parte superior del molde debería cruzar distintos medios con distintos índices de refracción (PS pieza 3/aire/PS pieza 2/aire/ Flexdym™) hasta alcanzar el canal de cultivo del microdispositivo, limito la capacidad de observar las células en campo claro con nitidez. Este problema se minimizo al usarse la microscopia de fluorescencia

al tener que atravesar la luz, tanto incidente como emitida, únicamente el suelo de COC del microdispositivo.

Para reducir la complejidad asociada a la fabricación de dispositivos de microfluídica, se introdujo el uso de un elastómero termoplástico blando (Flexdym™) como material para la fabricación de microdispositivos. Siendo el Flexdym™, el material en el que se graban las microestructuras del microdispositivo. Este proceso de grabado es sencillo y rápido comparado con otras técnicas empleadas en la fabricación de dispositivos de microfluídica, como la fabricación en fotorresinas como el SU-8 o en distintos termoplásticos, lo que facilitaría tanto el desarrollar distintos dispositivos hasta la optimización final del diseño como la fabricación de estos de una manera más rápida. Esto es debido principalmente a la propiedad del Flexdym™ de generar un contacto conformable, sin que existan rupturas o discontinuidades en la interfase de contacto, lo que permitiría la formación de circuitos fluídicos integrados en el cuerpo de Flexdym™ un solo paso. Además, las propiedades reológicas y viscoelásticas de los bloques de etileno/butileno del Flexdym™ permiten la fusión de manera reversible a otras superficies por contacto sin necesidad de introducir condiciones externas de presión, temperatura o el uso de distintos solventes. Esto permitiría el sellado de las microestructuras grabadas en el Flexdym™ directamente poniendo el cuerpo de Flexdym™ sobre otro material, dando lugar a un microdispositivo completo de manera rápida y sencilla.

Estas propiedades se aprovecharon para proceder al sellado de los canales del microdispositivo presentes en el cuerpo de Flexdym™. Así como la unión del microdispositivo, a través del cuerpo de Flexdym™, a la pieza 2 del encapsulado en un único paso. El sellado entre las tres partes se realizó a 65° C aplicando únicamente la presión del peso de la pieza 2 del encapsulado sobre el cuerpo microestructurado del Flexdym™, durante 24 horas. Esta estrategia permitió el pegado de los tres elementos anteriormente mencionados con éxito, quedando los distintos canales en los microdispositivos fluídicamente aislados entre sí.

Para evaluar la fortaleza de unión entre los tres elementos se realizó un test de resistencia a un golpe de presión. Se decidió ensayar los tres elementos a la vez, ya que el sistema encapsulado/microdispositivo debería funcionar como una unidad. La presión media a la que se comenzó a detectar fugas de líquido fue de $52,50 \pm 0,83$ kPa, detectándose la fuga de fluido en todas las ocasiones en la interfase formada entre la pieza 2 y el microdispositivo, que equivale a una tensión cortante debida al paso de un fluido de $149,93 \pm 2,34$ dina/cm². Teniendo en cuenta que la mayoría de las aplicaciones de microfluídica aplicadas a cultivo celular, que tratan de simular condiciones fisiológicas de estimulación mecánica asociada al paso de un fluido sobre un epitelio, se encuentran en el rango de 0.01 dina/cm² a 30 dina/cm² (Essig et al. 2001)(Friedrich 2006)(Duan et al. 2008)(Jang and Suh 2010)(Jang et al. 2011)(Cattaneo et al. 2011)(Jang et al. 2013). Es seguro afirmar que la unión mediada por el Flexdym™, para sellar los canales de cultivo en el microdispositivo y unir este al encapsulado, es lo suficientemente fuerte como para resistir presiones en el rango de las empleadas en los

dispositivos de microfluídos diseñados para recrear condiciones de flujo fisiológicas. Con la ganancia de función añadida que permite la unión directa del microdispositivo a otros elementos que faciliten, soporten o incrementen la información obtenida por el uso de estos.

El hecho de que la fuga se produzca de forma consistente entre la pieza 2 del encapsulado y el microdispositivo y no entre el cuerpo de Flexdym™ y la lámina de COC está relacionado con la propia naturaleza de las superficies de cada elemento, las cuales son dependientes de la técnica de fabricación utilizada para su producción. Las láminas de COC fueron producidas por extrusión biaxial del polímero, lo que permite generar láminas de bajo espesor con una superficie regular y muy homogénea. Esto facilita el contacto íntimo entre la superficie del COC y del Flexdym™ facilitando la unión entre ambas superficies. En el caso de la pieza 2 del encapsulado, la naturaleza de la superficie es dependiente tanto del proceso de inyección como del propio molde empleado en la inyección. Por lo que se podrían identificar tres posibles causas que afectarían a la calidad de la unión entre el Flexdym™ y la pieza 2 del encapsulado:

1) Imperfecciones en la superficie del material debido al estado de la superficie del molde. Como se ha señalado anteriormente, pese al pulido en espejo de las piezas, es posible detectar imperfecciones en la superficie de las piezas a simple vista originadas por imperfecciones en la superficie del propio molde. Esto, pese a que incrementaría la rugosidad de la superficie del encapsulado no debería suponer un problema a la hora de unir el Flexdym™ al encapsulado ya que la escala de estas imperfecciones estaría en la microescala, unas pocas decenas de micrómetros, que podrían ser absorbidas por las cualidades reológicas y viscoelásticas del Flexdym™.

2) Imperfecciones en la superficie del material debido al proceso de inyección y posterior enfriamiento de la pieza. La zona de conexión entre la pieza 2 del encapsulado y el microdispositivo es una zona crítica debido a la presencia de los tres puertos fluídicos que permiten el acople de una punta de micropipeta y su conexión a las entradas fluídicas del microdispositivo. Estos puertos se localizan muy próximos entre sí, equidistante centro a centro 2 mm, lo que genera tres zonas próximas entre sí con un cambio importante en la cantidad de material plástico. Esto, puede ocasionar un fenómeno de retracción del material, del orden de centenares de micrómetros, en la zona situada alrededor de los puertos que pueden afectar negativamente a la homogeneidad de la superficie reduciendo el área de contacto entre el Flexdym™ y la pieza 2 del encapsulado y por lo tanto debilitando la unión entre ambos materiales. Esto podría solucionarse incrementando la presión entre el encapsulado y el cuerpo de Flexdym™, a la temperatura de pegado (65 °C), aprovechando las propiedades elásticas del material para mejorar el contacto entre ambas superficies. Sin embargo, al realizarse esto sobre Flexdym™ estructurado los canales definidos en este sufrieron una deformación apreciable alterando las dimensiones de estos y por lo tanto la homogeneidad del flujo en su interior (datos no mostrados).

3) Presencia de agentes químicos en la superficie del encapsulado resultado del proceso de inyección. Es común en la industria de inyección de plásticos el uso de agentes

químicos que mejoren las propiedades del plástico en el proceso de inyección o faciliten el desmoldado y expulsión de las piezas tras un ciclo de inyección. Pese a que el proceso de inyección se realizó sin la adición de ningún agente al proceso, la producción de los dispositivos no se realizó en un equipo de inyección exclusivo para este tipo de inyecciones. Por lo que es posible que se produjera una transferencia de químicos provenientes de anteriores procesos de inyección que podrían haber contaminado la superficie de las piezas del encapsulado y por lo tanto la zona de contacto entre ambas superficies y afectarían la calidad del plástico inyectado. Sin embargo, el proceso de pegado no mejoró significativamente tras el lavado de las piezas del encapsulado en un baño de ultrasonidos (datos no mostrados).

La causa final de la menor fortaleza de adhesión entre el microdispositivo y el encapsulado posiblemente sea una combinación de los tres efectos anteriores. Siendo, probablemente, las imperfecciones asociadas al proceso de inyección y enfriamiento las que más contribuyan de las tres al debilitamiento de la unión entre microdispositivo y encapsulado.

Finalmente, para reducir el riesgo de introducir accidentalmente aire en el interior del encapsulado y atrapar burbujas en las estructuras internas del microdispositivo, capaces de alterar o incluso detener los perfiles de flujo en este, se han desarrollado dos protocolos específicos. Estos, tratan de reducir el riesgo de inserción accidental de aire en las fases más críticas de la manipulación del microdispositivo, la conexión de elementos fluídicos al chip y la conexión a un circuito fluídico externo. Ambos protocolos se han implementado con éxito en el diseño del encapsulado, añadiendo estructuras específicas para cumplir con estos e integrándose con las funcionalidades del encapsulado detalladas en el párrafo anterior. El uso de estos protocolos combinados con el encapsulado permitió realizar con éxito las etapas de siembra celular y cultivo en estático en el microdispositivo, generándose una monocapa confluyente y continua a lo largo de la superficie del canal de cultivo del microdispositivo, sin que se observara ni la introducción accidental de aire en el interior de los canales de cultivo ni fugas de líquido debidas al fallo de pegado de las distintas superficies. El uso combinado de protocolos y encapsulado permitió también la conexión entre el microdispositivo y un circuito de flujo externo que permitiera la perfusión continuada y automatizada de medio a través de los canales de cultivo del microdispositivo, condición necesaria para la automatización de esta clase de dispositivos y su escalado a sistemas de cribado de alto rendimiento. La conexión permitió establecer líneas de flujo independientes para cada canal de cultivo en el interior del microdispositivo, sin que se observaran fuga de líquido entre conexiones fluídicas o uniones entre distintos materiales. De igual manera, tampoco se observaron cruces entre líneas de flujo, donde impulsando en un canal se puede ver perfusión en dos o más canales, debidas a fallos en la conexión fluídica entre distintos elementos o fallos en el pegado entre el cuerpo de Flexdym™ y la lámina de COC, que permitieran conexión entre distintos los distintos canales de cultivo.

Sin embargo, tras 8 horas de flujo de automatizado en condiciones de cultivo en 6 de los 9 conjuntos microdispositivo/encapsulados empleados se observó fuga de medio en la

conexión fluídica entre las piezas 2 y 3. Además, en la mitad de los microdispositivos afectados se pudo observar cruces de flujo entre los canales afectados, sin que se observaran defectos en la unión entre el cuerpo microestructurado de Flexdym y la lámina de COC. Inicialmente no se detectó signos de fuga o cruce de flujos en la conexión entre las piezas 2 y 3, por lo que existe un deterioro con el paso del tiempo de la conexión fluídica entre ambos elementos. Existen varios factores que podrían afectar de manera negativa la unión fluídica entre la pieza 2 y 3 del encapsulado:

1) Defectos en la unión de la lámina de Flexdym™ a la pieza 3 del encapsulado como medio interno de sellado. Como se ha mencionado anteriormente la unión entre el Flexdym™ y la superficie del encapsulado puede verse afectada negativamente por distintos factores relacionados con la naturaleza de la superficie de la pieza del encapsulado a la que va a unirse. Sin embargo, en todos los casos las láminas de Flexdym™ permanecieron unidas a los cilindros proyectados por la pieza 3. Aún en el caso de perder la adhesión a la superficie del encapsulado, la lámina de Flexdym™ permanecería alojada en la unión entre ambas piezas actuando como una junta tórica deformable colocada entre ambas piezas.

2) Deformaciones de las láminas de Flexdym™ debido a la presión del cierre del encapsulado y efecto de la temperatura de incubación. Como se ha descrito anteriormente, el uso combinado de presión y temperatura permite el moldeo y el grabado del Flexdym™ para producir los cuerpos microestructurados de los microdispositivos. Es difícil de evaluar la presión ejercida sobre la lámina de Flexdym™ asociada al cierre del encapsulado. Siendo más sencillo evaluar el efecto de la temperatura sobre el material. El Flexdym™ es una mezcla de dos tipos de bloques, un conjunto de bloques blandos de etileno/butileno y bloques duros de PS. Ambos conjuntos de bloques tienen dos temperaturas de transición vítrea (T_g) distintas, negativa para el caso de los bloques de etileno/butileno lo que permite las capacidades de unión del Flexdym™ y una superior cercana a los 100 °C para los bloques duros de PS, considerándose esta última (T_g 100 °C), como la T_g de uso del material. Esta T_g queda lejos de la temperatura de un incubador de CO₂ de cultivo celular (37 °C), lo que concuerda con el hecho de que no se observaron deformaciones mayores en el espesor de las láminas tras los ensayos a flujo, por lo que ni la temperatura ni la presión del cierre en condiciones de cultivo parecen afectar de forma significativa las dimensiones del material.

3) Deformaciones en las piezas del encapsulado debidas a tensiones mecánicas debidas al cierre del mismo. El cierre del encapsulado se realiza a través del acople mecánico de distintos elementos (flechas y alojamientos) presentes en las distintas piezas del encapsulado. El cierre del mismo, con la suficiente fuerza como para permitir una conexión fluídica efectiva entre los distintos elementos, somete a las piezas del encapsulado a tensiones mecánicas. Estas tensiones afectarían especialmente a las flechas, que son las encargadas de preservar el cierre del encapsulado, pudiendo originar deformaciones en las mismas que hicieran perder fuerza al cierre entre los

elementos. Esto conllevaría una relajación de la presión en la zona de conexión entre la pieza 2 y 3 que podría producir fugas de líquido a nivel de esta conexión.

4) Dificultad de montaje del encapsulado en condiciones de esterilidad. El encapsulado es un juego de tres piezas que necesitan ser acopladas con precisión para permitir tanto el cierre estanco del mismo como una correcta conexión fluidica entre los distintos elementos. En el curso de un experimento de cultivo celular la manipulación, y por lo tanto el cierre del encapsulado, se debe realizar en el interior de una cabina de cultivo de flujo laminar para preservar la esterilidad del cultivo. Esto impone restricciones a la movilidad del usuario al operar dentro de la campana que limitan la capacidad del usuario para asegurar el correcto cierre entre elementos en el caso de que las piezas, debido a las variaciones de tolerancia del proceso de inyección, presenten variaciones en el encaje de las mismas. Lo que podría producir un encaje incorrecto entre los elementos quedando distribuida la presión del cierre de forma desigual, que podría suponer un debilitamiento con el tiempo del cierre. Finalmente, una vez realizado el cierre resulta prácticamente imposible liberar las flechas de la pieza 3 en ancladas en los alojamientos de la pieza 1 sin producir desplazamientos fluidicos incontrolados en el interior del microdispositivo, debidos a cambios de presión y altura de los elementos constituyentes del circuito y encapsulado. Todo esto limita la capacidad del usuario de corregir un fallo en el cierre una vez están conectado el microdispositivo al circuito fluidico a través del encapsulado.

El fallo de conexión entre la pieza 2 y 3, que permite el cierre estanco del encapsulado y la continuidad del circuito fluidico a través de él, parece ser mayoritariamente debido a una combinación de los dos últimos factores mencionados anteriormente, deformaciones en las piezas del encapsulado por las tensiones mecánicas debidas al cierre del mismo y la dificultad del montaje y cierre del encapsulado. Aunque es difícil establecer el peso de cada causa en el fallo de conexión si que resulta más evidente la sinergia que se establece entre ambas causas, ya que un cierre incorrecto causara sobre tensión sobre los elementos de cierre del encapsulado, flechas proyectadas desde la pieza 3, y a su vez deformaciones de estos elementos durante el proceso de cierre pueden conducir a una colocación incorrecta de las piezas durante el proceso de cierre.

La siembra y mantenimiento manual del cultivo en los microdispositivos asistida por el uso del encapsulado permitió la creación de monocapas en los dispositivos tras 48 horas de cultivo con una elevada viabilidad, observándose crecimiento celular no solo sobre la lámina de COP que actúa como suelo del dispositivo, sino también en las paredes y techo del canal estructurado en la pieza de Flexdym™. Lo que sugiere la posibilidad del uso del Flexdym™ como elemento único en la fabricación de dispositivos de microfluidica para cultivo celular. A pesar de los problemas aparecidos durante la fase de perfusión del microdispositivo asociados con el encapsulado, en 16 de los 27 canales empleados se consiguió establecer perfusión aislada y continuada en condiciones de esterilidad, con flujo continuo en los tres canales del microdispositivo en un tercio de dispositivos empleados. Las células LLC-PK1 sometidas a estimulación mecánica debido al paso de fluido a través de los microdispositivos sufrieron cambios observables en la ordenación

del citoesqueleto tras 8 horas de perfusión continuada. Las células, sometidas a una tensión cortante de $0,17 \text{ dina/cm}^2$, redujeron la cantidad de fibras de estrés citosólicas, características de este tipo celular en cultivo en condiciones estáticas, y se pudo observar un reforzamiento de la red de actina del dominio lateral citoplasmático similar al que se observa en células del epitelio renal *in vivo*. Esta reorganización del citoesqueleto observada tras la estimulación mecánica de las células en los microdispositivos es consistente con los resultados obtenidos empleando otros modelos experimentales tanto microfluídico y clásicos que emplearon la tensión cortante resultante del paso flujo para estimular mecánicamente células del epitelio renal, lo que validaría el uso de sistemas microfluídicos para el estudio del epitelio renal. El empleo de los sistemas microfluídicos aporta una serie de ventajas únicas con respecto a los sistemas tradicionales que pueden tener un gran impacto en el estudio del epitelio renal. El bajo número de células empleadas por ensayo permitiría el uso de células primarias humanas, incrementando la relevancia de los resultados, preservando a su vez la diferenciación de las mismas a través de la estimulación mecánica (exposición constante a una tensión cortante de valor definido) y/o bioquímica (el volumen en la microescala de los dispositivos reduciría el gasto en factores de crecimiento, hormonas y reactivos con respecto a los sistemas clásicos). Además, el uso de dispositivos de microfluídica permite la recreación del entorno fisiológico de las células, tanto de las condiciones fisicoquímicas como de su arquitectura, con una precisión difícilmente alcanzable por los sistemas tradicionales.

CONCLUSIONES

El uso de ETBs (Flexdym™) permite la fabricación de dispositivos de microfluídica destinados a cultivo celular a través de un proceso rápido, sencillo y económico. Estas ventajas con respecto a otros modelos de fabricación basados en termoplásticos y fotopolímeros permitirían la fabricación a pequeña escala reduciendo de forma considerable el coste, tanto económico como temporal, de generación de nuevos prototipos.

Las capacidades autoadhesivas de los ETBs (Flexdym™) por el simple contacto con otras superficies, sin necesidad de emplear solventes o presión y temperatura, permiten realizar simultáneamente el sellado del microdispositivo y la unión, fluídicamente estanca a rangos de presión fisiológicos, de este a un sistema auxiliar o de medida sin necesidad de elementos internos de sellado.

El uso de un sistema de encapsulado y de los protocolos de manipulación de líquidos y conexión libres de burbujas facilitan al usuario el uso del microdispositivo durante la fase experimental. Reduciendo el riesgo de inserción accidental de burbujas en el microdispositivo y permitiendo el uso de elementos de manipulación de líquidos familiares para el usuario.

El diseño del encapsulado como un conjunto de piezas permite incorporar funcionalidades individuales a las mismas, lo que facilita al usuario la manipulación

fluídica en el microdispositivo, la traducción de escalas, preservar la esterilidad del cultivo en este, etc. Sin embargo, la necesidad de conectar los distintos elementos entre sí genera puntos débiles, en cada zona de conexión, que al final restan fiabilidad al conjunto y complican el uso correcto del conjunto al usuario.

El uso combinado del encapsulado/microdispositivo permitió la observación del cambio fenotípico en células del epitelio renal (LLC-PK1) tras la estimulación mecánica debida al paso de flujo consistente con el observado en literatura empleando métodos clásicos. Lo que validaría el uso de esta plataforma como modelo para el estudio del efecto de la tensión de corte sobre el tejido del epitelio renal. Reduciendo el consumo en reactivos y células con respecto a los métodos clásicos y aportando unas condiciones de control difícilmente alcanzable por estos, debido a la definición de las microestructuras internas de los microdispositivos.

CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE UN SISTEMA
MULTIESCALA DE CONEXIÓN LIBRE DE
BURBUJAS A UN CIRCUITO FLUÍDICO E
INTEGRABLE EN DISPOSITIVOS
MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO CELULAR
DESARROLLADOS EN ELASTOMEROS
TERMOPLÁSTICOS BLANDOS

INTRODUCCIÓN

El uso de termoplásticos rígidos para la fabricación de dispositivos de cultivo celular por inyección que incorporen tanto elementos de microfluídica como de microfabricación, permitiría su escalar su producción en materiales considerados como sustrato estándar en cultivo celular. Permitiendo la miniaturización de sistemas experimentales complejos, así como el desarrollo de nuevas herramientas y sistemas de monitorización de alto rendimiento. Sin embargo, tal y como se ha discutido anteriormente, la mayoría de los prototipos microfluídicos se desarrollan en PDMS aprovechando la facilidad de fabricación, sencillez del sellado del microdispositivo y facilidad de conexión del prototipo a un circuito fluídico externo.

En comparación, la producción por inyección permite la producción en masa de dispositivos una vez superada la fase de prototipo, pero presenta una serie de desafíos en cuanto al cierre de los microdispositivos y su conexión a elementos externos. En el capítulo anterior, se discutió el empleo de elastómeros termoplásticos blandos, en concreto Flexdym™ (Lachaux et al. 2017) como una solución a mitad de terreno entre el comportamiento de los termoplásticos y el del PDMS. Facilitando el proceso de cierre de los microdispositivos a través de sus propiedades adhesivas a otras superficies, pero sin aportar una solución directa como el caso del PDMS a la conexión a un circuito fluídico externo. Esto se trató de resolver, en el capítulo anterior, a través de la integración del microdispositivo en un encapsulado que permitía su conexión a otros elementos fluídicos con la ganancia de función añadida de permitir realizar la manipulación/conexión fluídica libre de burbujas. Sin embargo, la necesidad de establecer múltiples conexiones entre los elementos constituyentes del conjunto microdispositivo/encapsulado, limitó su eficacia.

Una posible solución al problema de la conexión fluídica de un circuito externo a un dispositivo de microfluídos, minimizando el número de conexiones, sería la conexión directa del circuito al microdispositivo, tal y como se realiza en los dispositivos microfluídicos fabricados en PDMS. Esta aproximación se ha empleado con anterioridad con éxito en microdispositivos no basados en PDMS pegando, mediado por el uso de adhesivos, los tubos o capilares del circuito fluídico al propio microdispositivo (Fredrickson y Fan 2004). Sin embargo, la eficacia de la conexión está limitada a la habilidad del usuario (Oh et al. 2005) y puede conducir a contaminación química en el microdispositivo (Figeys et al. 1997). Además, una de las mayores limitaciones de esta aproximación es la irreversibilidad de las uniones (Oh et al. 2005), ya que una vez pegados el conjunto microdispositivo/circuito fluídico se convierten en una unidad. Para tratar de reducir la dependencia en la habilidad del usuario, así como la irreversibilidad de la conexión, se han desarrollado puertos fluídicos que permiten la unión del circuito fluídico al microdispositivo a través de conectores comerciales, sin embargo, en la mayoría de los casos estos requieren bien del pegado de los puertos fluídicos al microdispositivo (Urbaczek et al. 2017), involucrando de nuevo el uso de adhesivos y parte de los problemas que su uso conlleva, o bien múltiples pasos de conexión (Neumann et al. 2014) hasta establecer la unión fluídica entre el dispositivo de microfluídica y el conector externo.

Como solución para eliminar definitivamente la necesidad de pegado de los conectores, se desarrollaron prototipos de microdispositivos que integran de forma monolítica puertos fluídicos para la conexión del circuito fluídico al microdispositivo. Estos prototipos fueron desarrollados bien para su fabricación por inyección (Mair et al. 2006) como por impresión 3D (Au et al. 2014), lo que permitiría su escalado a nivel industrial. El uso de estos puertos fluídicos integrados monolíticamente reduciría la complejidad necesaria para la conexión de elementos fluídicos al microdispositivo, situando a los dispositivos fabricados por inyección de termoplásticos en una posición equiparable o de ventaja, debido a la robustez de la conexión, con respecto a la conexión fluídica en PDMS. Otra ventaja de la integración monolítica de los puertos de conexión fluídicos en los microdispositivos es que pueden ser diseñados para incorporar las estrategias de apoyo desarrolladas en el capítulo anterior destinadas a maximizar las probabilidades de finalizar con éxito un experimental microfluídico de cultivo celular involucrando, el cultivo celular, manipulación fluídica y conexión a un circuito fluídico auxiliar en el microdispositivo.

Finalmente, el problema del cierre del microdispositivo podría resolverse empleando el uso de elastómeros termoplásticos blandos que actuaran como suelo o base del microdispositivo (Mehta et al. 2009), pudiendo incorporar elementos microestructurados que permitieran incrementar la complejidad de la arquitectura interna de los dispositivos de microfluídicos. Las capacidades autoadhesivas de los elastómeros a otros termoplásticos permitirían el cierre por contacto directo de la parte de inyección conteniendo los puertos fluídicos a la lámina, estructurada o no, del elastómero. Sin embargo, para la aplicación de esta estrategia en aplicaciones de cultivo celular, sería necesario evaluar la compatibilidad del elastómero con el cultivo celular, sobre todo en aplicaciones que requieran de la adhesión celular al elastómero como sustrato, así como el posible efecto que tenga el elastómero sobre la respuesta celular.

OBJETIVOS

Desarrollar un interfaz fluídica de conexión capaz de ser integrada en un dispositivo microfluídico para minimizar el número de conexiones requeridas para su conexión a un circuito fluídico auxiliar externo.

Implementar en la interfaz fluídica de conexión los elementos necesarios para la implementación de los protocolos de conexión y manipulación fluídica libres de burbujas desarrollados en el capítulo anterior.

Evaluar la funcionalidad de la interfaz fluídica de conexión durante las distintas fases de cultivo celular en dispositivos microfluídicos. Así, como de los protocolos de conexión y manipulación fluídica libres de burbujas en el manejo experimental del microdispositivo.

Evaluar la viabilidad de la estrategia de construcción de dispositivos microfluídicos empleando el uso de un elastómero termoplástico blando como suelo del microdispositivo. Permitiendo el cierre del microdispositivo en un único paso por contacto directo de ambas superficies, microdispositivo y lámina de Flexdym™.

Validar el microdispositivo con las conexiones fluídicas integradas como unidad funcional para el desarrollo de un experimento de cultivo celular bajo condiciones dinámicas. Estudiando cambios fenotípicos de las células Caco2 asociados a la estimulación mecánica por el paso de un fluido.

Evaluar la compatibilidad del Flexdym™ como sustrato para el cultivo de células de carcinoma de colon Caco2 en dispositivos microfluídicos en condiciones de estimulación mecánica asociada a la tensión cortante generada por el paso de un fluido.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DE UN INTERFAZ DE CONEXIÓN FLUÍDICA MULTIESCALA E INTEGRACIÓN EN MICRODISPOSITIVOS

Objetivo y consideraciones del diseño

El principal objetivo en el desarrollo de la interfaz de conexión fluídica integrable en el microdispositivo es reducir la complejidad a la hora de efectuar la conexión fluídica del microdispositivo a otros elementos fluídicos y garantizar el sellado de esta conexión. Permitiendo en un único paso de conexión establecer una continuidad fluídica entre el microdispositivo y el circuito fluídico.

Tal y como se discutió en el capítulo anterior, al establecerse la conexión entre elementos fluídicos es posible el arrastre accidental de aire hacia el interior de las microestructuras del dispositivo. Lo que generaría la aparición de burbujas en el interior del microdispositivo que podrían comprometer la funcionalidad o viabilidad experimental del ensayo. Por esta razón, se decidió incluir en el diseño los elementos necesarios para implementar los protocolos de manipulación, purgado y conexión de elementos fluídicos libre de burbujas en el diseño desarrollados en el capítulo anterior. Dado que la principal funcionalidad de los microdispositivos desarrollados durante este trabajo es el cultivo celular se decidió, también, implementar en el diseño elementos que asistieran al usuario en la manipulación de los microdispositivos. Ayudando de esta manera al usuario a preservar la esterilidad del cultivo en los microdispositivos y facilitando la inspección por microscopia de los canales y cámaras de cultivo de los microdispositivos.

Finalmente, a la hora de seleccionar los elementos fluídicos para interactuar con el microdispositivo se decidió, al igual que en el capítulo anterior, el uso de micropipeta para el manejo manual de líquidos. Debido al uso extendido y generalizado en laboratorios de cultivo celular en la manipulación manual de líquidos, lo que la convierte en una herramienta familiar para un posible usuario no familiarizado en el uso de microdispositivos. Como elementos de conexión del circuito al microdispositivo se decidió emplear conectores roscados ¼-28 UNF en vez de los conectores de desplazamiento y encaje usados en el capítulo anterior. Esta decisión se tomó por varios motivos: 1) el desplazamiento del conector roscado puede ser controlado por el usuario, suavizando el impacto de posibles sobrepresiones fluídicas durante el cierre, 2) el cierre roscado presenta más estabilidad que el cierre por desplazamiento y encaje, lo que

permite asegurar el sellado en el punto de conexión, y 3) el cierre puede ser fácilmente revertido durante el experimental al contrario que en el caso del encapsulado donde el cierre era definitivo.

Diseño de la interfaz fluídica e integración en prototipos microfluídicos

El punto de partida para el diseño de la interfaz de conexión fluídica fue la de incorporar los protocolos y métodos de conexión desarrollados en el capítulo anterior. El fundamento en el que se basan tanto el protocolo de manipulación de líquidos como el de conexión es, tal y como se describe en el capítulo anterior, la de realizar ambos pasos en medio líquido evitando la presencia de aire en la zona de conexión que pueda ser desplazado hacia el interior del microdispositivo. Para generar esa continuidad líquida en la zona de conexión de los elementos fluídicos y el microdispositivo, se decidió situar encima de cada entrada fluídica un puerto de conexión fluídica con dos partes diferenciadas (figura 3.1): 1) un punto de acceso de acoplamiento de la punta de la micropipeta que actúe directamente como entrada fluídica al microdispositivo, de esta manera se reduce al mínimo el volumen muerto requerido para la conexión de ambos elementos asegurando el sellado de la misma al acoplar la punta de la micropipeta en la entrada fluídica, y 2) un puerto de conexión fluídica con las paredes roscadas que permitiera la conexión entre el circuito y el microdispositivo a través de un conector roscado de -28 UNF. Para generar la continuidad fluídica entre ambos elementos, el puerto de conexión fluídica actúa como reservorio de medio para permitir esa conexión fluídica. Para permitir el purgado del circuito fluídico *in situ*, así como el escape del aire tanto presente en el circuito como en la zona de conexión, se introdujo en el diseño un corte en la pared del puerto fluídico. Este corte eliminó parte de la pared del puerto fluídico permitiendo abrir una vía de escape al aire desplazado durante el purgado y formación de una continuidad líquida entre los elementos a conectar. De esta forma al roscar el conector ¼-28 UNF hasta la mitad del puerto fluídico el aire desplazado dispone de una vía de escape al exterior y no es desplazado ni hacia el dispositivo ni la zona de conexión. Una vez purgado el circuito y establecido la continuidad fluídica, el desplazamiento del conector ¼-28 UNF se puede realizar de forma controlada y reversible. Esto permitiría reducir el posible impacto sobre las células de la sobrepresión generada durante el cierre. En el caso del encapsulado descrito en el capítulo anterior, este cierre se conseguía desplazando la pieza 3 en el conjunto pieza 2/pieza 1 sin control en el cierre más allá de la propia pericia del usuario a la hora de manejar el conjunto microdispositivo/encapsulado.

Para evitar posibles contaminaciones debido al derrame de medio al exterior del puerto fluídico, desde el corte en la pared, se incluyó en el diseño una piscina adyacente al puerto que actuara como colector confinando el medio de cultivo desplazado. La piscina se diseñó con un ligero peralte que favoreciera el desplazamiento del líquido hacia la pared de la piscina más alejada del puerto fluídico, lo que permite retirar el medio manualmente con ayuda de una micropipeta o pipeta de vidrio Pasteur desechable sin perturbar el medio contenido en el puerto fluídico destinado a actuar como continuidad

líquida para los protocolos de conexión de elementos fluídicos y manipulación de líquidos en el microdispositivo.

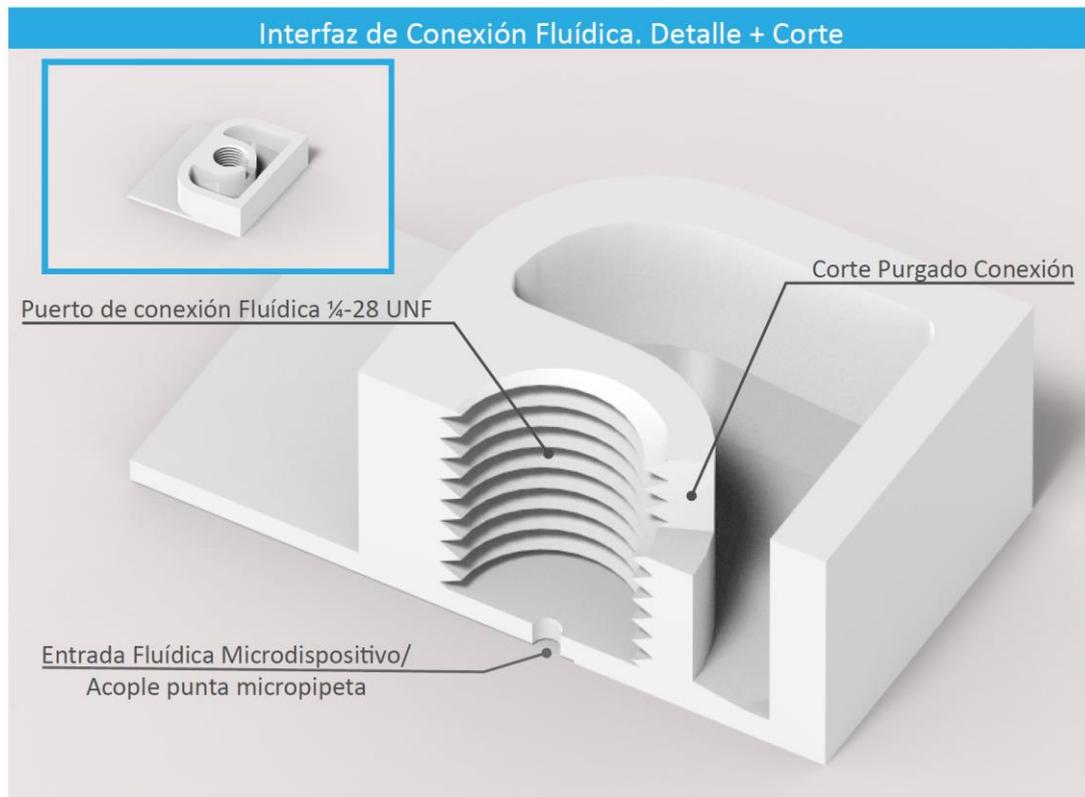


Figura 3.1. Renderizado del diseño de la interfaz de conexión fluídica integrable en el microdispositivo. El diseño de la interfaz de conexión se realizó teniendo como objetivos: 1) la integración de los protocolos de manipulación, conexión y purgado desarrollados en el capítulo anterior y, 2) la normalización de las estructuras involucradas en el proceso de conexión al uso de micropipetas para la manipulación manual y conectores roscados del tipo ¼-28 UNF para la conexión al circuito fluídico. La **entrada microfluídica del microdispositivo** se diseñó para **acoplar una punta de micropipeta** de 100 µl de manera hermética para asegurar una correcta conexión fluídica. La continuidad líquida para permitir la conexión en un entorno libre de aire, fundamento de los protocolos desarrollados en el capítulo anterior, se consiguió acoplando sobre la entrada fluídica del microdispositivo el **puerto de conexión al conector roscado ¼-28 UNF**, el pocillo formado actúa como reservorio de medio al igual que los pocillos en la pieza 2 del encapsulado descrito en el capítulo anterior. Con la ventaja de que cada entrada fluídica dispondría de su propio conector siendo independiente del resto de entradas fluídicas, al contrario que en el encapsulado descrito en el capítulo anterior. Finalmente, para permitir el purgado del circuito fluídico in situ fue necesario introducir en el diseño un **corte** en la pared del puerto fluídico que permitiera la salida del aire/líquido desplazado durante el purgado del circuito/manipulación de líquidos. Para evitar posibles contaminaciones, se confino el medio desplazado de la zona de conexión a una piscina adyacente al puerto de conexión fluídico, que permitiera el almacenamiento y retirada del medio durante la manipulación del microdispositivo. El detalle en la figura, recuadrado en azul, representa el diseño de un interfaz de conexión fluídica adaptado para un solo canal.

El diseño de la interfaz de conexión fluídica integrada al microdispositivo asociada a la entrada fluídica de un canal del microdispositivo lo convierte en modular, lo que permite su acople a distintos modelos de microdispositivos. Para demostrar esta cualidad se diseñaron tres modelos de microdispositivos comúnmente empleados en bibliografía como plataformas experimentales de cultivo celular en microfluidos: 1) un

microdispositivo de un canal simple (Sakolish, et al. 2017) empleado comúnmente en el estudio del comportamiento de células epiteliales en condiciones de flujo, 2) un microdispositivo de gradiente (Ma et al. 2010)(Song and Munn 2011b)(S. Kim et al. 2013) que permite el confinamiento de células en un hidrogel generando un entorno de cultivo tridimensional y, 3) un microdispositivo transmembrana (Huh et al. 2010) (Jang and Suh 2010) (Vedula et al. 2017) que permite el cultivo de células epiteliales en arquitecturas que distinguen dos espacios físicos distintos separados por un epitelio celular. Para facilitar el manejo al usuario, los tres prototipos se diseñaron ajustando su anchura ($\approx 25\text{mm}$) poder acoplarse a un portaobjetos de microscopio, lo que facilitaría la observación de las células sembradas en los microdispositivos.

El prototipo del canal (figura 3.2.a) resultó el más sencillo, al solo poseer una única entrada fluídica a cada extremo del canal, existiendo suficiente espacio para colocar una interfaz de conexión fluídica a cada extremo del microdispositivo. En el caso del dispositivo de gradiente (figura 3.2.b) el diseño del microdispositivo requiere de dos canales laterales destinados a la perfusión de medio que rodean a un canal central donde se encuentra confinado el hidrogel en el que se encuentran las células. Experimentalmente el llenado del canal con el hidrogel es necesario realizarlo con el microdispositivo vacío y seco, dado que el confinamiento es dependiente del equilibrio entre la presión del líquido y el aire y la interacción del líquido con la superficie de confinamiento. Por ello, se decidió colocar las interfaces de conexión en las entradas y salidas fluídicas del microdispositivo que actúan como canales normales donde se va a realizar la manipulación de líquidos y conexión a otros elementos fluídicos. Debido a la proximidad de los puertos fluídicos, en vez de poseer cada uno de ellos una piscina independiente para la recolección del medio sobrante se decidió crear una única piscina que compartieran ambas interfaces de conexión. La altura del pocillo hasta el corte en el puerto fluídico asegura la independencia entre canales, al contrario que en el encapsulado descrito en el capítulo anterior, dotando al microdispositivo de mayor flexibilidad experimental. Por último, el acceso al canal central se diseñó para ajustar la punta de una micropipeta de manera hermética, de forma que el hidrogel, más viscoso que el medio de cultivo, fluyera hacia delante. Además, esto permite controlar de manera más precisa el llenado del canal central facilitando el confinamiento del gel al poder controlar la presión de llenado del canal. El último prototipo diseñado para evaluar la integración de las interfaces de conexión fue el dispositivo transmembrana (figura 3.3.c). La estructura interna del microdispositivo consta de dos canales fluídicos que corren a dos alturas distintas y que se comunican entre sí al recorrer superpuestos los canales una fracción de su recorrido. Esta zona de comunicación entre canales está separada por una membrana de poliéster porosa con poros de $1\ \mu\text{m}$ Cyclopore™ (F1712-28A, Whatman®).

a)



b)



c)



Figura 3.2. Integración de la interfaz de conexión fluidica libre de burbujas en distintos modelos de dispositivos microfluidicos. La interfaz de conexión fluidica es modular al asociarse a una única entrada fluidica, lo que permitiría su integración en microdispositivos con distintas geometrías internas. a) El modelo más sencillo sería el de un **único canal microfluidico** en el que a cada entrada fluidica se le ha acoplado la interfaz de conexión y una pequeña piscina destinada a la recolección del medio desplazado durante las fases de manipulación fluidica del microdispositivo. b) Una mayor complejidad debido a la estructura interna del microdispositivo es la del **microdispositivo de gradiente**, en el que dos canales laterales corren paralelos a un canal central que se ensancha en una cámara de cultivo destinada a confinar un hidrogel que contiene a las células en un entorno tridimensional. Debido a las necesidades experimentales de manipulación, el canal central ha de cargarse en vacío para permitir el confinamiento del hidrogel en la cámara, por ello en vez de acoplar una interfaz de conexión fluidica al canal central la entrada fluidica se diseñó para acoplar de manera hermética una punta de pipeta que permitiera inyectar el hidrogel en la cámara sin pérdidas de presión. Los canales laterales permiten dispensar medio fresco en el microdispositivo, bien manual o a través de su conexión a un circuito fluidico auxiliar. Debido a su función se acopló en el diseño la interfaz de conexión fluidica a cada canal, compartiendo la piscina de rebose debido a necesidades de espacio. La altura de la pared de los puertos fluidicos permite que exista independencia entre las interfaces de conexión situadas a cada extremo del microdispositivo. c) El **microdispositivo transmembrana** formado por dos canales que discurren a distintas alturas en el microdispositivo y que corren superpuestos durante una fracción de su longitud y separados por una membrana porosa, trata de recrear arquitecturas fisiológicas en las que dos espacios de composición diferente se encuentran separados por un epitelio con permeabilidad selectiva. Las interfaces fluidicas al igual que en el caso anterior comparten la piscina destinada a contener el medio desplazado del microdispositivo durante la manipulación del microdispositivo, al igual que en el caso anterior la altura de pared de los puertos de conexión mantiene aisladas a las interfaces de conexión fluidica.

Esta membrana actuará como soporte para la siembra de células epiteliales que actuarán como barrera selectiva entre los dos espacios separados por la monocapa, el canal superior y el inferior. Ambos canales actúan como canales independientes a través de los cuales fluirán o será necesario manipular distintos líquidos, simulando dos espacios fisiológicos distintos separados a través de un epitelio. Debido a las limitaciones de espacio se decidió integrar ambos interfaces de conexión de manera similar, a la empleada con las interfaces de conexión fluidicas incorporadas en el dispositivo de gradiente. De nuevo a pesar de compartir la piscina de recolección del medio sobrante, la altura de la pared de los puertos fluidicos asegura la independencia entre canales.

INTEGRACIÓN DE LAS INTERFACES DE CONEXIÓN EN MICRODISPOSITIVOS DE INYECCIÓN

La interfaz de conexión se integró en el diseño de un microdispositivo de tres canales (figura 3.3) rectos fluidicamente independientes, al ser la microestructura más sencilla de producir por inyección y requerir, únicamente, del cerrado con la lámina suelo para cerrar el microdispositivo. Se eligió incorporar tres canales independientes para aumentar el número de ensayos independientes por microdispositivo y evaluar la viabilidad de incorporar tres interfaces de conexión independientes unidas a través de la piscina de rebose. La integración de las tres interfaces independientes de conexión requirió, como en los prototipos mostrados en el apartado anterior, que compartieran la piscina que recoge el medio de cultivo sobrante durante los procesos de conexión y purga del circuito fluidico al microdispositivo. Al igual que en los prototipos anteriores, la altura de pared de los puertos de conexión garantiza la independencia de los tres canales entre sí. El microdispositivo se diseñó con unas dimensiones equivalentes a la de un portaobjetos de microscopía (75 mm X 25 mm) para facilitar la visualización de las células en el microdispositivo.

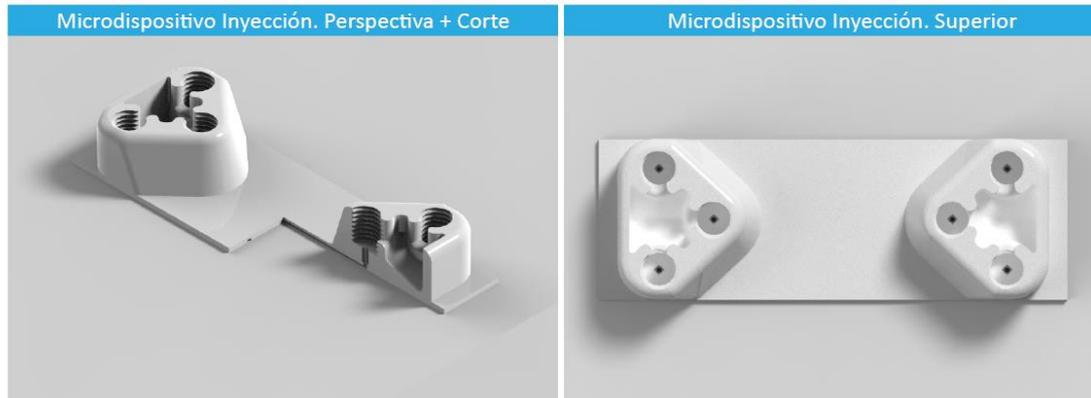


Figura 3.3. Renderizado del microdispositivo de inyección de tres canales integrando las interfaces de conexión independientes para cada canal en el microdispositivo. El microdispositivo elegido como prototipo de inyección fue el de tres canales rectos fluidicamente independientes dada su facilidad de inyección. Para integrar las interfaces de conexión fluidica en el microdispositivo, fue necesario que compartieran la piscina que actúa como recolector del medio desplazado durante la fase de purga *in situ* y conexión del circuito fluidico al microdispositivo.

PROTOCOLO DE CONEXIÓN ENTRE ELEMENTOS FLUÍDICOS Y MICRODISPOSITIVO LIBRE DE BURBUJAS.

El fundamento de este protocolo es el mismo empleado en el capítulo anterior para conseguir una conexión entre elementos fluidicos en estático libre de burbujas (bien sea durante la conexión a un circuito fluidico o la inserción manual de líquidos en el microdispositivo): realizar la conexión entre esos elementos en una continuidad líquida. Lo que reduce, el riesgo de arrastrar aire involuntariamente hacia el interior del microdispositivo durante la conexión o manipulación de líquidos involucrando elementos macroscópicos.

Al inicio del protocolo se realiza el llenado de los pocillos situados en los puertos de conexión fluidica del microdispositivo con medio de cultivo. Es en estos pocillos donde se realizará la conexión fluidica entre las microestructuras del interior del microdispositivo y los elementos auxiliares de manipulación de líquidos. Si el microdispositivo no se encuentra lleno de líquido, como al inicio del ensayo antes de la siembra celular, pueden generarse burbujas en el interior del microdispositivo al poder desplazarse el medio en los pocillos hacia el interior del microdispositivo por acción de la gravedad y la capilaridad. Este llenado es dependiente de la geometría interna del microdispositivo y de la naturaleza de la superficie, por lo que se pueden generar áreas donde el aire quede atrapado en el microdispositivo (figura 3.4.a). Estas burbujas pueden eliminarse fácilmente del microdispositivo con ayuda de una micropipeta, embocando la punta a la entrada fluidica del microcanal situada en el interior del pocillo y perfundiendo medio hasta arrastrarlas fuera del microcanal (figura 3.4.b). La entrada fluidica del microcanal permite la correcta conexión entre el microdispositivo y la punta de la micropipeta en ausencia de aire en la zona de conexión. El exceso de medio perfundido durante la eliminación de las burbujas de los microcanales es desplazado a

la piscina colectora (figura 3.4.c), evitando así la generación de flujos indeseados debidos a diferencia de altura entre el medio alojado en los pocillos. Este exceso de medio puede ser fácilmente retirado con ayuda de una micropipeta o pipeta Pasteur de vidrio. Esto deja el microdispositivo completamente cebado sin la presencia de burbujas en los microcanales, listo para siguientes manipulaciones (figura 3.4.d).

La dispensación de un nuevo volumen de líquido en el microdispositivo, por ejemplo, durante el recambio de medio o la siembra celular, se realiza repitiendo los pasos anteriores. Con ayuda de una micropipeta la nueva solución se perfunde a través del canal hasta reemplazar el medio presente en el microdispositivo (figura 3.4.e). El medio desplazado durante el proceso de manipulación de líquidos pasa a la piscina central y, al igual que en el caso anterior, puede ser retirado manualmente sin riesgo de alterar el líquido comprendido en el microcanal (figura 3.4.f).

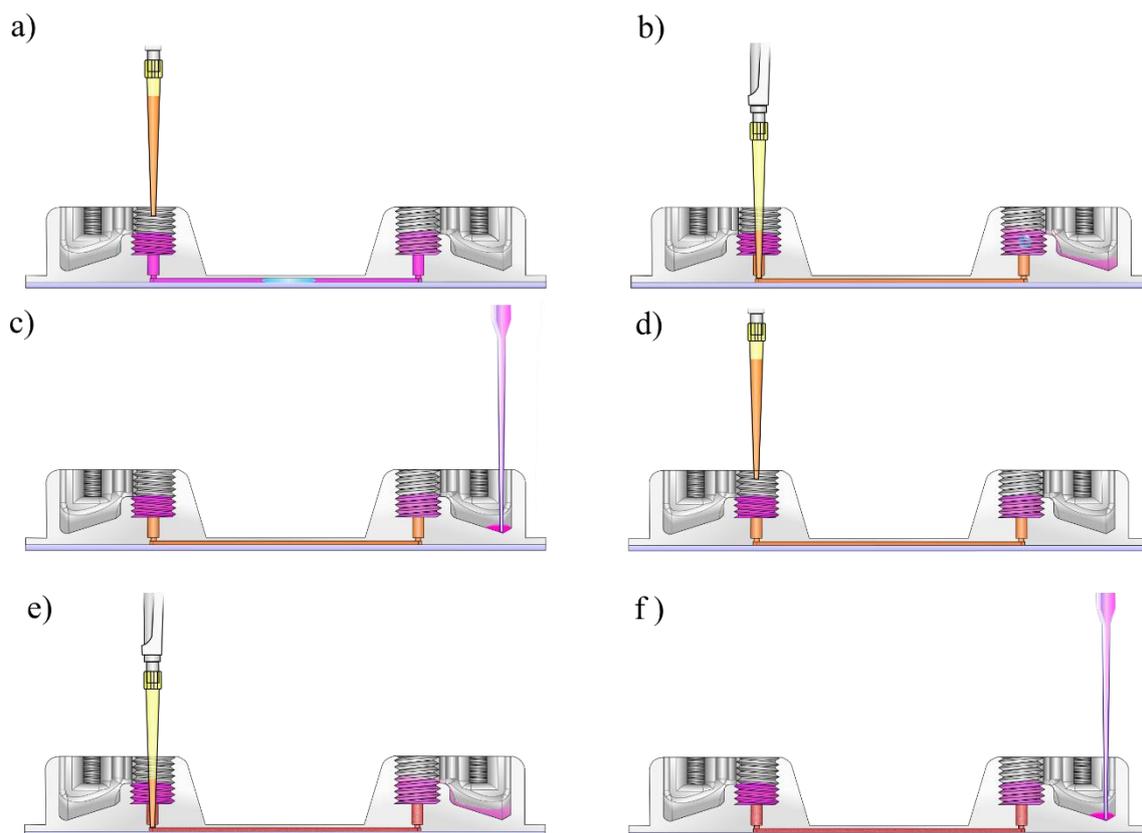


Figura 3.4. Esquema gráfico del protocolo de conexión entre elementos fluidicos y microdispositivo a través de la interfaz de conexión integrada en el microdispositivo. a) Llenado de los pocillos en los puertos fluidicos. El llenado de los pocillos es el punto de partida del protocolo al generar la continuidad líquido/líquido en la zona de conexión entre el microdispositivo y la punta de micropipeta. b) Conexión entre el microdispositivo y la punta de pipeta y purgado del microdispositivo. Al realizarse en un entorno líquido y generarse una conexión hermética al acoplarse la punta de la pipeta a la entrada microfluídica se evita la inserción accidental de burbujas. Esto permite desplazar de manera efectiva las burbujas de aire en las estructuras internas del microdispositivo. El líquido desplazado durante el purgado va a parar a la piscina de contención gracias al corte en la pared del puerto de conexión. c) Retirada del medio desplazado del microdispositivo durante el purgado. Una finalizada la fase de purgado del microdispositivo, el medio desplazado en este paso permanece contenido en la piscina adyacente a la interfaz de conexión y puede ser retirado manualmente sin perturbar el medio en las interfaces de conexión. d) y e) Dispensación manual de líquido en el microdispositivo. Una vez purgado el microdispositivo del aire atrapado en las estructuras internas se puede cargar el microdispositivo de nuevo, por ejemplo, durante la fase de siembra celular del microdispositivo. f) Retirada del medio desplazado durante la fase de dispensación manual de líquidos. Al igual que en el caso anterior el medio desplazado desde la interfaz de conexión fluidica pasa a la piscina adyacente, lo que permite su confinamiento y posterior retirada.

PROTOCOLO DE PURGA Y CONEXIÓN ENTRE CIRCUITO FLUÍDICO Y MICRODISPOSITIVO LIBRE DE BURBUJAS.

Como se ha discutido en el capítulo anterior, el desplazamiento de burbujas desde el circuito fluídico hacia el interior del microdispositivo puede afectar negativamente el curso del experimento, bien dañando las células en el microdispositivo debido al paso de la burbuja por el microcanal o bien al alojarse en las microestructuras del microdispositivo y alterar los patrones de flujo en este. La purga inicial del circuito

inmediata a la conexión al microdispositivo reduce el riesgo de arrastrar burbujas atrapadas en el circuito fluídico al inicio del experimental. La ventaja de realizar esta purga *in situ* en el modelo propuesto es la reducción del riesgo de introducir aire en el circuito en la zona de conexión gracias al protocolo de conexión libre de burbujas. Reduciendo así el riesgo de introducir aire en el interior del microdispositivo, de dos fuentes de riesgo distintas, en un solo paso.

El protocolo comienza con el microdispositivo sembrado, libre de burbujas en su interior y con los pocillos llenos de medio actuando como reservorio, al cual se va a conectar el circuito fluídico auxiliar, todavía sin purgar, a través de los conectores roscados (figura 3.5.a). El primer paso para el purgado es el roscado parcial del conector al puerto fluídico, de manera que el roscado permita estabilizar el conector en el puerto, pero sin bloquear la salida de líquido a través del corte lateral presente en el pocillo/puerto fluídico. Tras lo que se inicia la perfusión de medio a través del circuito (figura 3.5.b). El flujo de medio a través del circuito desplazará las posibles burbujas en este, permitiendo su salida de la línea de flujo al exterior por flotabilidad de las propias burbujas. El exceso de medio empleado en el cebado es recogido en la piscina central situada entre los tres puertos fluídicos pudiendo ser retirado, por ejemplo, con ayuda de una pipeta de vidrio Pasteur estéril (figura 3.5.c). Una vez cebado el circuito, la conexión de este al microdispositivo se hace por roscado del conector fluídico en el puerto permitiendo la perfusión de medio a través del microdispositivo (figura 3.5.d). El cierre roscado permite un cierre más controlado, suavizando el impacto de posibles flujos hacia el interior del microdispositivo debidos al desplazamiento de volumen durante el cierre.

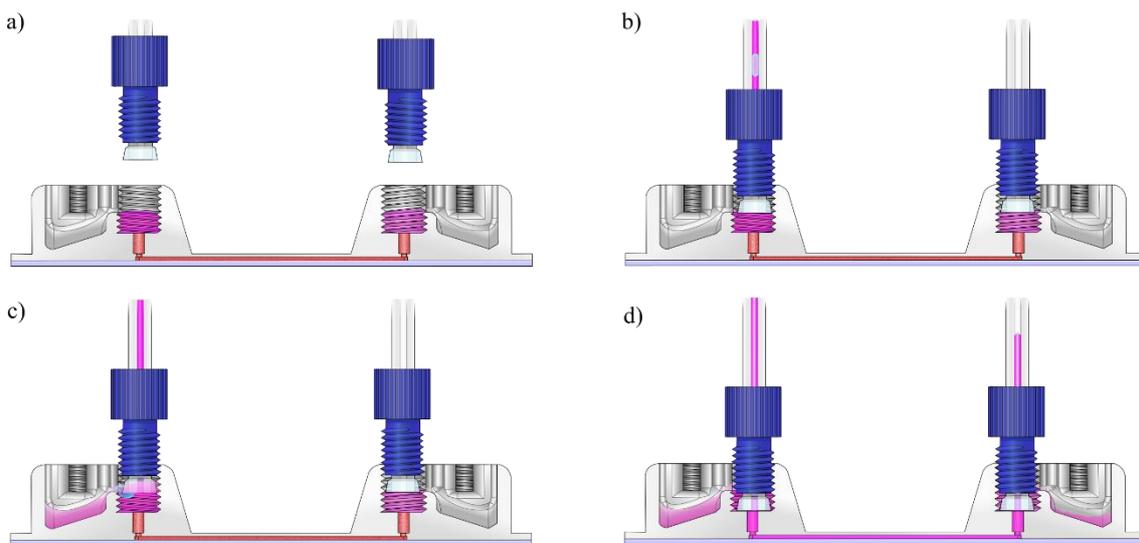


Figura 3.5. Esquema gráfico del protocolo de purga y conexión entre circuito fluidoico y microdispositivo a través de la interfaz de conexión integrada en el microdispositivo. a) Al inicio del protocolo el microdispositivo, libre de burbujas en su interior, está listo para ser conectado al circuito fluidoico a través de los conectores $\frac{1}{4}$ -28 UNF. Los pocillos que forman el puerto fluidoico de conexión del conector se encuentran llenos de medio para generar la continuidad líquida que permita la unión de ambos elementos, microdispositivo y circuito fluidoico. **b) y c) Purga del circuito fluidoico in situ.** El proceso de purga comienza con el roscado parcial del conector al puerto fluidoico, de manera que quede fijo al microdispositivo, pero sin bloquear el corte en la pared destinado a la evacuación del aire y medio desplazado durante el purgado del circuito fluidoico de la zona de conexión. Las burbujas atrapadas en el circuito son liberadas al exterior mientras se genera una continuidad líquida entre el conector y la entrada fluidoica del microdispositivo. Este proceso se continua hasta la eliminación completa de aire en el circuito y en la zona de conexión. **d) Conexión entre el circuito fluidoico y el microdispositivo.** Una vez purgado el circuito y generada la continuidad líquida entre los elementos de conexión, se procede al roscado completo del conector, asegurándose la conexión hermética entre el circuito fluidoico y el microdispositivo. Finalmente, el medio desplazado durante el proceso de purga y conexión, que ha quedado recogido en la piscina adyacente a la interfaz de conexión, puede ser retirado manualmente sin peligro de alterar la conexión fluidoica entre circuito y microdispositivo.

INYECCIÓN DE ELEMENTOS MICROESTRUCTURADOS EN COP

La inyección de los cuerpos de los microdispositivos en COP fue realizada por la empresa Moldes y Plásticos de Aragón S.L. El diseño inicial de la parte microestructurada del microdispositivo fue optimizado para optimizar el proceso de inyección y desmoldeo de las piezas, tras lo cual se mecanizó un molde de inyección de precisión. Al igual que en el capítulo anterior el molde se pulió para permitir un acabado de espejo, para eliminar el máximo número de imperfecciones de la superficie que pudieran afectar a la transparencia óptica de las piezas inyectadas.

El proceso de inyección se realizó en una máquina de inyección de plásticos Meteor 550/270 (55 Tm) (Mateu & Solé). Los moldes se refrigeraron durante el proceso de forma continuada por inyección de agua a 15 °C. Los parámetros de presión, temperatura, etc., se optimizaron para obtener la máxima calidad en las piezas

inyectadas. No se añadió ningún aditivo al plástico o al molde en ninguna de las etapas del proceso de inyección.

FABRICACIÓN DEL MICROPOSITIVO DE COP/FLEXDYM™

El único paso necesario para completar los microdispositivos fue la unión del cuerpo microestructurado inyectado en COP a la lámina de Flexdym™ que actuó como base del microdispositivo y sustrato de adhesión celular. Esta unión se realizó aprovechando las cualidades conformacionales del Flexdym™ que permiten su adhesión a otras superficies. La lámina de Flexdym™ y el cuerpo microestructurado de COP se pusieron en contacto, para permitir el contacto íntimo entre ambas superficies, durante 24 horas a 65°C.

La calidad del pegado del microdispositivo se comprobó inicialmente a través de la elección de tres microdispositivos al azar por ronda de fabricación. En estos microdispositivos se llenaron de manera manual los canales laterales con una disolución de fluoresceína sódica (Excitación=460 nm, Emisión=515 nm) (F6377, Sigma Aldrich) al 0.5% (p/v) en agua destilada y el canal central con una disolución de rodamina B (Excitación=553 nm, Emisión=627 nm) (83689, Sigma Aldrich) al 0.5% (p/v) en agua destilada. Tras el llenado, se examinó individualmente cada microdispositivo por microscopía de fluorescencia buscando fugas, pérdidas de geometría de los microcanales o conexiones entre los canales del microdispositivo.

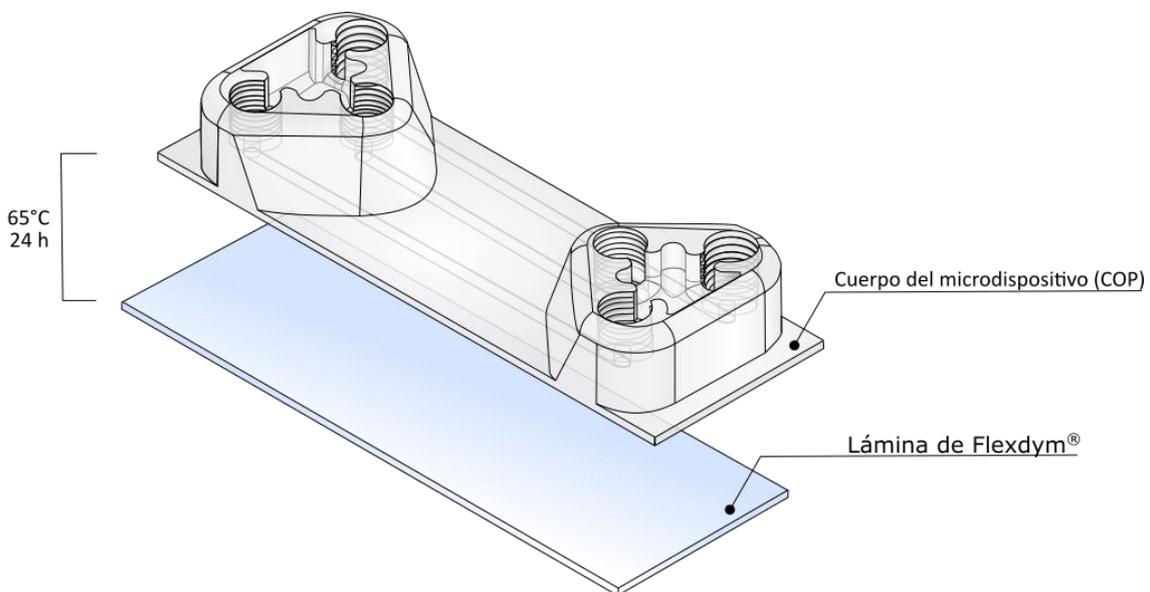


Figura 3.6. Esquema de fabricación del microdispositivo Flexdym™/COP. El proceso se realizó en un único paso aprovechando las cualidades autoadhesivas del Flexdym a otros termoplásticos. El cuerpo microestructurado COP, conteniendo las interfaces de conexión fluidicas y los microcanales, se pusieron en contacto con la lámina suela de Flexdym™. El conjunto se mantuvo a 65°C durante 24h para permitir la unión entre los elementos.

Para evaluar la estanqueidad de la unión entre los canales del microdispositivo y los conectores roscados unidos a un circuito fluido externo auxiliar se eligieron tres microdispositivos al azar por ronda de fabricación. Estos se cerraron para establecer continuidad fluidica en el circuito y se perfundieron con una disolución de fluoresceína sódica al 0.5% (p/v) a un caudal de 0.5 ml/min a través del microdispositivo durante 5 minutos. El circuito empleado utilizaba una bomba de jeringuilla (NE-1600, New Era) como fuente de presión, tres jeringuillas de 5 ml (309647, BD) como reservorio conectadas directamente con el conjunto encapsulado/microdispositivo usando tubo flexible de Tygon® de 1.6 mm de diámetro interno y 3.2 mm de diámetro externo (ACG00003, Saint-Goban) a través de los conectores tipo *barb* (EW-40612-43, Cole-Parmer) situados en la parte superior de los conectores roscados (JR-050BL-10, VICI). Finalmente, se conectaron las salidas fluidicas del microdispositivo de manera análoga a un vaso de precipitados de 100 ml como colector del líquido eluido del circuito.

TEST DE PRESIÓN PARA DETERMINAR LA FORTALEZA DE UNIÓN CUERPO MICROESTRUCTURADO DE COC/LÁMINA DE FLEXDYM™

La fortaleza de la unión entre la interfase formada por el cuerpo microestructurado inyectado en COP y la base de Flexdym™ del microdispositivo se evaluó a través de un test de fuga de líquido frente a un golpe de presión (Patrino et al. 2007)(Thompson and Abate 2013)(You et al. 2013) (n=9). El protocolo seguido fue idéntico al empleado en el capítulo anterior para evaluar la fortaleza de unión entre las distintas interfases del conjunto microdispositivo/encapsulado. Un caudal de líquido no compresible (agua destilada) generado por una fuente de presión constante se hizo circular a través del microdispositivo conectado a un circuito fluido. En el cual, la estructura más restrictiva al paso de líquido debido a las dimensiones físicas de esta son las cámaras del microdispositivo, lo que somete a esfuerzo la unión entre el cuerpo microestructurado de COP y la lámina de Flexdym™. Para evaluar la fortaleza de esta unión, se estableció un rango de presiones desde 10 kPa hasta 150 kPa con variaciones de 10 kPa, cerrándose el circuito en la parte distal para conseguir la presurización del mismo durante 1 minuto tras la estabilización del caudal. Durante todo el proceso, los microdispositivos se sometieron a escrutinio buscándose signos de fuga de líquido o debilitamiento entre la interfase COP/Flexdym™ (Ej. La conexión fluidica entre los distintos canales del microdispositivo, la pérdida de la geometría definida de los microcanales por despegue o signos de debilitamiento en la unión de los elementos).

Como fuente de presión para impulsar el líquido se empleó la línea de aire a presión de las instalaciones del I3A, capaz de generar una presión estable y continuada de 6 atmosferas de presión. El circuito fluídico empleado estaba compuesto en ambos experimentos, en orden desde la fuente de presión, de: un manómetro de seguridad de 0 a 2 atmosferas para regular la presión de aire entrante en el sistema, un manómetro digital de precisión con un rango de trabajo de 0 a 2 atmosferas de presión, una botella de pírrex de 100 ml, que actuó como reservorio del líquido a impulsar a través del sistema (agua destilada), con cuello de botella GL45 que permite acoplar una tapa roscada para cromatografía líquida de alta presión con tres puertos GL14 roscados (11 297 51, Duran) adaptados para acoplar tubos rígidos de 3,2 mm (11 298 15, Duran) de diámetro externo. Las conexiones entre el reservorio y el microdispositivo se realizaron a través de tubo Tygon® de 3,2 mm de diámetro externo y 1,6 mm de diámetro interno. La conexión tubo a encapsulado se realizó a través de conectores tipo *barb* situados en la parte superior de los conectores roscados. Finalmente, para determinar el caudal asociado a cada punto de presión, así como el valor de tensión cortante en las cámaras del microdispositivo, se repitió el mismo montaje experimental, pero dejando abierto las salidas fluídicas. Para obtener los valores de caudal en cada presión se colocó un vaso de precipitados de 500 ml colocado sobre una balanza de precisión para calcular los caudales obtenidos por pesada (n=9).

TIPOS CELULARES, MEDIOS DE CULTIVO Y CULTIVO CELULAR

La línea celular humana de carcinoma de colon Caco2 (HTB-37™, ATCC®) se creció de manera rutinaria usando como medio de crecimiento completo D10, descrito en capítulos anteriores, suplementado con 25mM de HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico) (15630106, Thermo-Fisher Scientific). Los cultivos se mantuvieron en crecimiento en un incubador de CO₂ (TEB-1000, EBERS) a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera saturada de humedad. Los cultivos se mantuvieron, con cambios de medio cada 2-3 días. Las células se pasaron a un ratio de subcultivo de 1:32 con respecto al cultivo original para el mantenimiento de la línea celular en cultivo.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR PRESTO® BLUE DE CACO2 EN DISCOS DE FLEXDYM™

Para evaluar el posible impacto del Flexdym™ como sustrato en el crecimiento de células de carcinoma de colon Caco2, se realizó un ensayo de viabilidad celular y proliferación basado en la reducción metabólica celular de la resazurina. En un primer paso, se obtuvieron discos de 6 mm de diámetro, con ayuda de un sacabocados, a partir de láminas de Flexdym™ de 700 µm de espesor. Los discos (n=27), uno por pocillo, se colocaron en placas de 96 pocillos tratadas para el cultivo celular usadas como soporte para el ensayo de citotoxicidad. Para facilitar la adhesión del disco de Flexdym™ al fondo del pocillo, a través de las propiedades adhesivas del Flexdym™ a otros termoplásticos, las placas de 96 pocillos se colocaron en una estufa a 65°C durante 24 horas. Una vez

comprobada la adhesión de los discos al fondo de los pocillos de placa se activó la superficie de los discos de Flexdym™ por un tratamiento de plasma de oxígeno, el cual incrementa la presencia de grupos polares en la superficie de los discos facilitando la adhesión celular. Las condiciones de tratamiento que vienen recogidas en la tabla 4 fueron de: potencia 200W, flujo de oxígeno 50 cm³/min, vacío en cámara 0.4 mbar, temperatura 30° C, tiempo de tratamiento 1 min en un sistema de plasma Atto W6 (Diener).

Tabla 3.1 Condiciones del tratamiento por plasma de oxígeno para la activación superficial de termoplásticos poliméricos (COP) y elastómeros termoplásticos blandos (Flexdym™)

Potencia (W)	Caudal de O ₂ (cm ³ /min)	Vacío (mbar)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
200 W	50 cm ³ /min	0,4 mbar	30 °C	60 s

Previo a la siembra celular las placas con los discos de Flexdym™ adheridos se esterilizaron realizando por pocillo tres lavados con 100 µl de una dilución etanol/agua 70%(v/v), seguidos de tres lavados con agua destilada estéril para eliminar restos de alcohol. Finalmente, las placas se dejaron secar bajo flujo de aire estéril en campana de flujo laminar. Una vez secas, las placas se expusieron a la luz ultravioleta (UVC) de la campana de flujo laminar durante 15 minutos. Ningún signo de contaminación se apreció en ninguna placa esterilizada siguiendo este proceso.

En cada pocillo se añadieron 100 µl de una suspensión celular de Caco2 conteniendo 10⁴ células, tanto en los pocillos con discos de Flexdym™ como en pocillos sin disco como control de crecimiento en poliestireno, en medio de cultivo completo D10. Las placas se incubaron durante 24h a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera saturada de humedad en un incubador de CO₂ (TEB-1000, EBERS) para permitir la adhesión celular al sustrato de cultivo. Tras el periodo de adhesión, se retiró el medio de cada pocillo y se añadieron 100 µl por pocillo de la solución de ensayo del reactivo Presto Blue® (A13262, Thermo-Fisher Scientific), preparada diluyendo al 10% el reactivo Presto Blue® en medio de cultivo completo D10 (v/v). Las placas se incubaron durante 4 horas, en condiciones de cultivo, tras lo cual 100 µl de cada pocillo de las placas de ensayo se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos para permitir su lectura. A las placas de ensayo se les añadieron 100 µl de medio de cultivo completo D10 y se devolvieron al incubador de cultivo, repitiéndose el ensayo cada 24 horas hasta las 72 horas de cultivo. En las placas de lectura se siguió el cambio de fluorescencia debido a la reducción metabólica de la resazurina a resorfurina empleando un lector de microplacas con capacidad multi-detección (espectrofotómetro, fluorímetro y luminómetro) Synergy HT (Biotek) ajustado a longitudes de onda 560 nm para la excitación y 590 nm para la emisión.

SIEMBRA, CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE FLUJO EN MICRODISPOSITIVOS

Para favorecer la adhesión celular a la superficie de Flexdym® y la capilaridad en los microdispositivos, se incrementó la energía libre superficial de ambos elementos por un tratamiento de plasma de oxígeno (tabla 3.1) a los microdispositivos ensamblados.

Los microdispositivos se esterilizaron siguiendo un protocolo similar al empleado en el capítulo anterior para el conjunto microdispositivo/encapsulado. Primero, los microdispositivos fueron sumergidos en una dilución de etanol al 70% (v/v) en agua durante 5 minutos. Para asegurar la correcta esterilización de los canales en los microdispositivos, se perfundió con ayuda de una pipeta de 1000 µl etanol a través de los canales del microdispositivo, repitiéndose este paso un mínimo de tres veces. Después, se retiró el alcohol usando una línea de vacío y una pipeta Pasteur de vidrio estéril. Para eliminar los posibles restos de alcohol, el conjunto completo se sumergió en agua destilada estéril y se repitió el paso de perfusión a través de los canales del microdispositivo con ayuda de una micropipeta de 1000 µl, repitiéndose este paso tres veces. El agua estéril se retiró siguiendo el mismo procedimiento empleado para retirar el alcohol en el paso anterior, con ayuda de una línea de vacío y una pipeta Pasteur de vidrio estéril. Finalmente, los microdispositivos se dejaron bajo flujo de aire estéril en la campana de flujo laminar hasta su completo secado. Ningún signo posterior de contaminación se detectó en los microdispositivos esterilizados de esta manera.

Los microdispositivos se sembraron siguiendo el protocolo de siembra libre de burbujas asistido por el propio microdispositivo descrito anteriormente. Como primer paso, un volumen de 100µl de una suspensión celular de Caco2 de $2,5 \cdot 10^6$ células/ml se perfundió a través de cada canal del microdispositivo, evitándose contaminación cruzada entre los distintos canales gracias a los pocillos independientes superpuestos a las entradas fluídicas de los microdispositivos. Para favorecer la adhesión celular, los microdispositivos sembrados se dejaron en el incubador de CO₂. La adhesión celular se comprobó mediante microscopía de campo claro tras cuatro horas de incubación, los microdispositivos se mantuvieron en cultivo el tiempo necesario para la formación de una monocapa continua en los canales de cultivo. Los cambios de medio, en estático, se efectuaron cada 12 horas siguiendo el protocolo desarrollado para la manipulación manual de líquidos mediado por el propio microdispositivo.

La conexión de los microdispositivos (n=9) al circuito fluídico auxiliar externo se realizó siguiendo el protocolo de conexión libre de burbujas mediado por el propio microdispositivo. El circuito fluídico estaba compuesto en orden desde la fuente de presión de: una bomba de jeringa programable de seis canales (NE-1600, New Era), tres jeringuillas de 50ml (309654, BD) por microdispositivo (una por cada canal independiente del microdispositivo) acopladas a la bomba de jeringa que actúan como reservorio de medio que conectan directamente con el microdispositivo usando tubo flexible Tygon® de diámetro interno de 1,6 a través de conectores tipo *barb* alojados en la parte superior de los conectores roscados situados a la entrada y salida de cada canal

del microdispositivo, finalmente tubo Tygon® de diámetro 1.6 mm conectó cada conector roscado situado a la salida de cada canal con un tubo Falcon de 50ml, uno por cada línea de flujo independiente, que actuaron como colectores del medio perfundido a través del microdispositivo. Tras el cebado del sistema fluídico y la conexión del circuito al microdispositivo, el sistema se colocó en un incubador de CO₂ y se perfundió durante 72 horas a una caudal de 20,9 µl/min, siendo la tensión de corte en la superficie del canal de 0,1 dina/cm².

VIABILIDAD CELULAR EN LOS MICRODISPOSITIVOS Y DISCOS DE FLEXDYM™

La determinación de la viabilidad celular en los microdispositivos tras la perfusión se realizó empleando los marcadores fluorescentes: Calceina-AM (C1430, Thermo Fisher Scientific) a 1mg/ml en DMSO como marcador de viabilidad, yoduro de propidio (P4170, Sigma Aldrich) a 2mg/ml en DMSO como marcador de muerte celular y Hoescht 33342 (H33342) (B2261, Sigma Aldrich) a 1 µg/ml en DMSO para marcar los núcleos. El marcaje se realizó en un único paso, al igual que en el capítulo anterior, para reducir la manipulación manual de los microdispositivos, realizándose una tinción tras 72 horas de perfusión continuada.

Para evaluar la viabilidad celular en los discos de Flexdym™, cada 24 horas se realizó una tinción de viabilidad celular empleando los marcadores: Calceina-AM, Ioduro de Propidio y Hoechst 33342 sobre un segundo lote de discos (n=27), sembrados siguiendo los pasos descritos con anterioridad. En un primer paso se retiró el medio de cultivo de los pocillos a evaluar y se lavaron las células llenando el pocillo con 100 µl de PBS estéril (BE17-161E, Lonza). Tras el lavado, se retiró el PBS de los pocillos y se añadieron 100 µl de la tinción de viabilidad descrita anteriormente incubando a 37°C los discos durante 5 min. Tras la incubación los discos se trasladaron a un portaobjetos de vidrio con pocillos adheridos (80826, IBIDI®), con ayuda de unas pinzas estériles, para facilitar su visualización. Cada pocillo se rellenó con 50µl de medio de cultivo Modificado Eagle de Dulbecco bajo en glucosa (1g/L) (BE12-707F, Lonza) sin suplementar con suero. La viabilidad celular en los discos se comprobó por microscopía de fluorescencia.

MICROSCOPÍA Y ANÁLISIS DE IMAGEN

Las imágenes de microscopía de fluorescencia y de contraste de fase de las células en las cámaras de los microdispositivos se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E (Nikon) acoplado a una cámara de fluorescencia de alta resolución Luca R (Andor). Las imágenes volumétricas de las células en los microdispositivos se tomaron usando el modo de apilamiento de imágenes en Z y procesadas con el software Nis-Elements (Nikon). Las imágenes obtenidas de este modo fueron procesadas por con ayuda del software libre de procesamiento y cuantificación de imagen ImageJ.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron estadísticamente analizados utilizando el software libre R. Para cada grupo de valores se obtuvo el valor promedio y se calculó el error estándar de la media como medida de dispersión de los valores del grupo con respecto a este. Los análisis de relación entre variables cuantitativas se obtuvieron a través de una prueba t de Student apareada con un intervalo de confianza del 5% ($p=0.05$).

RESULTADOS

VIABILIDAD DEL FLEXDYM™ COMO SUSTRATO DE CULTIVO PARA CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON CACO2

Las células Caco2 sembradas en discos de Flexdym™, cuya superficie había sido previamente activada por tratamiento con plasma de oxígeno, se monitorizaron durante las primeras 72h de cultivo evaluándose la viabilidad celular a través de dos métodos: 1) un ensayo fluorimétrico basado en la reducción de la resazurina en resofurina, y 2) por microscopia de fluorescencia a través de una tinción de viabilidad (Calceína AM/Ioduro de Propidio). En el caso del ensayo fluorimétrico (figura 3.7.a), las células Caco2 fueron sembradas en discos de Flexdym™ y en poliestireno tratado para el cultivo celular como control. Tras 24 horas de cultivo desde la siembra, las células sembradas en Flexdym™ obtuvieron un valor de absorbancia normalizado, que corresponde con la actividad metabólica celular y por lo tanto al número de células metabólicamente activas o viables, de $0,080 \pm 0,001$ u.a frente a $0,098 \pm 0,001$ u.a de las células en poliestireno. A las 48 horas de la siembra los valores de absorbancia obtenidos fueron de $0,133 \pm 0,001$ u.a en Flexdym™ y de $0,147 \pm 0,003$ en poliestireno. Finalmente, tras 72 horas los valores de absorbancia medidos fueron de 0.215 ± 0.001 u.a para el cultivo en Flexdym™ frente a 0.242 ± 0.002 u.a para el cultivo en poliestireno. En ambos materiales se pudo observar un aumento de los valores de absorbancia a lo largo del tiempo que indicaría proliferación celular sobre ambos materiales. Comparando los valores de absorbancia de ambos materiales en cada punto temporal no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos materiales, lo que indicó unas tasas de proliferación celular similares en ambos materiales.

Los anteriores resultados de viabilidad y proliferación se pudieron comprobar visualmente a través de la tinción fluorescente de viabilidad (figura 3.7.b). Las células carcinoma de colon Caco2 tras 24 horas de cultivo sobre discos de Flexdym™ mostraron una alta viabilidad celular con células adheridas a la superficie del material y con una buena morfología celular. Tras 48 horas de cultivo, la buena viabilidad se mantuvo y se pudo observar la formación de una monocapa en la superficie del disco con células mostrando la morfología propia de este tipo celular. La viabilidad 72h después de la siembra se mantuvo y en la monocapa se observó la evolución morfológica propia de este tipo celular, el empaquetamiento de las células en una morfología cúbica, así como el inicio de crecimiento estratificado del cultivo.

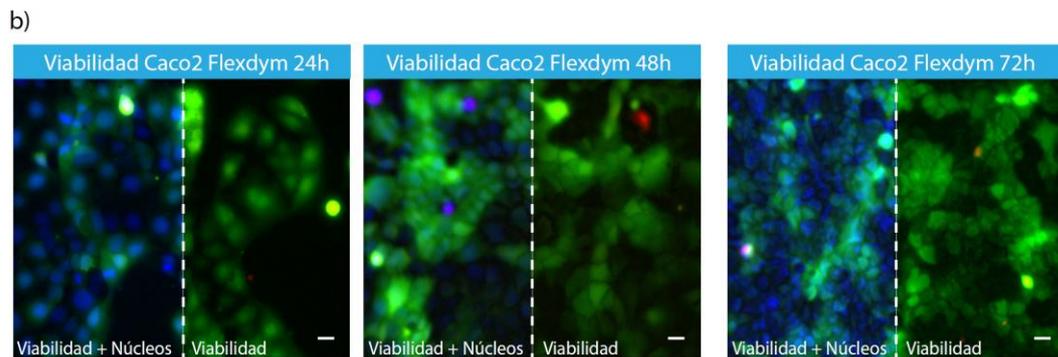
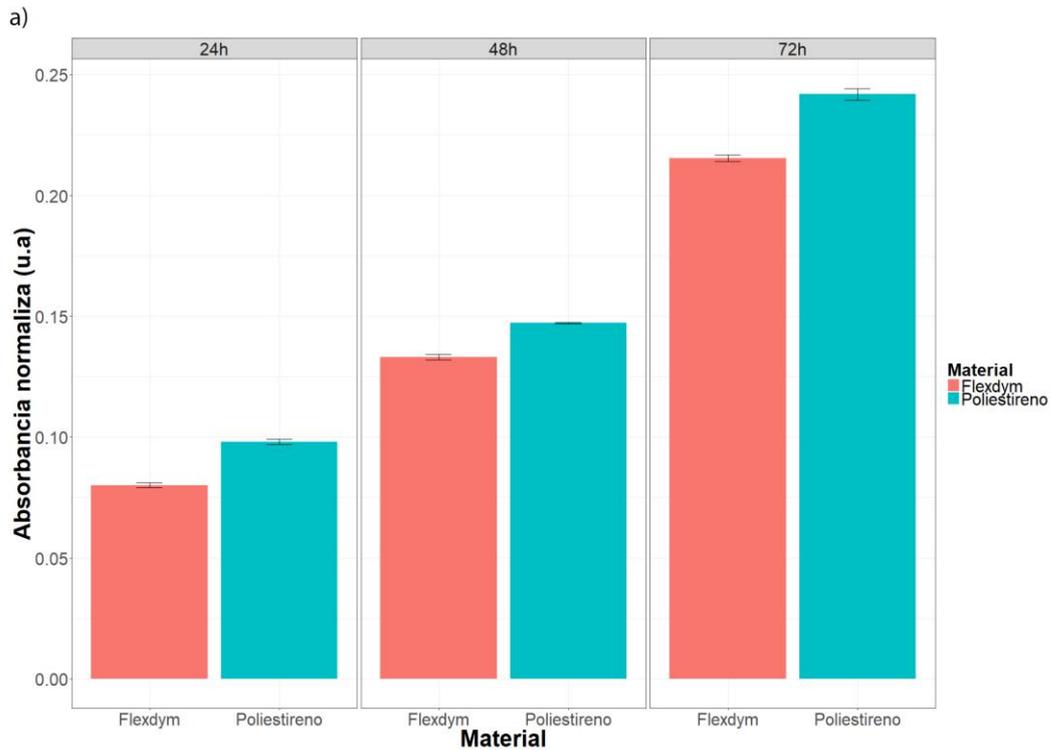


Figura 3.7. Viabilidad del Flexdym™ como sustrato de cultivo para Caco2. a) La gráfica de barras representa la actividad reductora metabólica de células Caco2 sembradas, bien sobre discos de Flexdym™ de 6mm de radio o en poliestireno tratado para cultivo celular, en placas de 96 pocillos. En la gráfica se puede apreciar un incremento en el valor de absorbancia cada ciclo de 24 horas consistente con la proliferación celular en ambos materiales, Flexdym™ y poliestireno. En ninguno de los puntos temporales se observó diferencia estadísticamente significativa, marcada con (*), de la proliferación o viabilidad celular entre ambos materiales para la línea celular Caco2. Las barras de error representan el error estándar de la media. b) Imágenes de microscopía de fluorescencia de viabilidad de las células Caco2 sembradas en discos de Flexdym™. Para evaluar la viabilidad celular de las células Caco2 sembradas en discos de Flexdym™ se empleó una tinción vital triple, compuesta del marcador nuclear Hoechst 33342 (azul) que marca el núcleo de todas las células presentes, Calceína AM (verde) como marcador de viabilidad celular y Ioduro de propidio (rojo) que marca los núcleos de las células no viables. Cada imagen de fluorescencia se encuentra dividida en dos por una línea blanca discontinua, la mitad izquierda de cada imagen muestra la tinción de viabilidad (verde + rojo) combinada con la tinción de núcleos (azul), en la mitad derecha de la imagen se muestra solo la tinción de viabilidad (verde + rojo) para favorecer la visualización de las

INYECCIÓN DEL CUERPO MICROESTRUCTURADO DE LOS MICRODISPOSITIVOS Y FABRICACIÓN DE LOS MICRODISPOSITIVOS

En los cuerpos de los microdispositivos inyectados en Flexdym™ no se observaron deformaciones o defectos graves tras la inyección en los conectores fluídicos acoplados al microdispositivo o en los microcanales. Sin embargo, si se observó de forma constante la aparición de una marca de rechupe en la cara inferior del cuerpo del microdispositivo, en la que se encuentran los microcanales, situada entre la entrada fluídica del canal central y uno de los canales laterales, siempre localizada en uno de los dos grupos de entradas fluídicas. A pesar de la marca de rechupe, el microdispositivo se pudo unir con éxito a una lámina de Flexdym™ para obtener el microdispositivo completo (figura 3.8.a), gracias a las propiedades adhesivas del Flexdym™ a otros termoplásticos.

La calidad de la inyección de los puertos fluídicos fue lo suficientemente buena como para permitir el acople con éxito de los conectores roscados, y por lo tanto un circuito fluídico externo, al microdispositivo (figura 3.8.b) respetando los protocolos de conexión libres de burbujas implementados. El conjunto microdispositivo/circuito se perfundió con una solución de fluoresceína para detectar posibles fugas, debidas a defectos menos evidentes, entre los conectores y el microdispositivo o entre el microdispositivo y la lámina de Flexdym™. Sin que se observaran signos de fuga o debilitamiento en las conexiones establecidas tras 5 minutos de perfusión libre a 0.5ml/min. Finalmente, al perfundir dos disoluciones de dos marcadores fluorescentes distintos, fluoresceína y rodamina, se pudo constatar la independencia fluídica entre los canales, al no observarse contaminación de un marcador en los otros canales. La inyección de las soluciones fluorescentes permitió también observar la geometría final de los microcanales (figura 3.8.c), definida por el cierre del canal a través del pegado de la lámina de Flexdym™. Todos los canales observados mostraron una geometría rectangular sin deformaciones, lo que sugirió un correcto pegado entre el cuerpo microestructurado de COP y la lámina de Flexdym™.

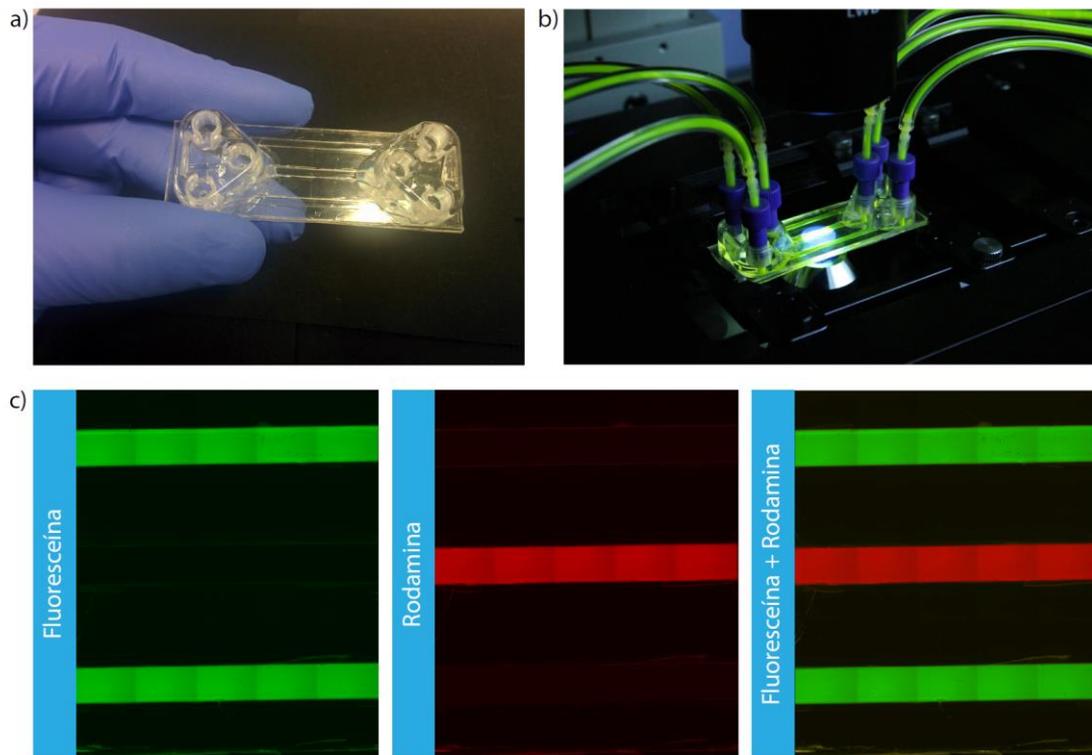


Figura 3.8. Fabricación del microdispositivo de inyección de tres canales con interfaces de conexión libres de burbujas acopladas. a) Fotografía mostrando un microdispositivo terminado. El cuerpo microestructurado del dispositivo microfluídico incorporando los microcanales y las interfaces de unión, una por entrada fluidica, fueron inyectados en COP sin que se observaran signos mayores de deformación externos. El dispositivo microfluídico se completó a través del pegado de una lámina de Flexdym que actuó a modo de suelo del microdispositivo, completando el canal microfluídico y sirviendo como sustrato de adhesión a las células a cultivar en el microdispositivo. **b) Integración fluidica microdispositivo/circuito fluidico.** El microdispositivo se colocó en un microscopio y se conectó a un circuito fluidico. Tras lo que se impuso un flujo de 0,5 ml/min durante 5 minutos de una solución de fluoresceína sódica sin que se observaran signos de fuga evidente entre los elementos, cruces de flujo entre las líneas fluidicas de cada canal de interconexión entre los canales del microdispositivo. **c) Evaluación inicial del pegado entre el Flexdym™ y el COP.** La inyección de distintos marcadores fluorescentes (fluoresceína y rodamina) en los distintos microcanales muestra la geometría definida de estos y excluye interconexión entre los mismos.

FORTALEZA DE UNIÓN ENTRE LAS INTERFASES COC/FLEXDYM™ EN EL MICRODISPOSITIVO

Para evaluar la fortaleza de unión de la lámina de Flexdym™, que actúa como suelo del microdispositivo, y el cuerpo microestructurado de COP, donde se encuentran los microcanales y las interfaces de unión que permiten la conexión fluidica a un circuito externo libre de burbujas, se realizó un barrido de presiones de 10 kPa a 100 kPa con intervalos de 10 kPa con intervalos de presurización del circuito fluidico de 1 minuto.

En todos los microdispositivos se observó un debilitamiento en la unión entre el Flexdym™ y el cuerpo de COP en el canal lateral asociado a la marca de rechupe presente entre los conectores fluidicos integrados en la pieza. Este debilitamiento se tradujo en

perdida de la estanqueidad del canal lateral más próximo a la marca de rechupe produciéndose fuga de líquido e interconexión entre el canal lateral afectado y el canal central, lo que comprometió la independencia fluídica de los microcanales que circulan a lo largo del cuerpo del microdispositivo. La presión media a la que se comenzaron a observar fallos en la integridad del pegado entre ambos materiales, Flexdym™ y COP, fue de $85,00 \pm 2,80$ kPa que corresponde con un valor medio de caudal de $164.49 \pm 4,61$ ml/min y un valor de τ en la superficie del canal de $886,42 \pm 24,83$ dina/cm² (figura 3.9).

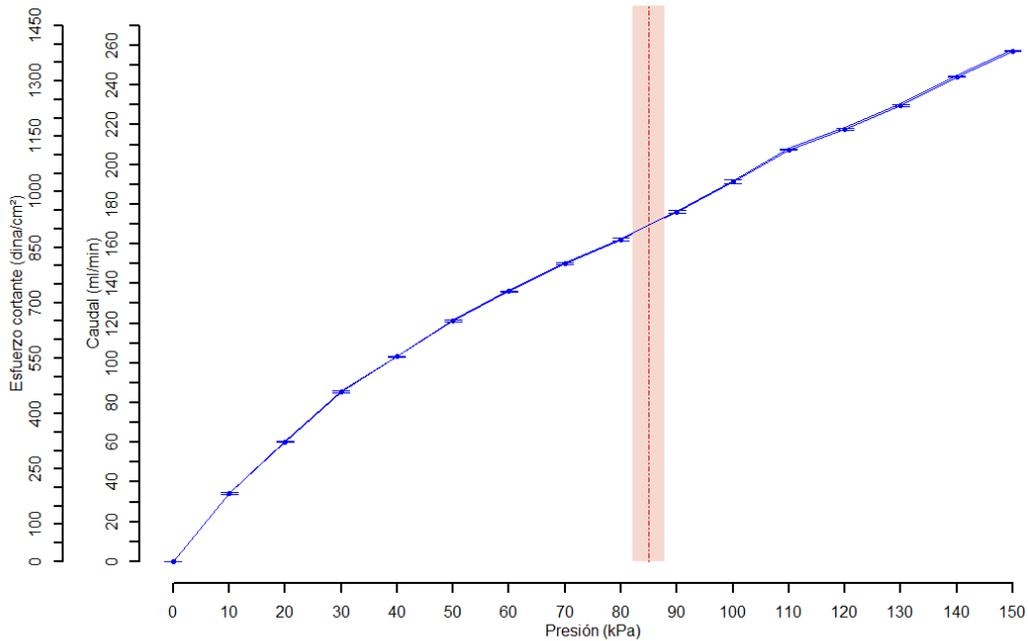


Figura 3.9. Test de presión para evaluar la fortaleza de unión de la interfase COC/Flexdym™. La grafica representa la Presión (kPa) frente a Caudal (ml/min) y Tensión cortante (dina/cm²). La línea azul muestra el caudal/tensión cortante resultante para un determinado valor de presión, en cada punto se representa el error estándar de la media con las barras de error azules. La línea discontinua roja muestra el valor medio de presión en el que se observa el debilitamiento de la unión entre los elementos del conjunto microdispositivo encapsulado. El área sombreada roja representa el error estándar de la media del valor medio de presión.

FIABILIDAD DE LA INTERFAZ DE CONEXIÓN FLUÍDICA Y MICRODISPOSITIVO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL

La integración de conectores en el propio cuerpo del microdispositivo, así como de los elementos destinados a generar una interfaz fluídica de conexión entre elementos libre de burbujas tiene como objetivo el facilitar al usuario la manipulación experimental. Para evaluar este papel se dividió el flujo de trabajo experimental en cuatro pasos: 1) siembra celular del microdispositivo, 2) cultivo en estático, 3) conexión a circuito fluídico y 4) perfusión de medio a través del microdispositivo mediada por un circuito fluídico externo.

En el paso de siembra de los dispositivos, la integración del protocolo de manipulación de líquidos en el microdispositivo libre de burbujas permitió realizar la siembra en los

microdispositivos obteniendo una distribución homogénea a lo largo del canal y sin la presencia o inserción accidental de burbujas en los microcanales. Sirviéndose del anterior protocolo, el cultivo en estático de las células Caco2 se realizó sin la inserción de burbujas, manteniendo el cultivo en crecimiento hasta la formación de una monocapa en cada uno de los canales del microdispositivo. Una vez establecida la monocapa de Caco2 en los canales del microdispositivo se procedió a la conexión del microdispositivo a un circuito fluídico externo. Esto, se realizó a través del protocolo de purga *in situ* y conexión del microdispositivo a un circuito fluídico externo mediado a través de las interfaces de conexión fluídicas integradas en el microdispositivo. En este paso, se consiguió establecer una continuidad fluídica entre el microdispositivo y el circuito fluídico externo sin la inserción accidental de aire en los canales del microdispositivo.

Sin embargo, en la última etapa la perfusión fluídica a través del microdispositivo se produjeron fallos en todos los microdispositivos en un rango de 72 horas tras el inicio de la perfusión. En la totalidad de los casos, con independencia de si se tratase de fuga de medio o conexión entre canales, se observó debilitamiento del pegado entre el cuerpo de Flexdym™ y el cuerpo de COP del microdispositivo. Estos defectos se asociaron siempre a la zona del microdispositivo donde se había detectado la presencia de una marca de rechupe tras la inyección. A pesar de estos problemas en todos los casos en el canal no afectado por la marca se pudo completar la perfusión de medio hasta las 72 horas, sin que se observasen signos de debilitamiento entre el Flexdym™ y COP o la presencia de burbujas alojadas en el canal del microdispositivo.

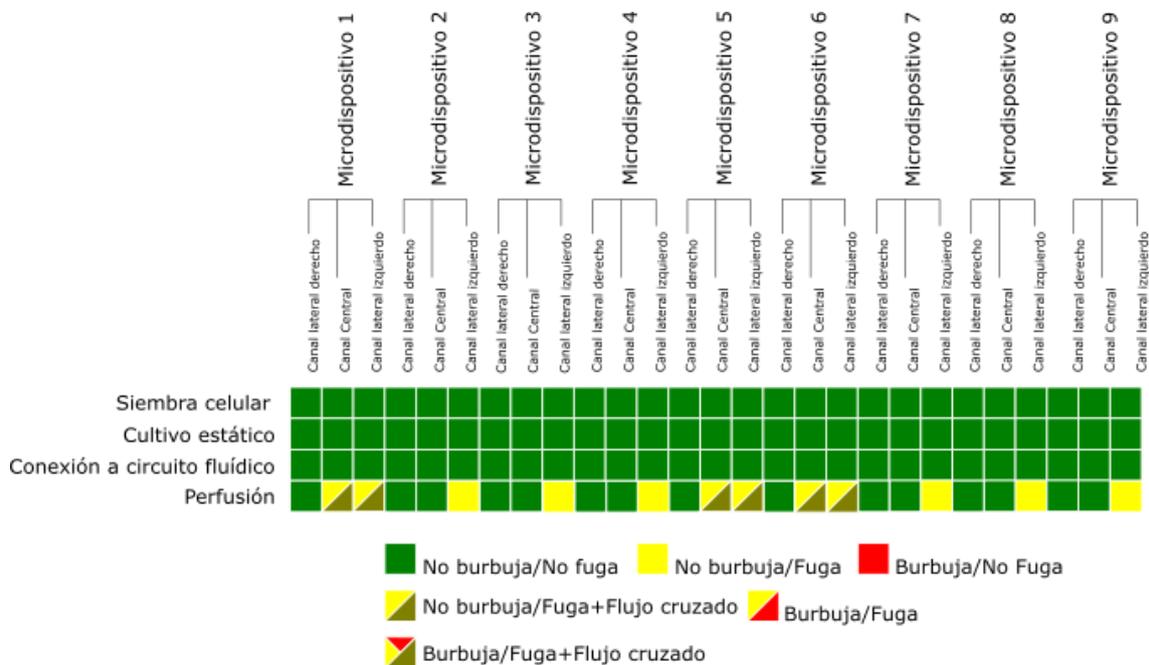


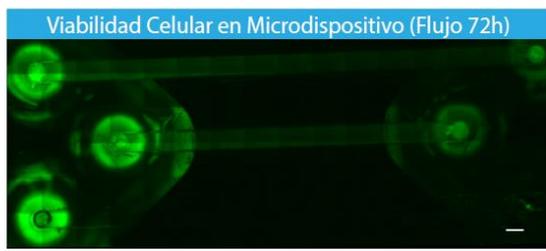
Figura 3.10. Evaluación experimental del comportamiento del microdispositivo y de las interfaces de conexión fluidicas integradas en este. La gráfica, en formato mapa de calor, representa el comportamiento de cada microcanal en cada microdispositivo usado frente a 4 etapas diferentes del proceso experimental de cultivo y estimulación mecánica por flujo de las células de carcinoma de colon Caco2 (siembra celular, cultivo estático, conexión a circuito fluidoico y perfusión) con respecto a la integridad fluidica de la línea fluidica conectada al canal del microdispositivo (fuga, flujo cruzado entre canales o no fuga) y la presencia de burbujas en este (burbuja o no burbuja).

CULTIVO Y ESTIMULACIÓN MECÁNICA POR EL PASO DE UN FLUÍDO DE LAS CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON CACO2 EN EL MICRODISPOSITIVO

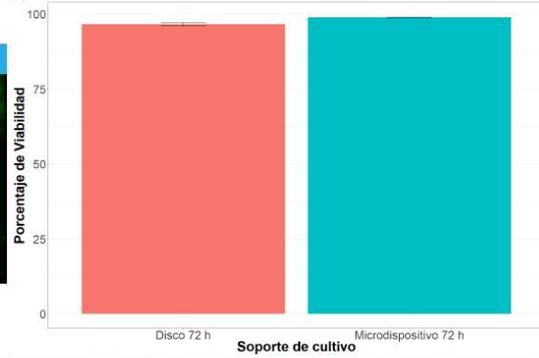
Como demostrador de la funcionalidad de los microdispositivos y de las interfases de conexión fluidica integradas como plataforma microfluidica de cultivo, se mantuvo bajo perfusión continuada durante 72 h a monocapas de células de carcinoma de colon Caco2. Las monocapas se expusieron a una tensión de corte debido al paso de un fluido de 0.1 dina/cm^2 , con el fin de simular la tensión de corte a la que es sometida el epitelio intestinal debida al paso de fluido originado por los movimientos peristálticos del intestino. Tras las 72 h de perfusión, en aquellos canales en los que el flujo se mantuvo constante (no afectados por la tara de inyección que debilita el pegado de los canales) la monocapa de células intestinales mostró una alta viabilidad con una distribución homogénea a lo largo de los canales del microdispositivo (figura 3.11.a). La viabilidad de la monocapa (figura 3.11.b y c) sometida a estimulación mecánica por el paso de un fluido en el microdispositivo ($98,82 \pm 0.10 \%$) resultó comparable a la encontrada en los discos de Flexdym™ ($96,60 \pm 0,51\%$) empleados como control en estático, sin encontrarse diferencias estadísticas significativas al comparar los valores de viabilidad entre las células crecidas en estático y las células sometidas a perfusión continuada.

Sin embargo, a la hora de estudiar la morfología de las monocapas se pudo observar un incremento en la altura de la monocapa cultivada en el microdispositivo bajo estimulación mecánica debida al paso de un fluido comparada con la monocapa crecida en estático en los discos de Flexdym™. Para evaluar esas diferencias se obtuvieron imágenes apiladas en Z de las células en ambos soportes de cultivo, microdispositivos y discos, proyectándose los puntos de máxima intensidad para obtener una imagen bidimensional del volumen de cultivo (figura 3.11.c). Los puntos de máxima intensidad para cada grupo de imágenes obtenidas, microdispositivos y discos, se representaron tridimensionalmente para obtener un mapa de la superficie volumétrico (figura 3.11.d) que permite observar las diferencias en altura de la monocapa en función de las condiciones de cultivo (estático o flujo). Al representar la topología de la monocapa como un mapa de curvas de nivel se puede observar con claridad la diferencia de alturas entre la monocapa sembrada en estático sobre los discos de Flexdym™ con respecto a la monocapa sembrada en los discos de Flexdym™. Esta diferencia (figura 3.11.e) se traduce en una relación de alturas $1,78 \pm 0,03$ veces mayor en las monocapas sometidas a estimulación mecánica frente a las monocapas cultivadas en estático en los discos, siendo estadísticamente significativa la diferencia de altura entre ambos grupos.

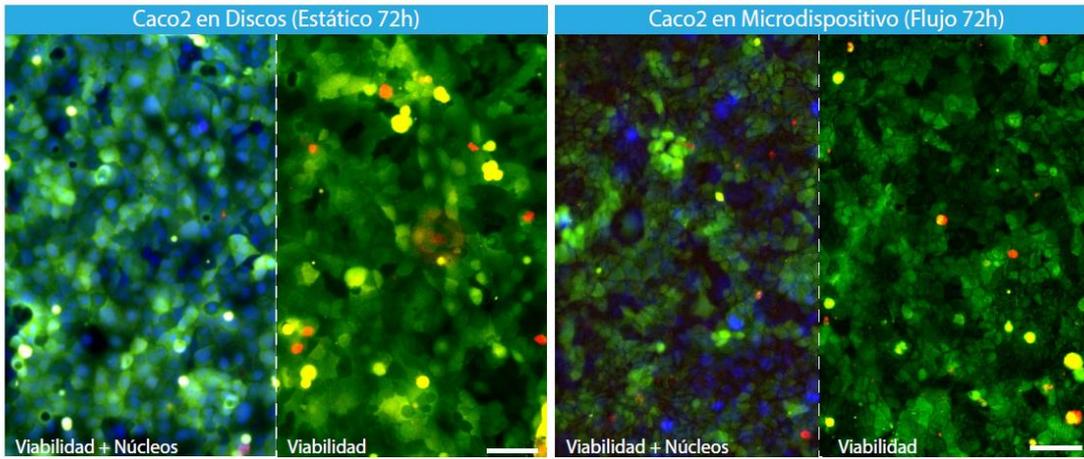
a)



b)



c)



d)

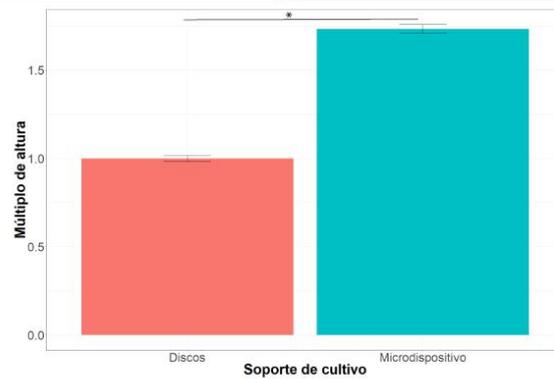
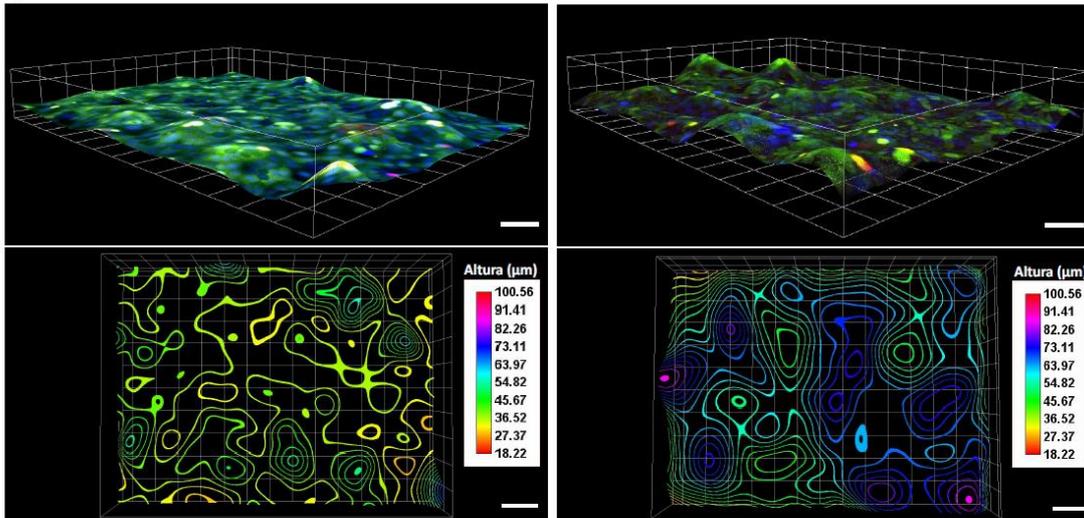


Figura 3.11. Cultivo y estimulación mecánica de las células del carcinoma de colon Caco2 en microdispositivo.

a) Viabilidad celular en microdispositivo tras 72h de perfusión continuada. Mosaico de imágenes de microscopía de fluorescencia tomadas a 100 aumentos mostrando la totalidad de los microcanales del dispositivo microfluídico perfundidos con una tinción triple de viabilidad: Calceina AM (verde), Ioduro de propidio (rojo) y Hoechst 33342 (azul). En la imagen se puede apreciar la fluorescencia de las células viables en el microdispositivo debida a la esterificación de la Calceina AM (verde), pudiendo observarse una monocapa completa a lo largo del canal. En contraste, en el tercer canal no se observa viabilidad en la mayoría del canal debido a la pérdida de estanqueidad del canal microfluídico (la barra blanca en la imagen escala a 2 mm).

b) Comparación de viabilidad de las células Caco2 sembradas en estático y bajo perfusión continuada. La gráfica de barras muestra el porcentaje de células viables bajo las distintas condiciones de cultivo. Las diferencias significativas entre grupos se denotan con (*).

c) Proyección en Z de los máximos de intensidad de células Caco2 tras 24h de perfusión continuada. La imagen de fluorescencia obtenida es el resultado de la proyección del máximo de intensidades de 10 imágenes apiladas en Z. Las imágenes tomadas a 100 aumentos muestran la viabilidad de la monocapa de Caco2 en microdispositivo tras 24 horas de perfusión continuada o en cultivo en estático. La imagen se encuentra dividida por una línea blanca discontinua, la mitad izquierda de la imagen muestra la tinción de viabilidad (rojo + verde) y núcleos (azul), en la mitad derecha de la imagen solo se muestra la viabilidad (rojo + verde) para favorecer su visualización.

d) Topografía de las monocapas de células Caco2 en función de su exposición al flujo. Los máximos de intensidad de las imágenes apiladas, tanto de monocapas sometidas a perfusión como crecidas en estático, permiten reconstruir la tridimensionalidad de la superficie y traducirla a un mapa de curvas de nivel mostrando la altura relativa desde el primer máximo de señal que coincide con una estructura celular definida (núcleos (la línea blanca en la base de las imágenes corresponde a 50µm)).

e) Cuantificación de la altura de las monocapas. La altura de las monocapas se calculó a partir de los puntos obtenidos de los mapas de nivel de las distintas monocapas crecidas a flujo y estático y representado como el cambio en veces de altura con respecto a los controles en estático. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se denotan con (*). Las barras de error en las gráficas representan el error estándar de la media.

DISCUSIÓN

Como ya se discutió en el capítulo anterior, el uso de termoplásticos, favorecido por la industria y empleados como soporte estándar de cultivo celular, para la fabricación de dispositivos impone una serie de limitaciones técnicas. No solo en cuanto a la fabricación de los microdispositivos en sí, que requiere de un paso de sellado del microdispositivo, sino también a la hora de integrar estos dispositivos en montajes experimentales que requieran del uso de elementos auxiliares externos: circuitos fluídicos externos, sistemas de medida, etc. El uso de elastómeros termoplásticos blandos, como el Flexdym™, con sus capacidades adhesivas conformacionales permitiría el cierre del microdispositivo, como ya se ha visto en el capítulo anterior, reduciendo la complejidad asociada al paso de cierre del microdispositivo de una manera directa, simple y evitando el uso de disolventes, y su potencial efecto negativo sobre el material o el futuro cultivo celular, o de presión y temperatura, que dificulta técnicamente el proceso de sellado del microdispositivo y puede afectar negativamente las geometrías internas del microdispositivo. En el capítulo anterior, el uso de Flexdym™ como base para la fabricación del cuerpo microestructurado del dispositivo microfluídico de tres canales permitió establecer cultivos, sobre el suelo de COC, sin afectar aparentemente a la viabilidad llegando a observarse adhesión celular, por parte de las células renales LLC-PK1, en las paredes laterales del cuerpo microestructurado de Flexdym™. Esto sugirió la posibilidad de usar el Flexdym™ como sustrato de cultivo, lo que permitiría cerrar los dispositivos microfluídicos de manera sencilla, como se ha señalado anteriormente, simplemente poniendo en contacto ambas superficies, el Flexdym™ y el cuerpo

inyectado en termoplástico del dispositivo. Para evaluar la viabilidad del uso de Flexdym™ como soporte de cultivo, se decidió emplear la línea celular humana derivada de carcinoma de colon Caco2, al mantener capacidad de expresar características de diferenciación enterocítica incluida la formación de borde en cepillo en la cara apical (Reisher et al. 1993)(Hidalgo et al. 2011) y responder de manera positiva a la estimulación mecánica debida al paso de un fluido (Chi et al. 2015). Al cultivar las células Caco2 sobre discos de Flexdym™, activados por exposición a plasma de oxígeno para incrementar la hidrofilia de la superficie, no se observaron diferencias significativas en cuanto a crecimiento o viabilidad (Viabilidad_{24h}, Flexdym™=0,080 ± 0.001 a.u, Viabilidad_{48h}, Flexdym™= 0,133 ± 0,001 a.u, Viabilidad_{72h}, Flexdym™=0,215 ± 0,001 a.u) al compararlas con células Caco2 sembradas en poliestireno (Viabilidad_{24h}, Poliestireno=0,098 ± 0.001 a.u, Viabilidad_{48h}, Poliestireno= 0,147 ± 0,003 a.u, Viabilidad_{72h}, Poliestireno™=0,241 ± 0,002 a.u) como control a lo largo de 72 horas de cultivo. Así como tampoco se observaron alteraciones morfológicas en las células sembradas en los discos de Flexdym™, lo que sugiere la potencial viabilidad del uso del Flexdym™ como sustrato para el cultivo celular de las células Caco2.

El potencial uso del Flexdym™ como sustrato de cultivo celular permitiría poner el peso en la fabricación de las microestructuras del dispositivo microfluídico, así como de los elementos que facilitasen la conexión a otros elementos auxiliares externos, circuitos fluídicos, transductores de señal para sensores integrados monolíticamente en el microdispositivo, etc., en la pieza de termoplástico obtenida por inyección. Como se vio en el capítulo anterior el desarrollo de un sistema de conexión, que asistiera al usuario en las partes experimentales que involucran la manipulación y/o conexión fluídica, libre de burbujas aumentaba las posibilidades de llevar a cabo con éxito un desarrollo experimental que requiriese de los pasos de manipulación y conexión de elementos fluídicos anteriormente mencionados. Sin embargo, por otra parte, la necesidad de realizar múltiples conexiones entre los elementos constituyentes del encapsulado, inyectados en poliestireno, supuso la mayor debilidad del sistema, no solo por la necesidad de establecer esas conexiones, sino también, por el hecho de someter a tensiones internas durante el cierre a elementos plásticos con capacidad de deformarse. Una posible solución a este respecto sería la integración de los elementos de conexión y las estructuras microestructuras del microdispositivo en una única pieza, minimizando el número de conexiones necesarias para conectar el microdispositivo a un circuito fluídico externo. Para ello se desarrolló una interfaz de conexión fluídica, que integró las estructuras necesarias para la implementar las técnicas de manipulación de líquidos y conexión a elementos fluídicos desarrolladas en el capítulo anterior con un puerto fluídico para la conexión de un conector roscado. Esta interfaz se diseñó de forma modular de forma que pudiera incorporarse a distintos modelos de dispositivos microfluídicos independientemente de su geometría interna, como los microdispositivos de un canal, gradiente y transmembrana descritos anteriormente en este capítulo. Estos diseños se tomaron como base para el desarrollo de un modelo de inyección que incorporaba tres canales fluídicos independientes en el microdispositivo.

Los cuerpos microestructurados de los microdispositivos de inyección no mostraron deformaciones en la zona de la interfaz de conexión fluidica, pero si en la base del microdispositivo donde, de forma constante, se observó una marca de rechupe que afectaba las entradas fluidicas de un canal lateral y el canal central de uno de los juegos de entradas fluidicas del microdispositivo. La presencia de esta marca de rechupe puede deberse a varios factores, como son lo intrincado del diseño del molde, falta de material durante la inyección o una curva de enfriamiento demasiado lenta que genera gradientes de temperatura en el material que causa la retracción del mismo. A pesar de la presencia de esta tara, se pudo realizar el pegado con éxito entre el cuerpo del microdispositivo inyectado en COP y la lámina de Flexdym™, simplemente poniendo en contacto ambas superficies durante 24 h a 65°C, a través de las propiedades autoadhesivas de este último. La calidad del pegado permitió la perfusión de disoluciones fluorescentes a través de los canales del microdispositivo, sin que se observaran deformaciones o perdida de la geometría de los canales del microdispositivo. Además, tampoco se observaron signos de fuga o debilitamiento de la conexión entre el conector roscado y el microdispositivo a nivel de los puertos fluidicos integrados en la interfaz de conexión fluidica.

Para comprobar la fortaleza de unión entre ambas superficies, Flexdym™ y COP, se sometió a los microdispositivos a un test de resistencia al presurizar el circuito fluidico, en donde la geometría de los canales del microdispositivo es la más restrictiva, en incrementos de 10 KPa en un rango desde 0 a 150 KPa bloqueando las salidas fluidicas del microdispositivo. Al enfrentar a los microdispositivos a esta prueba de esfuerzo, se observó fuga o debilitamiento en la unión entre la lámina de Flexdym™ y COP en la región donde se observó la tara de inyección. El resultado de este debilitamiento fue la fuga de medio al exterior o la unión fluidica entre los dos canales, lateral y central, cuyas entradas fluidicas estaban más próximas a la marca de rechupe en las piezas de COP. A pesar de esto, el valor medio de presión al que se observó el debilitamiento de la unión fue de $85,00 \pm 2,80$ kPa que se corresponde con un valor medio de caudal de $164.49 \pm 4,61$ ml/min y un valor de la tensión cortante en la superficie del canal debido al paso de un fluido de $886,42 \pm 24,83$ dina/cm². Siendo estos valores muy superiores a los valores considerados fisiológicos para el estudio la estimulación mecánica debida al paso de un fluido sobre células del epitelio intestinal [REF].

La integración de los elementos destinados a implementar los protocolos de manipulación/conexión fluidica en el microdispositivo tienen como objetivo maximizar las probabilidades de llevar a cabo con éxito un experimental de cultivo celular en los microdispositivos que involucre la conexión fluidica a un circuito fluidico externo. Por ello, se distinguió en cuatro fases experimentales diferentes los pasos experimentales necesarios para observar los efectos de la estimulación mecánica de una monocapa de células Caco debido al paso de un fluido: 1) siembra celular del microdispositivo, que requiere de una siembra homogénea en los canales del microdispositivo, 2) cultivo en estático, que requiere de pasos de cambio de medio para mantener el cultivo en los canales del microdispositivo hasta la formación de la monocapa, 3) conexión a circuito fluidico, para permitir la perfusión del fluido a través del canal del microdispositivo, y 4)

perfusión de medio a través del microdispositivo mediada por un circuito fluídico externo. En las tres primeras etapas, la integración de la interfaz de conexión fluídica a las entradas fluídicas del microdispositivo permitió realizar los pasos requeridos sin la introducción accidental de aire en las estructuras internas del dispositivo microfluídico. Ofreciendo unos resultados similares a los obtenidos por el encapsulado descrito en el capítulo anterior, sin la necesidad de piezas separadas que incorporen funcionalidades propias para cada protocolo de manipulación/conexión fluídica desarrollados y reduciendo al mínimo el número de conexiones requeridas para establecer una continuidad fluídica entre el microdispositivo y un circuito fluídico auxiliar externo. Además, la introducción de las interfaces de conexión fluídicas que aúnan en una sola estructura los elementos necesarios para integrar los protocolos de manipulación/conexión fluídica libre de burbujas y los puertos de conexión para los conectores fluídicos del circuito auxiliar permiten reducir al mínimo el volumen muerto requerido para estas operaciones. Otra ventaja de las interfaces con respecto al encapsulado es el carácter modular de las mismas, que le otorgan independencia fluídica a cada canal del microdispositivo con respecto a los demás. Finalmente, la implementación de los conectores roscados permite el cierre de manera controlada entre el circuito y el microdispositivo, siendo además de manera reversible, al contrario que el cierre del encapsulado que requería de ejercer presión para romper la membrana que separaba físicamente las configuraciones 2 y 3, y una vez realizada la conexión, esta era irreversible.

Al evaluar la última etapa experimental, la imposición de flujo en el microdispositivo mediada por la acción de un circuito fluídico auxiliar externo, se observó de forma constante el fallo del pegado entre la lámina de Flexdym™ y el cuerpo de COP en los canales adyacentes a la marca de rechupe presente en el cuerpo de los microdispositivos. A pesar de que el valor de caudal, y por lo tanto de presión, necesario para estimular la monocapa de células Caco2 estaba muy por debajo del valor límite obtenido durante los test de esfuerzo, $20,9 \mu\text{l}/\text{min}$ frente a $164.49 \pm 4,61 \text{ ml}/\text{min}$, el resultado fue el mismo, la fuga de líquido al exterior o la interconexión fluídica de los dos canales afectados. A pesar de que la superficie de contacto entre ambas superficies, Flexdym™ y COP es muy superior al área de contacto de las interfases COC/Flexdym™/Poliestireno del conjunto microdispositivo/encapsulado y que las pruebas de estrés den valores de presión superiores para el microdispositivo ($85,00 \pm 2,80 \text{ kPa}$) que para el conjunto microdispositivo/encapsulado ($52,50 \pm 0,83 \text{ kPa}$). Debido a que el fallo se localiza únicamente en la zona donde se observa la marca de rechupe, es fácil identificar esta como fuente del problema, aunque posiblemente existan distintas causas que pueden explicar el deterioro de la unión, la causa final del debilitamiento de unión entre el Flexdym™ y el COP en la zona de la tara de inyección posiblemente sea una combinación de los dos efectos siguientes:

- 1) Al tratarse de una imperfección fácilmente detectable, macroscópica, las cualidades reológicas y viscoelásticas del Flexdym™ no son suficientes para permitir un contacto íntimo entre la lámina Flexdym™ y el COP del cuerpo del microdispositivo. Esta unión, se va deteriorando con el tiempo posiblemente facilitada por la invasión de la zona por

capilaridad del medio de cultivo presente en los canales, que finalmente acaba por desplazar la unión entre ambos elementos permitiendo así la fuga de medio al exterior o la conexión entre los canales afectados.

2) Para asegurar la hermeticidad de la conexión entre el circuito fluídico y el microdispositivo, el conector roscado ejerce una presión directa sobre la entrada fluídica de la interfaz a la que se encuentra roscado. Esto genera tensiones en las paredes del conector en dirección opuesta a la ejercida por el conector roscado sobre la entrada fluídica, impactando de mayor manera en la zona de la marca de rechupe debido a la menor presencia de material y retracción del mismo en la zona. Esto, puede generar un efecto negativo sobre la ya debilitada unión del Flexdym™ al cuerpo de COP en la zona de la tara de inyección.

A pesar de los problemas acaecidos en la fase de perfusión, en aquellos canales en los que fue posible establecer una perfusión continuada de medio durante 72h se pudo observar el mantenimiento de la monocapa de células Caco2 a lo largo del microcanal del dispositivo. Para comparar el posible efecto del paso de fluido sobre una monocapa de Caco2, se compararon las monocapas sometidas a perfusión, en los microdispositivos, con monocapas crecidas en estático sobre discos de Flexdym™. A nivel de viabilidad de los dos cultivos no se observó diferencias significativas entre las células crecidas en estático durante 72h, $98,82 \pm 0.10 \%$, y las sometidas a flujo en los microdispositivos por el mismo espacio de tiempo, $96,60 \pm 0,51\%$. Bajo la estimulación mecánica debida al paso de medio por los microcanales del dispositivo microfluídico, se pudo observar el incremento de la altura de la monocapa de células Caco2 al compararlas con las células control en estático. El incremento de altura de la monocapa a flujo fue $1,78 \pm 0.03$ veces la altura relativa del cultivo en estático, siendo esta diferencia entre ambos grupos estadísticamente significativa. El incremento de altura de las monocapas de Caco2 por exposición a tensión cortante debido al paso de un fluido ha sido observado tanto asociado a estimulación mecánica transversal en la dirección del flujo (Kim et al. 2013) (Kim et al. 2012), como aislado (S. W. Kim et al. 2017) y se identifica con la diferenciación de este tipo celular hacia un fenotipo enterocítico y su polarización celular. Estos resultados validan, el uso de Flexdym™ como sustrato de cultivo para el estudio del impacto de la estimulación mecánica debida a la tensión cortante asociada al paso de un fluido para células Caco2. Aprovechando las ventajas que el material aporta durante la fase fabricación de los microdispositivos, eliminando la necesidad de pasos complejos de pegado para el cierre del microdispositivo.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Se diseñó con éxito una interfaz de conexión fluídica modular e independiente fluídicamente, compuesta de un puerto de conexión fluídico destinado a alojar un conector fluídico comercial al que se asociaron los elementos necesarios para la integración de los protocolos de conexión y manipulación fluídica desarrollados en el capítulo anterior.

La interfaz diseñada se integró con éxito en distintos modelos de dispositivo microfluídicos, preservando la funcionalidad e independencia fluidica con independencia de la geometría interna de los modelos. Siendo finalmente integrada en un prototipo de dispositivo microfluídico de tres canales independientes fabricado por inyección.

El cierre del microdispositivo de inyección a través de una lámina de Flexdym™ permitió definir de manera independiente la geometría de los tres canales del dispositivo de microfluídos. Soportando la unión entre la lámina de Flexdym y el cuerpo del microdispositivo fabricado por inyección presiones fluidicas de 85 KPa.

La funcionalidad del microdispositivo se vio limitada por la presencia de taras en el cuerpo del microdispositivo fabricado por inyección. Aun así, en los canales microfluídicos no afectados por la tara la interfaz de conexión fluidica integrada en el microdispositivo permitió realizar con éxito todos los pasos experimentales necesarios para el cultivo de células de carcinoma de colon Caco2 en el microdispositivo y la estimulación mecánica de las mismas por el paso de un fluido.

Las células Caco2 fueron cultivadas usando el Flexdym™ como sustrato de cultivo con éxito. En condiciones de cultivo en estático, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a viabilidad y proliferación celular entre las células cultivadas en Flexdym™ y las cultivadas en poliestireno, material considerado estándar para el cultivo celular.

La estimulación mecánica de las células en microdispositivos fabricados con suelo de Flexdym™ permitió observar el crecimiento en altura de la monocapa de células Caco2, siendo 1,78 veces superior al cultivo en Flexdym™ en estático. Siendo este comportamiento similar al reportado en bibliografía para este tipo celular al ser estimulado mecánicamente por el paso de un fluido en otros sustratos de cultivo.

Las anteriores conclusiones apoyan la viabilidad del uso del Flexdym™ como material para la construcción de microdispositivos destinados al cultivo celular a través del uso de una lámina de Flexdym™ que actúe tanto como suelo del microdispositivo, permitiendo el sellado rápido y sencillo de este, como de sustrato de cultivo celular.

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UN BIORREACTOR MULTIESCALA PARA LA PRESERVACIÓN EX VIVO DE MUESTRAS DERIVADAS DE BIOPSIAS DE CARCINOMA COLORECTAL

INTRODUCCIÓN

Las aplicaciones anteriores mostradas en este trabajo mostraban la integración de elementos diseñados en la macroescala como sistemas de traducción de escalas para facilitar a un posible usuario la manipulación de sistemas microfluídicos. Esta aplicación entre escalas es una vía de doble sentido en el que sistemas microfluídicos pueden integrarse en aplicaciones desarrolladas principalmente en la macroescala para reducir el volumen muerto, incrementar el control sobre las condiciones y/o perfiles de flujo y finalmente facilitar el escalado de los sistemas en la macroescala a sistemas de alto rendimiento. Un campo que podría beneficiarse de la aplicación de esta comunión entre escalas son los sistemas diseñados para mantener muestras biológicas complejas *ex vivo*, como por ejemplo en el caso de tumores. La implementación de sistemas microfluídicos que permitieran el soporte *ex vivo* de muestras obtenidas de biopsias de pacientes podría ser un punto de partida para el desarrollo de sistemas de medicina personalizada. En los que a partir de la interrogación directa de una muestra de tumor obtenida de un paciente se puede confeccionar una aproximación terapéutica óptima para su tratamiento (Rubin 2011).

Una de las principales limitaciones a la hora de prever el resultado de una determinada aproximación terapéutica en cáncer es la heterogeneidad tumoral, tanto la heterogeneidad entre pacientes como la intra paciente. Una de las principales causas de esta heterogeneidad es el propio microambiente tumoral (figura 4.1) que puede definirse como el conjunto del estroma, células y factores que interaccionan con el tumor ofreciéndole soporte durante el crecimiento (desarrollo de nueva vasculatura que soporte el crecimiento del tumor) (De Palma, et al. 2017), facilitando la invasión y desfocalización del tumor (metástasis) (Mlecnik et al. 2016) y modulando la respuesta entre el sistema inmunitario frente al tumor, permitiendo la evasión del tumor frente a este (Mohme, et al. 2017).

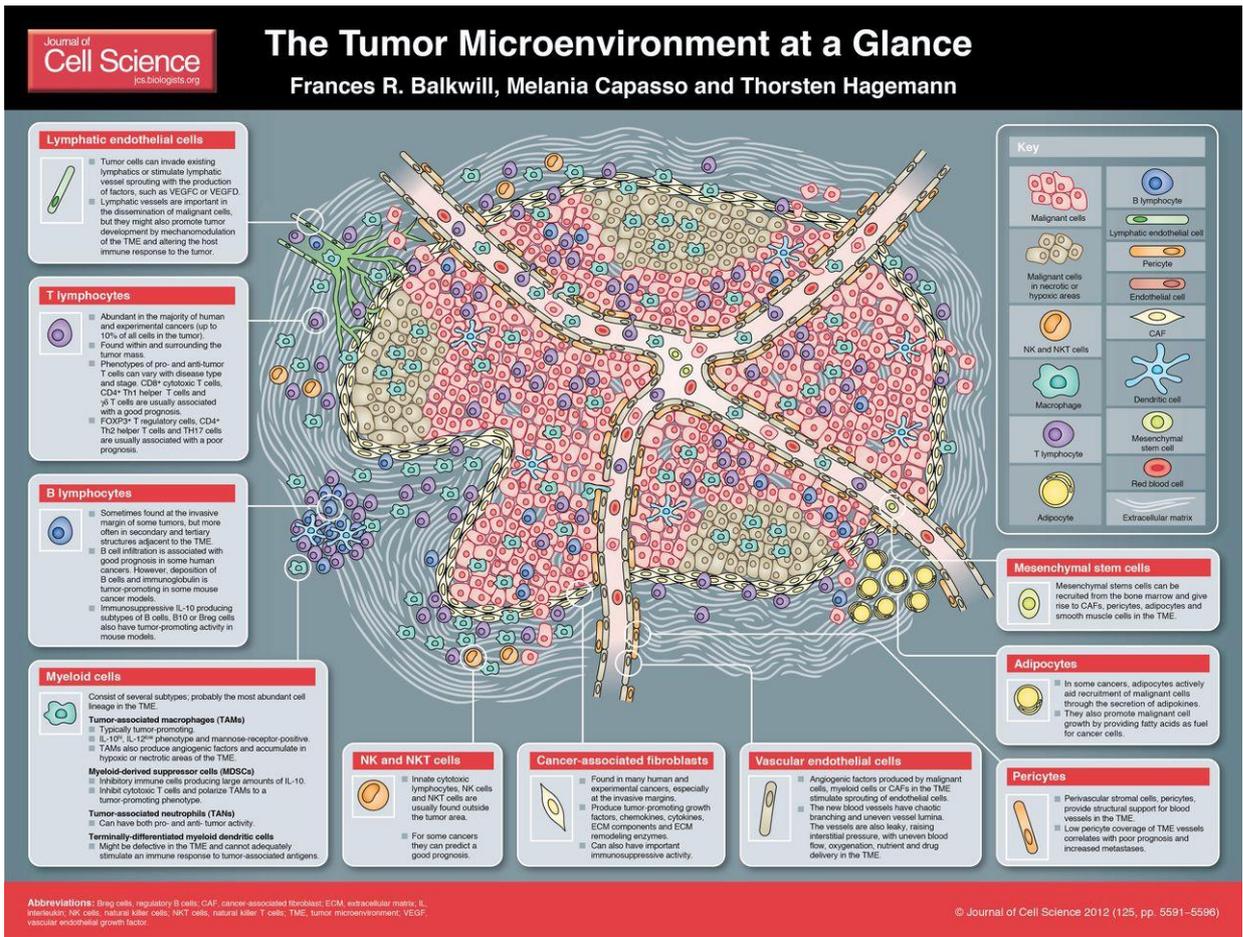


Figura 4.1. El microambiente tumoral. Los tumores son estructuras complejas cuyo crecimiento, capacidad invasiva y de ocultación frente al sistema inmune vienen determinados no solo por el tipo de tumor sino por las relaciones e interacciones que se establecen entre las células tumorales y las células no tumorales y estroma que rodean a las células tumorales que conforman el microambiente tumoral. Reproducido de Balkwill et al. 2012

Los sistemas de cultivo celular tradicionales desarrollados o empleados para la confección de un tratamiento y predicción de su respuesta se pueden agrupar en función de su grado creciente de complejidad y heterogeneidad celular en (Meijer et al. 2017): 1) cultivo de células bidimensionales (2D), tanto de líneas celulares como células primarias, 2) modelos tridimensionales (3D) celulares, como esferoides y organoides, 3) xenoinjertos derivados de pacientes y 4) cultivo de cortes organotípicos del propio tumor. Cada uno de estos modelos posee sus ventajas y desventajas, por ejemplo, los cultivos (2D) de células tumorales son asequibles, simples técnicamente y su uso está ampliamente extendido. Sin embargo, estos modelos carecen por completo de las complejas interacciones aportadas por el microentorno tumoral y la inclusión de los más básicos de estos factores implica una elevada complejidad experimental para su implementación. Por contrario, los sistemas 3D de cultivo pueden reproducir con cierto éxito las interacciones celulares que de forma natural suceden en el ambiente fisiológico 3D, observándose la autoorganización de las células presentes en estructuras similares

a las que se encuentran en los órganos de los que derivan las células tumorales (Sato et al. 2011)(Boj et al. 2015) y capturar o recrear parte de la heterogeneidad del tumor carecen de la complejidad del microambiente tumoral y son difícilmente integrables en sistemas destinados a la generación de una respuesta prospectiva frente a un tratamiento que requiere la medicina personalizada. En el caso de los xenoinjertos derivados de paciente, estos conservan parte de la heterogeneidad tumoral del tumor a partir del cual fueron desarrollados de una forma mucho más precisa que cualquiera de los métodos de cultivo anteriormente mencionados (Bertotti et al. 2011)(Derose et al. 2011). Sin embargo, esta técnica requiere del uso de animales inmunocomprometidos, principalmente ratones, para el desarrollo y crecimiento del tumor. Lo que implica que a pesar de que se conserva la heterogeneidad del tumor el estroma tumoral es reemplazado por el estroma del hospedador, lo que limita el peso de las interacciones tumor estroma en el desarrollo de un tratamiento. Además, en la mayoría de los casos el desarrollo del tumor en el huésped requiere meses de crecimiento lo que limita enormemente el uso de esta técnica en aplicaciones de medicina personalizada en el caso de tumores agresivos de rápido desarrollo. Finalmente, el mantenimiento *ex vivo* de cortes del tumor obtenidos a por biopsia representan de manera más fiel la heterogeneidad propia del tumor del paciente. Sin embargo, el mantenimiento de esta heterogeneidad a lo largo del tiempo viene limitada por la necesidad de preservar la viabilidad de la muestra. Para solventar este problema, se han desarrollado reactores de cultivo (biorreactores), basados principalmente en reactores rotatorios, para preservar la viabilidad de la muestra. Siendo estos sistemas difícilmente escalables a sistemas de alto rendimiento que permitieran el escalado del tratamiento y su implementación en un sistema de medicina personalizada (Carranza-Torres et al. 2015)(Naipal et al. 2016). Con la desventaja añadida de que no es posible realizar observación óptica directa de la muestra durante el cultivo, lo que limita la viabilidad experimental para observar interacciones entre el tumor y células del sistema inmunitario, terapia celular, o entre el tumor y un fármaco o coctel de fármacos.

Como se ha señalado con anterioridad una posible alternativa para el mantenimiento de muestras derivadas de biopsias obtenidas de pacientes evitando los inconvenientes de los sistemas clásicos sería el desarrollo de sistemas microfluídicos totales o parciales que permitieran reducir el volumen y la complejidad de los sistemas empleados de manera tradicional. Esta técnica se ha empleado con éxito en el mantenimiento de biopsias de tejidos tales como cortes de tejido cerebral de ratón (Bakmand et al. 2015), o fragmentos de adenocarcinoma de pulmón derivados de xenoinjertos en ratón (Holton et al. 2017), permitiendo el acceso óptico a la muestra durante todo el proceso. Sin embargo, debido a las características propias de fabricación de sistemas microfluídicos el recuperar la muestra tras el mantenimiento en este es complicado. Limitando así la capacidad de la muestra de ser procesada histológicamente, una técnica familiar para el usuario clínico y que aporta un elevado grado de información acerca del tumor y el microambiente tumoral.

Para tratar de aportar una solución a este problema se decidió desarrollar un sistema multiescalar, que incorporase las ventajas propias de los sistemas microfluídicos con la

capacidad de recuperación de la muestra y post-procesamiento de los modelos clásicos, para la preservación de biopsias tumorales de carcinoma colorrectal. Eligiéndose este tipo de tumor al ser el tercero más común, al representar el 9,7% de los casos de cáncer registrados mundialmente incluyendo ambos sexos y todas las edades (Stewart and Wild 2014).

OBJETIVOS

Desarrollar y fabricar un modelo de biorreactor multiescalar, combinando elementos en la microescala y macroescala, como plataforma de cultivo en perfusión que permita el mantenimiento ex vivo de biopsias derivadas de tumores colorrectales.

Implementar en el biorreactor un sistema reversible de cierre que permita la inserción de la muestra para su mantenimiento y posterior recuperación para ser procesada histológicamente. Permitiendo además la inspección óptica de la muestra durante el proceso de perfusión.

Evaluar la funcionalidad del biorreactor durante las distintas fases experimentales, permitiendo el mantenimiento ex vivo de muestras 3D, su observación óptica y posterior recuperación post-mantenimiento y procesamiento histológico de las muestras.

Evaluar la capacidad del sistema para preservar la heterogeneidad muestras derivadas de tumor atendiendo a los criterios de conservación de la densidad celular y mantenimiento de distintas estirpes celulares propias del microambiente tumoral.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL BIORREACTOR MICROFLUÍDICO Y FABRICACIÓN

Los principales objetivos con los que el biorreactor se diseñó fueron los de disponer de una plataforma fluidica que permitiera la inserción de muestras biológicas complejas en su interior (biopsias de tumor) para su mantenimiento por perfusión continuada de medio de cultivo. Permitiendo su posterior extracción del biorreactor de forma que pudieran ser procesadas siguiendo una metodología que fuese familiar para el usuario clínico. Además, el sistema debería de permitir ser acoplado a un microscopio para permitir seguir la interacción de otros tipos celulares, o la difusión de moléculas fluorescentes para el estudio de difusión de fármacos, con la biopsia tumoral. Manteniendo además un volumen muerto en el biorreactor mínimo, al asociar canales microfluídicos para la perfusión fluidica de una cámara de cultivo que permitiera alojar muestras de tamaño macroscópico, lo que permitiese su mantenimiento ex vivo sin el alto consumo de medio asociado a otros sistemas de mantenimiento macroscópicos de muestras biológicas complejas.

Para permitir el acople del biorreactor a un sistema de microscopía y permitir la visualización a través de este, se decidió dimensionar la base del biorreactor al tamaño de un portaobjetos de microscopía (75 mm de longitud X 25 mm de anchura) lo que

permitiría el acople de este a cualquier sistema de microscopía. Para facilitar la visualización a través del mismo se decidió que el sistema debería completamente transparente en el espectro visible, infrarrojo cercano y ultravioleta cercano para maximizar la compatibilidad con los principales marcadores fluorescentes en el mercado. En consecuencia, se eligieron como materiales para el diseño: 1) polimetilmetacrilato (PMMA), al ser ampliamente utilizado en la fabricación de prototipos a nivel de laboratorio, para la fabricación de las piezas rígidas y, 2) polidimetilsiloxano (PDMS) para la fabricación de las piezas con canales microfluídicos y destinadas a garantizar el sellado hermético del biorreactor tras el cierre del mismo.

Para permitir la inserción en el sistema fluídico de la biopsia tumoral y su posterior retirada tras el mantenimiento *ex vivo* en el biorreactor sin alterar o dañar la muestra en el proceso, el sistema de cierre debería de ser reversible y asegurar la hermeticidad fluídica en el biorreactor. Tanto a nivel de las muestras con el exterior, como entre las distintas muestras mantenidas por distintas líneas de flujo independientes entre sí contenidas en el biorreactor. Por ello, se decidió emplear un cierre vertical del biorreactor permitiendo el acceso directo a la cámara de cultivo tanto para la colocación inicial de la muestra como para su retirada tras el mantenimiento *ex vivo* de la biopsia tumoral. Para asegurar la hermeticidad y reversibilidad del cierre se decidió incluir elementos elásticos, láminas de PDMS, que permitieran actuar juntas de sellado entre las distintas partes del biorreactor. Como sistema de cierre se decidió por el cierre por roscado de tornillos que distribuidos a lo largo del perímetro del biorreactor permite distribuir la presión de cierre a lo largo del biorreactor. Para evitar el desgaste de las piezas de PMMA por el roscado de los tornillos de acero inoxidable, se decidió que el cierre se realizara haciendo pasante el paso del tornillo a través del biorreactor y roscando en tuercas de acero inoxidable que apretarían el conjunto de piezas del biorreactor.

El biorreactor se diseñó como un conjunto de tres láminas rígidas de PMMA y dos láminas flexibles de PDMS (figura 4.2.a)). La lámina superior de PMMA de 5 mm de espesor contenía los alojamientos para los tornillos de cierre en el perímetro de la lámina, permitiendo realizar el cierre anteriormente comentado, junto a las entradas y salidas fluídicas para cada una de las cámaras de cultivo del biorreactor. Para permitir la conexión de las cámaras a una línea fluídica independiente las entradas se realizaron con un diámetro de 2 mm para permitir la conexión de conectores tipo barb/barb (EW-40612-43, Cole-Parmer). La lámina intermedia de PMMA de 2 mm de espesor contenía los alojamientos para permitir el paso de los tornillos de cierre, un agujero pasante por línea de flujo que permite la comunicación del canal fluídico de salida de cada cámara con su salida fluídica y finalmente, las cuatro cámaras de cultivo de 6 mm de diámetro, la misma superficie aproximada que un pocillo de una placa multipocillo de 6 mm, que permitiera tanto la manipulación manual de la muestra con ayuda de unas pinzas estériles, como el mantenimiento *ex vivo* de hasta 4 muestras de forma independiente y simultánea. La última de las láminas de PMMA, la lámina suelo, se eligió con un espesor de 1 mm como compromiso entre minimizar la distancia focal desde la muestra al objetivo de microscopía durante la visualización de las cámaras de cultivo del biorreactor y ofrecer un espesor suficiente que permitiera soportar el cierre del biorreactor por presión directa sobre la lámina por el roscado de los tornillos que pasan a través de la lámina.

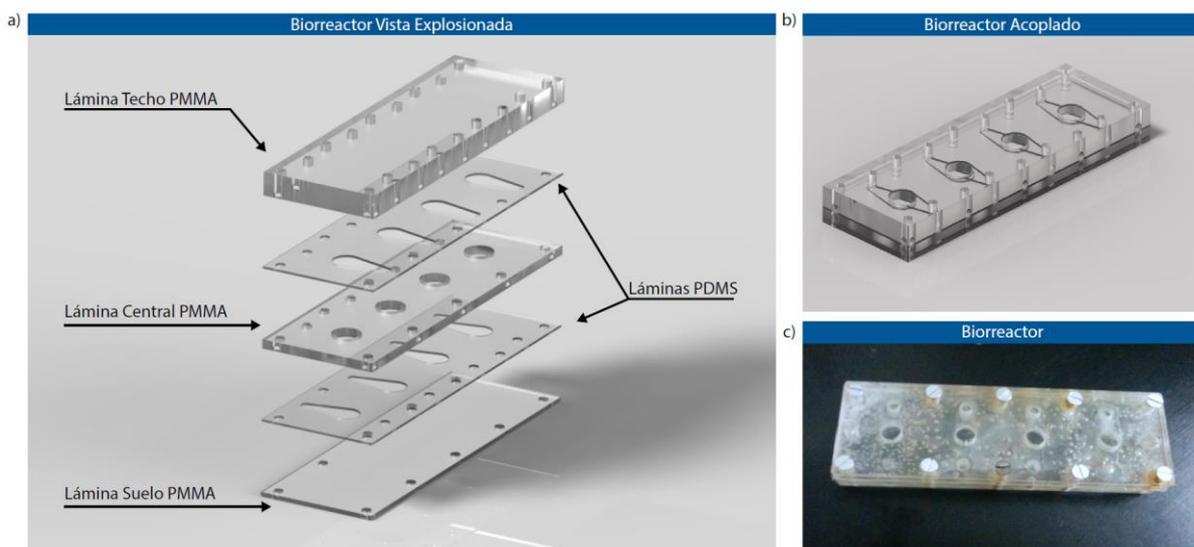


Figura 4.2. Diseño del biorreactor para la preservación de biopsias tumorales ex vivo. A) Renderizado del biorreactor mostrando los distintos elementos que lo componen y su posición relativa en el montaje. El biorreactor está compuesto de una serie de láminas transparentes, bien fabricadas en PMMA o PDMS, cuya función es la de alojar biopsias de tumor y permitir establecer una continuidad fluídica al ser conectado a un circuito fluídico que permita el mantenimiento ex vivo de las muestras por perfusión y su posterior recuperación. b) Renderizado del biorreactor con todas las láminas constituyentes acopladas. Las dimensiones del biorreactor se ajustaron a las de un portaobjetos de microscopia para permitir la observación in vivo de las biopsias alojadas en las distintas cámaras de cultivo del biorreactor. c) Fotografía de un biorreactor completo cerrado.

Como elementos que permitieran el sellado del biorreactor, se incorporaron dos láminas de PDMS de 400 μm de espesor que por un lado actuaran conectando las cámaras de cultivo con las entradas fluídicas a través de los canales fluídicos que definen y por otro gracias a su capacidad de deformación permitirían el sellado hermético del biorreactor. Las láminas comparten diseño, que contiene un canal de unión entre cada cámara de cultivo y su correspondiente entrada fluídica, así como un orificio de paso para comunicar el canal de salida con la salida fluídica en la pieza techo de PMMA.

La altura total del biorreactor sumadas sus partes es de aproximadamente 10,80 mm, lo que permite su acople en un microscopio sin interferir físicamente con los elementos ópticos del mismo (figura 4.2.b)). Así mismo el volumen muerto máximo de la cámara más los canales fluídicos es de aproximadamente 120 μl por muestra.

Las láminas del biorreactor de PMMA se obtuvieron a través de corte por láser de CO_2 de láminas de PMMA de 1, 2 y 5 mm de espesor respectivamente, lo que permitió definir las estructuras internas de cada lámina con precisión. Las piezas tras el corte fueron cuidadosamente lavadas con una solución jabonosa en aguas para eliminar restos del material tras el corte, aclaradas con agua destilada y lavadas de nuevo con una disolución de etanol en agua al 70% (v/v), tras lo que se dejaron secar a temperatura ambiente. Las láminas de PDMS, kit de elastómero Sylgard 184 (Dow Corning), se obtuvieron por moldeado en un molde de 400 μm de espesor que contiene las estructuras de los canales en su interior. En un primer paso, se añadió en primer lugar

30g del elastómero seguidos de 3g del agente de curado, para una relación 10% (p/p), en un tubo Falcon de 50 ml. Con ayuda de una paleta de plástico se mezcló vigorosamente ambos elementos hasta la dispersión homogénea del agente de curado en el elastómero. Para eliminar las burbujas de aire introducidas durante el proceso de mezclado el tubo se centrifugo a 2700 g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, la mezcla presento un aspecto claro y homogéneo sin que se observaran burbujas en su interior. La mezcla se añadió cuidadosamente al molde hasta su llenado, tras lo cual se procedió al cierre del molde y se dejó curar 24 horas a 65 °C. Pasado ese tiempo y comprobada la polimerización se procedió a la apertura del molde y con ayuda de un bisturí se retiró el posible exceso de PDMS en las estructuras definidas dentro de las láminas. El apilado de las distintas láminas permitió el cierre del biorreactor permitiendo la circulación fluídica a través de este (figura 4.2.c).

CULTIVO CELULAR

Como modelo celular de célula de cáncer colorrectal, para evaluar la funcionalidad del biorreactor en las primeras etapas del desarrollo del prototipo generando modelos tumorales tridimensionales, se empleó la línea celular humana (*Homo sapiens*) derivada de carcinoma colorrectal HCT 116 (CCL-247TM, ATCCR), que había sido previamente transfectada con el vector lentiviral pTRIP- Δ U3-EF1a-EGFP para conseguir la expresión constitutiva de la proteína fluorescente verde (GFP). Las células HCT 116/GFP se crecieron empleando como medio de crecimiento, en adelante DG10, el Medio Modificado Eagle de Dulbecco alto en glucosa (4,5g/L) (BE12-614F, Lonza) suplementado con; 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (SV30143.03HI, GE Healthcare), 20mM de L-glutamina (25030024, Thermo Fisher Scientific™) y 1% (v/v) de una mezcla de antibióticos (15140122, Thermo Fisher Scientific™): penicilina (concentración final en el medio de 100 unidades/ml) y estreptomina (concentración final en el medio de 100 μ g/ml). Las células se mantuvieron en crecimiento en un incubador de CO₂ (TEB-1000, EBERS) a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera saturada de humedad. Los cultivos se mantuvieron de manera rutinaria siguiendo protocolos de cultivo en esterilidad, realizándose cambios de medio cada 2-3 días, hasta que el cultivo alcanzo una confluencia de entre el 80% y el 90%. La ratio de subcultivo empleada para el mantenimiento del cultivo fue de 1:20 con respecto al cultivo original.

CULTIVO 3D DE CELULAS TUMORALES HCT 116-GFP A ALTA DENSIDAD COMO MODELO TUMORAL

Para simular el comportamiento de una biopsia de cáncer colorrectal en el biorreactor se generó un modelo tumoral tridimensional empleando las células HCT 116/GFP. A partir de un Flask de cultivo de 75 cm² de superficie sembrado con células HCT 116/GFP entre el 80% y el 90% de confluencia se preparó una suspensión celular de 2·10⁷ células/ml. Para establecer un soporte tridimensional, acelerar la formación de un modelo tridimensional y simular el componente extracelular de la biopsia, se empleó colágeno tipo I a una concentración de 3 mg/ml (). Para permitir la gelificación del colágeno se neutralizó el pH ácido de la disolución de colágeno, cuya función es la de

ralentizar la cinética de polimerización del colágeno que esta mediada por la temperatura. Todo el material y disoluciones empleadas en la neutralización y manipulación del colágeno, se enfrió manteniéndolo en hielo para limitar la polimerización del mismo. En un primer paso se descongelaron en hielo una alícuota de DMEM 10X, preparada en agua destilada y esterilizado por filtración a través un filtro de 0,22 μm , y una alícuota 10X del tampón de reconstitución, preparado disolviendo 2,2 g de bicarbonato sódico (NaHCO_3) y 4,8 g del ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) en 100 ml de agua destilada, filtrado a través de un filtro de 0,22 μm tras la disolución para la esterilización. El volumen de colágeno a neutralizar se pipeteó a un tubo eppendorf estéril de 0,5 ml pre-enfriado, y se mantuvo en hielo para evitar su polimerización. Para neutralizar el pH se añadió primero un volumen de DMEM 10X equivalente a 1/8 del volumen de colágeno a neutralizar, mezclándose suavemente con ayuda de una micropipeta evitando la formación de burbujas. Debido al pH ácido de la disolución de colágeno el rojo fenol, indicador de pH, presente en el DMEM viró hacia el amarillo indicando el pH ácido de la disolución final. En un segundo paso se añadió un volumen del tampón de reconstitución equivalente a 1/8 del volumen original de colágeno, mezclándose cuidadosamente para evitar la formación de burbujas, tras lo que se observó un viraje del rojo fenol del amarillo hacia el rosa claro indicando el viraje de la disolución hacia un pH básico. Se dejó reposar la disolución de colágeno 5 minutos en hielo para permitir que el pH se estabilizara, tras lo cual con ayuda de un papel tornasol se comprobó que el pH de la disolución estaba entre pH 7,1 y 7,4. La disolución de colágeno se centrifugó en una micro-centrifuga de tubos eppendorf pre-enfriada a 4 °C a 10.000 rpm durante 5 minutos para eliminar las posibles burbujas presentes en el gel.

Para la formación del modelo tumoral tridimensional se combinaron 50 μl de la disolución celular de HCT 116/GFP (10^6 células) con 50 μl de la disolución de colágeno neutralizado, mezclándose cuidadosamente para evitar la formación de burbujas en el gel. Los 100 μl se depositaron directamente en la cámara de cultivo del biorreactor, como se describe más adelante, dejándose gelificar en el incubador a 37 °C en condiciones de cultivo durante 30 minutos. Tras lo cual el sistema se conectó a un circuito fluídico y se perfundió medio DG10 a 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. La evolución de la muestra depositada en la cámara del biorreactor se realizó por microscopía de fluorescencia durante un periodo de 96 horas desde el inicio de la perfusión.

PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS DE CARCINOMA COLORECTAL

Las biopsias de carcinoma colorrectal se obtuvieron tras el consentimiento informado del paciente, sometido a revisión tras tratamiento coadyuvante, por ecoendoscopia en el servicio de digestivo del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Las muestras recién obtenidas se sumergieron en medio de transporte, DMEM alto en glucosa suplementado con un 2% (v/v) de la mezcla de estreptomycina/penicilina y 1% (v/v) de anfotericina B (15290018, Gibco™) (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), enfriado a 4 °C para evitar tanto la degradación celular de la muestra. Las muestras se procesaron en campana de flujo

laminar estéril, en un primer paso el medio de transporte se retiró y las biopsias se lavaron con PBS de lavado a 4 °C, PBS suplementado con un 2% (v/v) de la mezcla de estreptomicina/penicilina y 1% (v/v) de anfotericina B. Las biopsias fueron distribuidas en tubos Falcon de 50 ml, en cada tubo se añadieron 35 ml del PBS de lavado y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min en centrifugadora de tubos Falcon de rotor basculante, tras lo cual el sobrenadante se retiró y el sedimento se resuspendió en 35 ml de PBS de lavado fresco a 4 °C, repitiéndose el paso de lavado tres veces. Tras los lavados las biopsias se colocaron en una placa estéril de cultivo de 150 mm² y con ayuda de un bisturí estéril se trocearon en trozos de aproximadamente 2 mm de diámetro, que se separaron en tres grupos distintos: 1) a cultivo estático, se colocó un fragmento de biopsia por pocillo en una placa de cultivo celular de 24 pocillos en 1 ml DG10, donde se mantuvo 96 horas con cambios diarios de medio, tras lo cual fueron fijadas en una disolución al 4% (p/v) de formaldehído en PBS a pH 6,9, 2) a perfusión en el biorreactor y 3) como control a tiempo cero del estado del tejido, los fragmentos de biopsia se fijaron en una disolución al 4% (p/v) de formaldehído en PBS a pH 6,9.

MANTENIMIENTO DE BIOPSIAS/MODELOS TUMORALES EN BIORREACTOR A PERFUSIÓN

Con el fin de reducir la ventana de tiempo necesaria desde el procesamiento de las biopsias tumorales y el inicio de su mantenimiento en los biorreactores gracias a la perfusión continuada de medio de cultivo, los biorreactores se montaron y conectaron a un circuito fluídico antes de realizar la recogida de las biopsias e iniciar su procesamiento. El primer paso para el montaje del sistema fluídico, fue la esterilización de los componentes del sistema. Todo el material resistente a la temperatura, tubos Tygon™, conectores, láminas de silicona, etc., se esterilizó con calor húmedo en un autoclave. El material sensible a temperatura se esterilizó químicamente, en una campana de flujo laminar estéril, al sumergir las piezas en una dilución de etanol en agua al 70% (v/v), con la precaución de hacer pasar la dilución alcohólica a través de los canales y conductos de las piezas del sistema fluídico. Para eliminar los restos de alcohol de las piezas, la dilución alcohólica se retiró con ayuda de una línea de vacío y el material se lavó tres veces consecutivas con agua destilada estéril, aspirándola después de cada lavado con ayuda de la línea de vacío. Las piezas se dejaron secar en la campana de flujo laminar estéril bajo luz ultravioleta C durante 30 minutos. No se observaron signos de contaminación en ninguno de los elementos esterilizados siguiendo este protocolo.

Una vez esterilizados los componentes del circuito fluídico y el biorreactor, se procedió al montaje del biorreactor siguiendo los pasos de montaje descritos en el primer apartado de esta sección. Una vez el biorreactor estuvo cerrado herméticamente este se acopló al circuito fluídico, compuesto en orden desde la fuente de presión para la perfusión de líquido a través del circuito de: 1) Una bomba de jeringa de 6 canales NE-1600 (New Era Pump Systems) como fuente de presión para la impulsión de medio a través del circuito fluídico, 2) a la que se le habían acoplado una jeringuilla de 60 ml con conector tipo Luer en la punta (309653, BD) como reservorio de medio, 3) que

conectaba directamente con el biorreactor, y 4) un tubo Falcon de 50 ml en cuyo tape se habían acoplado 2 agujas hipodérmicas, una que permitían la entrada de medio al tubo que actúa como colector del circuito fluídico, y otra acoplada a un filtro de nitrocelulosa de 0,22 μ m de poro que permite la conexión del reservorio al exterior lo que permite ajustar la presión en el colector mientras se mantiene la esterilidad del circuito. Los elementos del circuito fluídico se conectaron entre sí empleando tubo Tygon de 0,8 mm de diámetro interno (15176494, Fisher Scientific). Una vez acoplado el biorreactor al circuito fluídico se inició la perfusión del circuito con el biorreactor vacío para cebar el circuito con medio DG10. Durante el proceso de cebado, se buscaron la presencia de posibles fugas en el biorreactor o en las conexiones entre los elementos del circuito. Una vez comprobada la estanqueidad circuito fluídico y el biorreactor el sistema se llevó a un incubador de CO₂ en condiciones de cultivo para permitir que el sistema se estabilizara a 37 °C. Durante la incubación del circuito fluídico se inició el proceso de procesamiento de biopsias de carcinoma colorrectal descrito en el capítulo anterior.

Tras la obtención de los fragmentos de biopsia, o tras mezclar el gel de colágeno neutralizado con la suspensión celular de HCT 116/GFP, el circuito se llevó de nuevo a la cabina de flujo laminar estéril. La superficie del biorreactor se limpió pulverizando una dilución de etanol al 70% (v/v) en agua con el fin de esterilizar la superficie del mismo. El biorreactor se abrió, aprovechado la reversibilidad del cierre entre elementos, permitiendo el acceso a la cámara de cultivo. La muestra, bien el fragmento de biopsia o bien el modelo tridimensional de tumor, se colocó en la cámara de cultivo del biorreactor con cuidado de no desplazar las piezas del biorreactor que permanecían unidas entre sí. Tras la colocación de la muestra en el biorreactor, se procedió al cierre hermético del mismo que fue comprobado al iniciar la perfusión de medio dentro de la cabina de flujo laminar estéril. Al igual que en el paso anterior, se buscó la presencia de fugas de medio en el biorreactor o en las conexiones entre elementos fluídicos del circuito. Finalmente, tras comprobar la hermeticidad del cierre del biorreactor se procedió a limpiar la superficie del mismo pulverizando la dilución de etanol empleada anteriormente y se llevó el circuito de vuelta al incubador de CO₂, donde se inició la perfusión a un caudal de 20 μ l/min durante un tiempo de 96 horas. Los cambios de medio para renovar el medio del circuito se llevaron a cabo cada 24 horas en la cabina de cultivo celular simplemente sustituyendo las jeringuillas de 60 ml, por jeringuillas con medio DG10 fresco. Durante este proceso se aprovechó para recolectar el medio en el colector situado al final del circuito.

Finalmente, tras 96 horas de perfusión, las muestras se recuperaron del biorreactor, gracias a la reversibilidad del cierre, y se fijaron en una disolución al 4% (p/v) de formaldehído en PBS a pH 6,9 para su posterior procesamiento histológico.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CULTIVOS 3D DE HCT 116-GFP

Una vez transcurridas las 96 horas de cultivo a perfusión, el flujo de medio DG10 se detuvo y el biorreactor se desconectó del circuito fluídico en campana de flujo laminar estéril, con cuidado de conservar el volumen muerto de medio en el biorreactor. Con ayuda de una micropipeta de 100µl, se retiró el medio contenido en el biorreactor a través de una de las entradas fluídicas, con cuidado para evitar alterar el gel contenido en la cámara del biorreactor, y se perfundió manualmente 100 µl de PBS como solución de lavado. La solución de lavado se retiró del biorreactor siguiendo los pasos anteriores y se sustituyó con 100µl de una disolución de yoduro de propidio (Sigma Aldrich, P4170) a una concentración de 5µM, como marcador de muerte celular, en medio DG10. El biorreactor se colocó de nuevo en el incubador de CO₂ durante 30 minutos para permitir la difusión del yoduro de propidio a través del gel de colágeno, tras lo cual se repitió el paso de lavado con PBS y finalmente se llenó el biorreactor con medio DG10 fresco. La viabilidad del modelo tridimensional de tumor se comprobó contrastando la señal fluorescente verde de las propias HCT 116/GFP con el marcaje nuclear de las células no viables del yoduro de propidio en el canal rojo de fluorescencia.

PROCESAMIENTO HISTOLOGICO DE LAS BIOPSIAS DE COLÓN Y TINCIÓN CON HEMATOXILINA / EOSINA

Las muestras procedentes de las biopsias de carcinoma colorrectal, tanto las recolectadas a tiempo cero experimental, como las mantenidas en estático y en el biorreactor, fueron fijadas en una disolución de formaldehído al 4% (p/v) en PBS tamponado a pH 6,9 para preservar las estructuras histológicas del tejido, así como la población celular presente. Las muestras así preservadas fueron deshidratadas gradualmente, en disoluciones acuosas de alcohol etílico de concentraciones crecientes, aclaradas en Xilol e incluidas en parafina en un procesador de tejidos en carrusel Shandon Citadel 2000 (Fisher Scientific). Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina para facilitar su corte al micrótopo, donde se obtuvieron cortes secuenciales de 3 µm de espesor del tejido que se recogieron en portaobjetos de vidrio como soporte.

Para permitir la tinción de los cortes histológicos, la parafina fue eliminada sumergiendo los portaobjetos en Xilol y las muestras fueron gradualmente hidratadas en un proceso inverso al descrito anteriormente, empleando diluciones decrecientes de alcohol etílico hasta la hidratación completa del tejido en agua en un último paso. Finalmente, las muestras completamente hidratadas se separaron en dos grupos, un primer grupo para la identificación por técnicas de inmunofluorescencia y marcaje, y un segundo grupo fue teñido empleando dos colorantes histológicos: 1) eosina, colorante ácido de color rosado capaz de unirse a estructuras con pH básico en las células, tiñendo de rosa el citoplasma celular y 2) hematoxilina, un colorante ácido de color violeta capaz de unirse a las estructuras ácidas celulares, tiñendo de azul los núcleos celulares. Las muestras así teñidas se observaron por microscopia de campo claro para determinar la densidad celular y morfología de las muestras derivadas de biopsias de carcinoma colorrectal.

IMMUNOFLUORESCENCIA Y MARCAJE FLUORESCENTE

Para evaluar las diferencias en el mantenimiento *ex vivo* de ambos tipos de muestras, las mantenidas en estático con cambios manuales de medio y las mantenidas a perfusión en el biorreactor, se decidió evaluar inicialmente dos factores, la densidad celular de la muestra y la presencia de distintos tipos celulares en la muestra. Con el fin de determinar la presencia de distintos tipos celulares en la muestra se realizó una tinción de inmunofluorescente contra vimentina, un filamento intermedio de tipo III que es marcador de células de origen mesenquimal y cuya aparición en el estroma es un indicativo de la progresión tumoral de la lesión neoplásica y que no se expresa en las células epiteliales del colon normales o tumorales (Stewart and Wild 2014). La densidad celular de las muestras se determinó a partir de los núcleos celulares presentes, así como del citoesqueleto de actina de las células.

Para el marcaje, los cortes histológicos se bloquearon para reducir las interacciones inespecíficas de los marcadores fluorescentes con la muestra. Para ello, se incubó el corte durante 30 minutos empleando una disolución al 0,1% (p/v) de saponina (47036-50G-F, Sigma-Aldrich) y 5% de Albumina Sérica Bovina (A9418-5G, Sigma-Aldrich) en PBS. Los cortes se lavaron con una disolución al 0,1% (p/v) de saponina y 0,5% de BSA en PBS (PBSAS) para eliminar el exceso de bloqueo. Los cortes se incubaron secuencialmente, primero con el anticuerpo primario policlonal (IgG) de conejo anti-vimentina (ab92547, Abcam) en PBSAS (dilución 1:200) durante 1 hora, y después con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado al marcador fluorescente Alexa Fluor 488® (A-11008, Thermo Fisher Scientific) en PBSA (dilución 1:200) durante 1 hora. Tras cada paso de incubación los cortes se lavaron con PBSAS para eliminar el exceso de anticuerpo.

Tras el marcaje de la vimentina en los cortes, se procedió al marcaje del citoesqueleto de actina y los núcleos de las células presentes. Para el marcaje del citoesqueleto de actina se empleó Faloidina-TRITC (P1951, Sigma Aldrich) a una concentración de 20 μ M en PBS, dejándose incubar en la muestra durante 30 minutos. Los cortes se lavaron con PBS para eliminar el exceso de Faloidina-TRITC y se incubaron durante 5 minutos con una dilución 5 μ g/ml de Hoechst 33342 (B2261, Sigma Aldrich) en PBS. Finalmente, los cortes se lavaron con PBS y se añadieron 20 μ l de medio de montaje Mowiol® 4-88 (475904, Merck) al 12% (p/v) y glicerol (G5516, Sigma Aldrich) al 30% (p/v) como medio de montaje.

MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron tomadas de las cámaras del biorreactor con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E (Nikon) acoplado a una cámara en blanco y negro de alta resolución Luca R (Andor). Las imágenes de campo claro de los cortes histológicos se tomaron en el Servicio de microscopía y anatomía patológica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) empleando un

microscopio invertido Olympus IX81 (Olympus). Las imágenes fueron procesadas empleando el programa de procesamiento y análisis de imágenes FIJI/ImageJ.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el software libre R. Para cada grupo de valores se obtuvo su media aritmética y se calculó el error estándar de la media como medida de dispersión de los valores del grupo con respecto a esta. Los análisis de relación entre variables cuantitativas se obtuvieron a través de una prueba t de Student apareada con un intervalo de confianza del 5% ($p=0,05$).

RESULTADOS

MANTENIMIENTO EN BIORREACTOR DE CULTIVOS 3D DE HCT 116-GFP A ALTA DENSIDAD COMO MODELOS DE TUMOR

El biorreactor se desarrolló como una herramienta que permitiera la preservación ex vivo de biopsias procedentes de tumor, permitiendo durante el proceso el acceso óptico a la cámara de cultivo para evaluar la interacción entre el tumor y otros tipos celulares o fármacos. Como modelo inicial para evaluar la funcionalidad del biorreactor se emplearon cultivos tridimensionales, gel de colágeno para simular la matriz extracelular, a alta densidad celular ($2 \cdot 10^7$ células/ml). Esto permitió evaluar el comportamiento de la muestra al ser sometido a la tensión cortante resultante del paso de fluido por la muestra, así como su impacto en la preservación de la densidad celular y viabilidad celular en esta.

En todos los casos ($n=12$), los geles permanecieron confinados en las cámaras de cultivo sin que observara ruptura de la muestra o proyección de esta hacia la zona de los canales microfluídicos que permiten el flujo de medio fresco a la cámara de cultivo (figura 4.3.a)), sin que se observaran cambios radicales en el volumen de la muestra más allá de los asociados a la propia contracción del gel por las células HCT 116-GFP embebidas en este. Los simulacros de tumor se mantuvieron durante 96 horas a flujo constante sin que se observaran cambios notables en la fluorescencia aportada por las HCT 116-GFP (figura 4.3.b)), manteniendo unos niveles de intensidad de fluorescencia similares a lo largo de una zona central de $687.232 \mu\text{m}^2$ (rectángulo de $3.304 \mu\text{m}$ de ancho por $208 \mu\text{m}$ de ancho). Sin que se observase la aparición de zonas oscuras, en las que cae la intensidad de fluorescencia, en el interior del simulacro que sugieran de la aparición de una zona de necrosis interna en el modelo (Zanoni et al. 2016). Lo que concuerda con la ausencia de núcleos marcados por yoduro de propidio tras 96 horas de cultivo bajo perfusión en el biorreactor (figura 4.3.a)). Estos datos soportan la hipótesis de la formación de flujo intersticial en la muestra durante la perfusión en el biorreactor en muestras de más de 3 mm^2 de superficie.

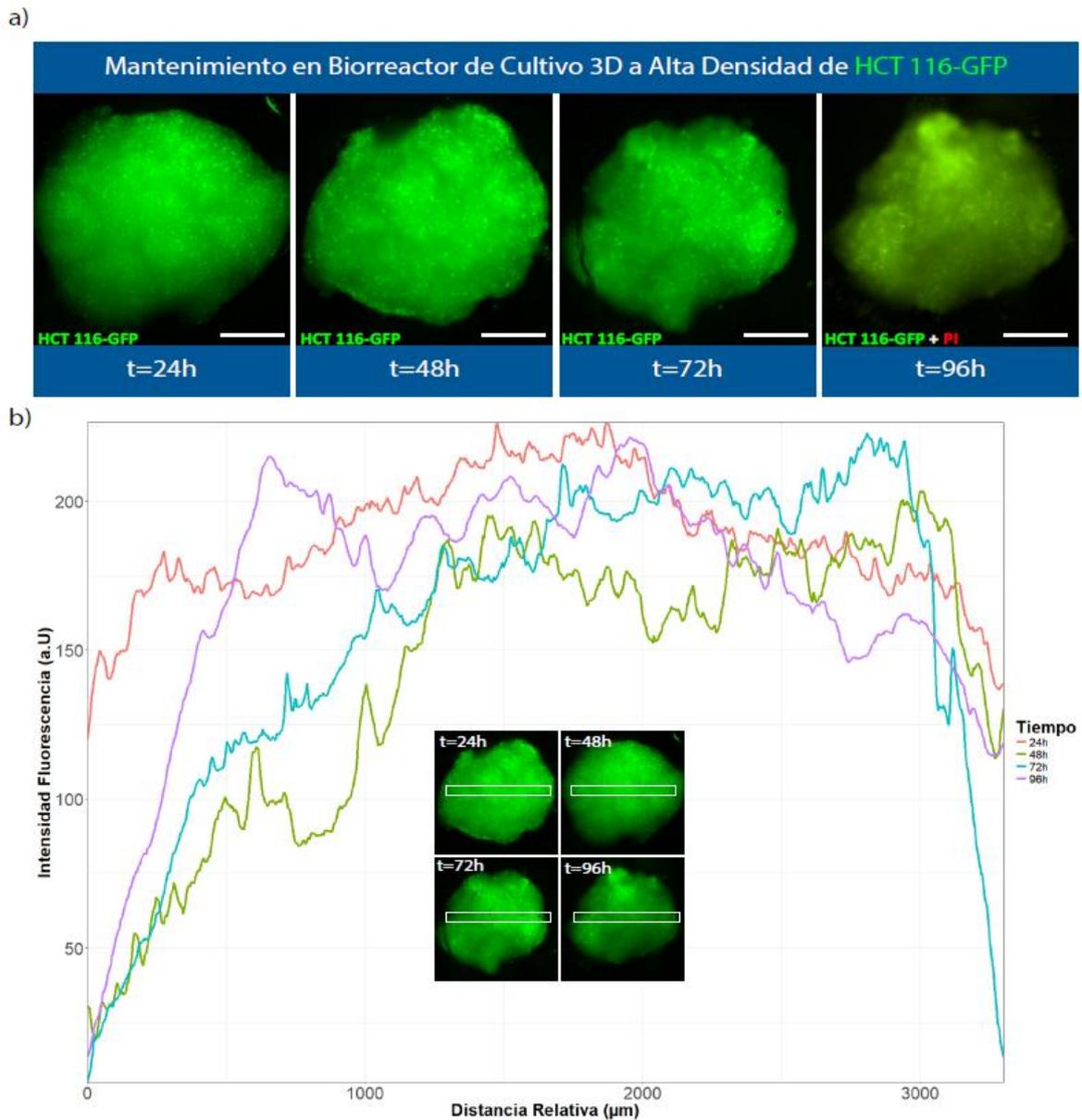


Figura 4.3. Mantenimiento en biorreactor de cultivos 3D, en colágeno, de células de carcinoma colorrectal HCT 116-GFP a alta densidad celular como simulacros de biopsias de tumor. a) Los geles de colágeno sembrados con HCT 116-GFP a una concentración de $2 \cdot 10^7$ células/ml se mantuvieron en los biorreactores durante 96 horas de perfusión continuada ($20 \mu\text{l}/\text{min}$). Tras 96 horas de cultivo la viabilidad del gel se determinó por la fluorescencia combinada de las propias células HCT 116-GFP y una disolución de *ioduro de propidio* (PI). Las barras blancas en las imágenes escalan a $1000 \mu\text{m}$ **b)** Perfiles de fluorescencia de la región central de un cultivo 3D de células HCT 116-GFP durante 96 horas. El rectángulo señalado en las imágenes representa la zona analizada para obtener la intensidad de fluorescencia media del área señalada.

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL BIORREACTOR COMO SISTEMA FLUÍDICO PARA EL MANTENIMIENTO *EX VIVO* DE BIOPSIAS DE TUMOR

Tras el mantenimiento durante 96 horas de los geles de colágeno sembrados a alta densidad de células HCT 116-GFP, sin que la muestra se perdiera, al ser arrastrada fuera de la cámara de cultivo del biorreactor, o se deformara, al proyectarse hacia los canales microfluídicos, por la aplicación del flujo de medio necesario para preservar la densidad celular a lo largo de 96 horas, se cargaron en el biorreactor (n=6) fragmentos de biopsias de cáncer colorrectal obtenidos de paciente de unos 2 mm² de superficie. La funcionalidad experimental del biorreactor se analizó en tres fases independientes: 1) carga de la biopsia y mantenimiento de la estanqueidad del biorreactor tras el cierre, 2) perfusión de la muestra y 3) recuperación post-perfusión de la biopsia (figura 4.4).

La carga de la biopsia se realizó con éxito en todas las cámaras de los biorreactores, sin que se produjera fugas de medio significativas tras la apertura de las cámaras, que habían sido pre-cebadas de medio durante el proceso de preparación del biorreactor. Las muestras permanecieron alojadas en la cámara del biorreactor tras el proceso de cierre sin que se observaran desplazamientos notables durante el cierre. Tras el cual se pudo recuperar la continuidad fluídica en las líneas de flujo destinadas a alimentar las diferentes cámaras del cultivo.

Durante la fase de perfusión de 96 horas, no se observaron fugas de medio ni a nivel del biorreactor ni a nivel de las cámaras de cultivo del mismo, sin que se observaran flujos cruzados de medio cultivo entre cámaras. Las muestras, en todos los casos salvo dos, permanecieron en sus respectivas cámaras de cultivo sin que se observaran proyección hacia los canales microfluídicos que conectan la cámara del biorreactor a la línea de flujo que permite la perfusión de medio de cultivo fresco para el mantenimiento de la muestra. En los dos casos en los que la muestra se desplazó de la cámara de cultivo, estas fueron arrastradas a la línea de flujo y acabaron en el tubo colector situado al final del circuito fluídico. Siendo esto debido a la propia naturaleza de las muestras, al ser de naturaleza mucinosa con un pequeño núcleo sólido en su interior, lo que posiblemente permitió su desplazamiento de la cámara de cultivo en el biorreactor.

Finalmente, en la última etapa experimental evaluada, la recuperación de la muestra para su procesamiento histológico, se pudo recuperar la muestra con éxito en todos los casos en los que la muestra no había sido desplazada previamente de la cámara del biorreactor salvo en uno. En este caso la muestra, que compartía el aspecto mucinoso de las muestras arrastradas en la etapa anterior fue imposible de recuperar de manera íntegra para permitir su posterior procesamiento histológico.

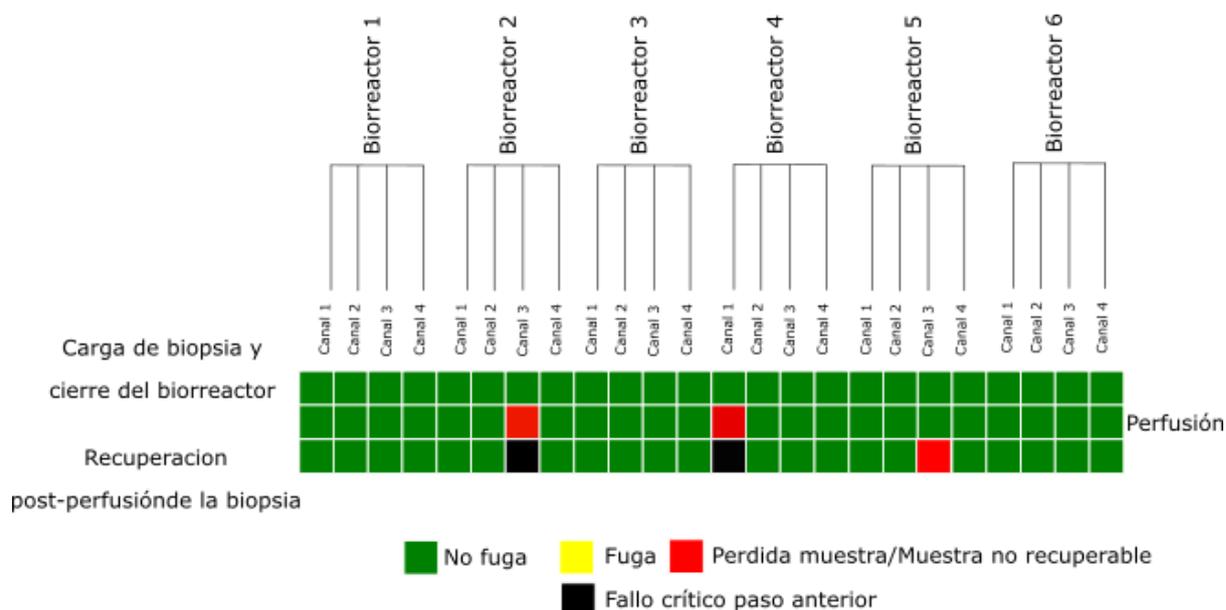


Figura 4.4. Evaluación experimental del comportamiento del biorreactor. La gráfica, en formato mapa de calor, representa el comportamiento de canal (canales microfluídicos y cámara de cultivo) en cada biorreactor usado frente a 3 etapas diferentes del proceso experimental de mantenimiento *ex vivo* de muestras derivadas de tumores colorrectales: 1) carga de biopsia y cierre del biorreactor, 2) perfusión, y 3) recuperación de la biopsia tras el mantenimiento en el biorreactor por perfusión continuada de medio de cultivo.

MANTENIMIENTO DE LA DENSIDAD CELULAR DE BIOPSIAS DE TUMOR *EX VIVO* EN BIORREACTOR

Las muestras recuperadas de los biorreactores al igual que las mantenidas en estático y las separadas a tiempo cero, como control del estado del tejido, fueron procesadas histológicamente con éxito. Lo que permitió su tinción por eosina y hematoxilina para observar las estructuras celulares presentes y evaluar la bondad del mantenimiento de las biopsias *ex vivo* en el biorreactor a través de la densidad celular de las muestras.

En el caso de las muestras de tejido fijadas a tiempo cero tras su procesamiento, se pudo observar (figura 4.5.a) y b)) que la densidad celular se encontraba homogéneamente distribuida a lo largo de la muestra, sin la presencia de núcleos picnóticos (de un tamaño menor a los normales y en los que la cromatina se ha compactado debido a la muerte celular). Lo que es consistente, con el mantenimiento de la densidad celular de la biopsia por la propia microcirculación vascular del paciente más allá de las primeras 100 μm de espesor que pueden ser dependientes exclusivamente de fenómenos de difusión. Para las muestras mantenidas por perfusión en el biorreactor (figura 4.5 c) y d)), se pudo observar unos niveles de densidad celular comparables a los observados en las muestras de tejido fijadas a tiempo cero como controles. La densidad celular, en las muestras mantenidas a perfusión en los biorreactores, se observó distribuida a lo largo de toda la muestra de forma homogénea, con independencia del nivel de compactación del tejido. Esta distribución homogénea, no concentrada en las zonas superficiales de la muestra que serían las más accesibles a los nutrientes frescos debidos a la perfusión de medio,

apoya la hipótesis de formación de flujo intersticial a lo largo de la muestra. Finalmente, las muestras mantenidas en estático (figura 4.5.e) y f)), a través de cambios manuales de medio periódicos cada 24 horas, presentan una densidad celular pobre en comparación con las muestras fijadas a tiempo cero y las mantenidas en biorreactor. La distribución de las células en la muestra está limitada a las zonas del tejido menos empaquetadas y la periferia de la muestra, lo que sugiere que el acceso a nutrientes frescos que permitan el soporte de la densidad celular de la muestra es dependiente de fenómenos de difusión, limitado como se ha señalado con anterioridad a un espesor cercano a 100 μm .

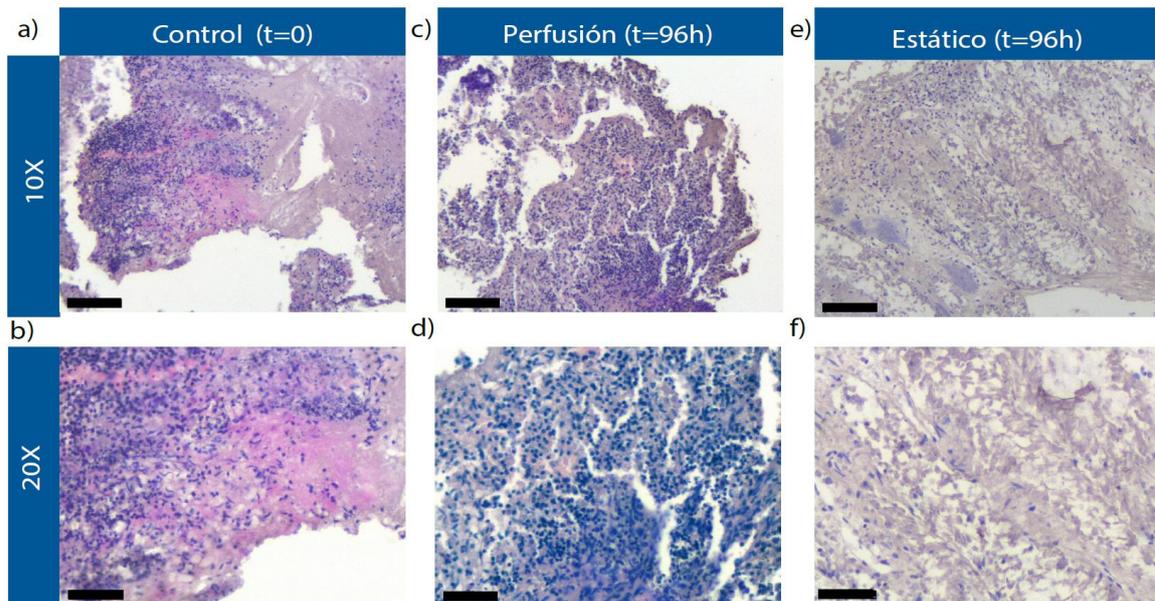


Figura 4.5. Tinción de eosina/hematoxilina de cortes histológicos de muestras derivadas de biopsias de tumor. Las muestras obtenidas a partir de las biopsias de tumor se dividieron en tres grupos: **a) y b)** muestras fijadas a tiempo cero para evaluar el estado inicial del tumor, **c) y d)** muestras mantenidas *ex vivo* en biorreactor por perfusión continuada de medio durante 96 horas y, **e) y f)** muestras mantenidas *ex vivo* a través de cambios de medio manuales cada 24 horas mantenidas durante un total de 96 horas. La tinción de eosina tiñe las estructuras básicas de las células en rosa (*citoplasma*), mientras que la tinción de hematoxilina tiñe en azul las estructuras ácidas de las células (*núcleos*). Las imágenes a 10X están tomadas a 100 aumentos y los detalles a 20X de las imágenes de 10X están tomadas a 200 aumentos. La barra negra de las imágenes escala a 100 μm .

MANTENIMIENTO DE LA HETEROGENEIDAD CELULAR EN BIOPSIAS DE TUMOR *EX VIVO* EN BIORREACTOR

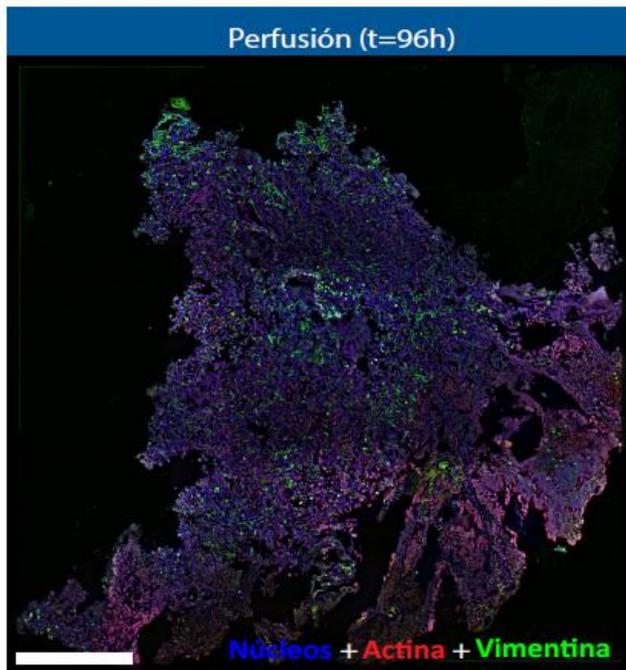
Para evaluar el impacto de la perfusión en la preservación de los distintos tipos celulares, y por lo tanto de parte de la heterogeneidad tumoral, se realizó un marcaje celular e inmunofluorescencia sobre cortes histológicos de biopsias mantenidas tanto por recambio manual de medio en estático, como por perfusión continuada en el biorreactor. Como marcadores se emplearon Hoechst 33342, para la tinción de núcleos, faloidina conjugada a TRITC, para definir el citoesqueleto de las células presentes y un

anticuerpo anti-vimentina para determinar la presencia de células vimentina positivas, expresada únicamente en células de extirpe mesenquimal o bajo una transformación epitelio-mesenquimal, como marcador de heterogeneidad celular.

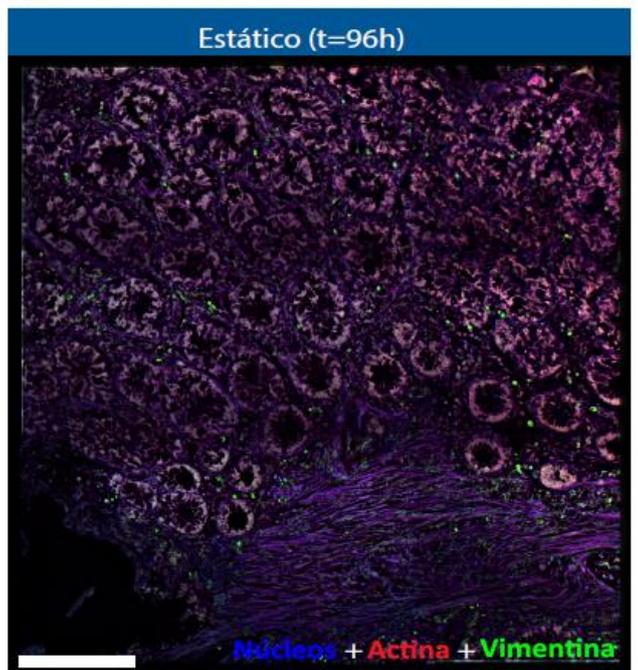
En las muestras de tumor mantenidas bajo perfusión (figura 4.6.a)) se pudo observar la presencia de núcleos, y por lo tanto una alta densidad celular, distribuidos de manera homogénea a lo largo de toda la muestra al igual que la presencia de islotes de células vimentina positivas distribuidos a lo largo de la muestra, lo que apunta al mantenimiento de distintos tipos celulares en la muestra y es consistente con la hipótesis de generación de flujo intersticial a través de la muestra de la biopsia. Al contrario, para los cortes obtenidos de las muestras preservadas en estático por cambios de medio manual, la densidad celular (figura 4.6.b)), representada por la distribución de núcleos a lo largo de la muestra es bastante pobre. Limitándose exclusivamente, como en las muestras observadas por tinción con eosina y hematoxilina, a la periferia de la muestra y en las zonas menos empaquetadas del tejido y por lo tanto más expuestas al medio de cultivo que rodea la muestra. La presencia de células vimentina positiva es mucho menor que en el caso de las muestras mantenidas en el biorreactor.

Al comparar la superficie ocupada tanto por los núcleos celulares, como por las células vimentina positivas en ambos tipos de muestras, las preservadas por cambios de medio manuales y en biorreactor se pueden observar diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos entre sí (figura 4.6.c)). En el caso de la densidad celular de las muestras, representadas por el área ocupada por los núcleos, se obtuvo una superficie de $275.670,642 \pm 2.056.135 \mu\text{m}^2$ (en logaritmo base 10: $5,441 \pm 0,003$) para las muestras mantenidas en biorreactor frente a $10.842 \pm 1.357,027 \mu\text{m}^2$ (en logaritmo base 10: $4,035 \pm 0,051$) para las muestras mantenidas por cambios de medio manuales. Al comparar la superficie ocupada por células vimentina positiva en ambos tipos de muestra se obtuvo para las muestras mantenidas por perfusión en biorreactor un área de $38.106,422 \pm 6332,844 \mu\text{m}^2$ (en logaritmo base 10: $4,580 \pm 0,067$) frente a $5.518 \pm 3410,359 \mu\text{m}^2$ (en logaritmo base 10: $3,742 \pm 0,209$) para las muestras mantenidas en estático a través de cambios de medio manuales cada 24 h.

a)



b)



c)

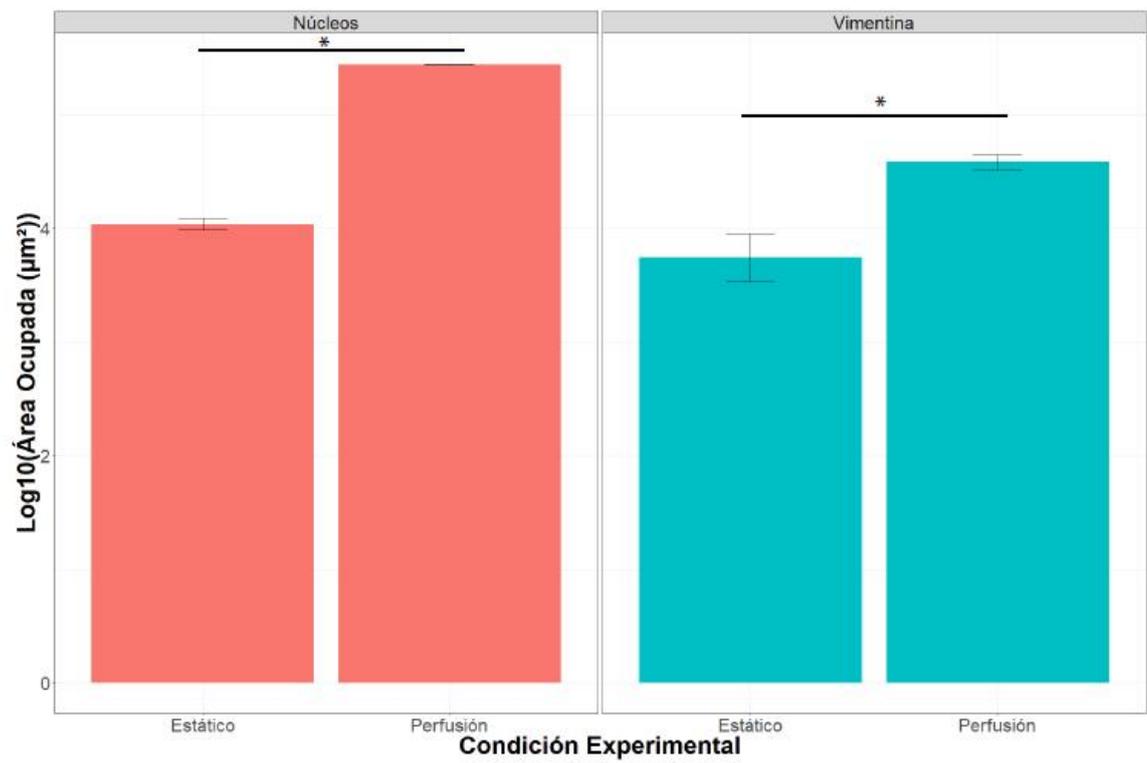


Figura 4.6. Mantenimiento de la heterogeneidad celular en las muestras conservadas ex vivo en biorreactor y en estático. a) Inmunotinción de fluorescencia de un corte histológico de una muestra derivada de biopsia mantenido en biorreactor durante 96 horas. La imagen de fluorescencia a 200 aumentos muestra la tinción de tres componentes celulares, los núcleos con Hoechst 33342 (azul), la actina del citoesqueleto celular con faloidina conjugada a TRITC (rojo) y la vimentina con un anti cuerpo anti-vimentina (verde). **b) Inmunotinción de fluorescencia de un corte histológico de la misma muestra derivada de biopsia que el caso anterior mantenida en estático con cambios de medio manuales cada 24 horas hasta 96 horas.** La imagen a 200 aumentos se marcó empleando los mismos marcadores y anticuerpos que en el caso anterior, mostrando los núcleos (azul), citoesqueleto de actina (rojo) y vimentina (verde). La barra blanca en las imágenes escala a 300 μm . **c) Gráfico de barras mostrando el área ocupada en base logarítmica¹⁰ por los núcleos y las células vimentina positivas en imágenes de inmunofluorescencia (n=3) de biopsias de tumor mantenidas en dos condiciones experimentales durante 96 horas: en biorreactor a perfusión o en estático con cambios de medio manual.** Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se denotan con (*).

DISCUSION

El objetivo de este trabajo era el desarrollar un sistema fluídico de mantenimiento ex vivo de muestras complejas biológicas a través de la perfusión continuada de nutrientes aportado por un flujo continuado de medio de cultivo. El sistema, además, debería permitir la monitorización por microscopía óptica de la muestra durante la etapa de perfusión para permitir visualizar la interacción de la muestra con otros tipos celulares o fármacos, y la recuperación de la muestra tras el proceso de perfusión de forma que permitiera su procesamiento histológico que permitiera ofrecer información en un formato no solo valioso a nivel experimental sino también fácilmente interpretable a nivel clínico. Finalmente, el volumen muerto del sistema debería de ser mínimo para permitir la manipulación de la muestra y su mantenimiento a través de perfusión a través de la integración de canales microfluídicos que alimenten una cámara macroscópica que permita la manipulación y mantenimiento en esa escala. Todas estas características permitirían desarrollar, a largo plazo, una herramienta que permitiera el desarrollo de una terapia personalizada para cada paciente seleccionando la mejor combinación terapéutica para el tratamiento del tumor.

El biorreactor desarrollado en este trabajo se diseñó como una combinación de elementos microfluídicos, canales, y elementos macroscópicos, cámara de cultivo, con un volumen muerto total de 120 μl /muestra, muy inferior a los sistemas de mantenimiento ex vivo por perfusión de muestras macroscópicas derivadas de tumor [REFs]. El biorreactor se fabricó en una combinación de materiales transparentes en el espectro visible e infrarrojo y ultravioleta cercano, con el fin de permitir acceso óptico completo a las cámaras de perfusión y canales microfluídicos, permitiendo la observación de las muestras por microscopía de fluorescencia. Se empleó PMMA para las partes rígidas destinadas a albergar las muestras tumorales, alojar conectores fluídicos y actuar como base del sistema. Los canales microfluídicos se definieron en láminas de PDMS que debido a la naturaleza elástica del material permitió su uso como elemento de sellado interno para preservar la estanqueidad de las líneas fluídicas y cámaras del biorreactor. El sistema se diseñó con un cierre reversible, a través del apriete de las láminas gracias al uso de tornillos de acero inoxidable, que permitieron el acceso directo a las cámaras de cultivo, tanto al inicio del experimento para permitir la

inserción de la muestra como al final para permitir su recuperación para su posterior procesamiento histológico. Finalmente, debido al reducido tamaño necesario para implementar las cámaras de cultivo y líneas de flujo se pudo ajustar el biorreactor al tamaño de un portaobjetos de microscopia, lo que facilitó su por un lado su acople a un microscopio y por otro permitió incorporar cuatro cámaras de cultivo fluidicamente aisladas entre sí lo que demuestra la capacidad de escalado del sistema.

Como primer paso para evaluar la viabilidad del biorreactor, como sistema fluídico de perfusión para el mantenimiento *ex vivo* de muestras derivadas a partir de biopsias tumorales, se emplearon cultivos tridimensionales de células de carcinoma colorrectal HCT 116-GFP a alta densidad celular ($2 \cdot 10^7$ células/ml) en gel de colágeno (1,5 mg/ml). Estos simulacros de tumor se mantuvieron hasta 96h en los biorreactores con el fin de evaluar el impacto del flujo en la densidad y viabilidad celular de las muestras, así como el impacto físico de la perfusión sobre la muestra. En todos los casos, las muestras permanecieron en la cámara de cultivo y no se observó que fueran arrastradas al interior de los canales microfluídicos o hacia las líneas de flujo al ser sometidas a perfusión. Tampoco se observaron cambios morfológicos o rupturas de las muestras debidas a la tensión de corte aplicada por el paso de fluido durante la perfusión de medio de cultivo. La viabilidad de los cultivos, tras 96 h de perfusión no se vio mermada a lo largo de la anchura de las muestras, ni tampoco se observó un decaimiento de la fluorescencia aportado por las células HCT 116-GFP, como sucede en otros modelos de cultivo tridimensionales a alta densidad, tanto con el soporte [REF] o no [REF] de matriz extracelular en la zona central de muestra. En condiciones estáticas, las muestras a alta densidad celular sufren un proceso de necrosis en la zona central [REF] debido a que, la distribución de nutrientes a lo largo de la muestra es dependiente exclusivamente del proceso de difusión. Esto, limita enormemente el acceso de nutrientes a las partes internas de la muestra. Mientras que esto resulta beneficioso en la recreación del componente necrótico de un tumor que impulsa el crecimiento del tumor desde el borde del mismo invadiendo tejido cercano [REF]. En el caso de este estudio, es un factor limitante para el mantenimiento de los componentes celulares propios de la biopsia como sucede con los sistemas que buscan de la recreación de órganos [REF], al carecer de sistemas vasculares internos que ofrezcan un aporte homogéneo de nutrientes a las partes internas de la muestra. El mantenimiento de la fluorescencia a lo largo de la anchura de la muestra y la ausencia de la aparición de un núcleo necrótico visible tras 96 horas de cultivo soportan la hipótesis del mantenimiento de las muestras a través de la creación de un flujo intersticial a través de la muestra de la biopsia que permite mantener la viabilidad de los cultivos 3D a alta densidad celular. Además, el seguimiento *in situ* de la fluorescencia de los geles de HCT 116-GFP mantenidos en el biorreactor y la tinción *in situ* de viabilidad a las 96 horas demuestran la capacidad del biorreactor de permitir la observación y el seguimiento de la muestra, así como el marcaje con tinciones fluorescentes *in situ*. Esto facilitaría el estudio de la interacción del tumor y su respuesta frente a otros tipos celulares, células del sistema inmune para estudios de terapia celular, o quimioterápicos *in vivo* a la vez que potencialmente se preservaría la densidad celular y heterogeneidad del mismo. (Jose Maria Ayuso et al. 2015) o no (Zanoni et al.

2016) de matriz extracelular en la zona central de muestra. En condiciones estáticas, las muestras a alta densidad celular sufren un proceso de necrosis en la zona central debido a que, la distribución de nutrientes a lo largo de la muestra es dependiente exclusivamente del proceso de difusión. Esto, limita enormemente el acceso de nutrientes a las partes internas de la muestra. Mientras que esto resulta beneficioso en la recreación del componente necrótico de un tumor que impulsa el crecimiento del tumor desde el borde del mismo invadiendo tejido cercano (Muz et al. 2015). En el caso de este estudio, es un factor limitante para el mantenimiento de los componentes celulares propios de la biopsia como sucede con los sistemas que buscan de la recreación de órganos (Farris, et al. 2016), al carecer de sistemas vasculares internos que ofrezcan un aporte homogéneo de nutrientes a las partes internas de la muestra. El mantenimiento de la fluorescencia a lo largo de la anchura de la muestra y la ausencia de la aparición de un núcleo necrótico visible tras 96 horas de cultivo soportan la hipótesis del mantenimiento de las muestras a través de la creación de un flujo intersticial a través de la muestra de la biopsia que permite mantener la viabilidad de los cultivos 3D a alta densidad celular. Además, el seguimiento *in situ* de la fluorescencia de los geles de HCT 116-GFP mantenidos en el biorreactor y la tinción *in situ* de viabilidad a las 96 horas demuestran la capacidad del biorreactor de permitir la observación y el seguimiento de la muestra, así como el marcaje con tinciones fluorescentes *in situ*. Esto facilitaría el estudio de la interacción del tumor y su respuesta frente a otros tipos celulares, células del sistema inmune para estudios de terapia celular, o quimioterápicos *in vivo* a la vez que potencialmente se preservaría la densidad celular y heterogeneidad del mismo.

A pesar de la buena respuesta a nivel de mantenimiento de la viabilidad y comportamiento en el biorreactor, la naturaleza de las muestras procedentes de biopsia posee una heterogeneidad interna que es difícilmente reproducible a través de modelos experimentales. Por ello, la evaluación experimental del biorreactor se llevó a cabo empleando muestras derivadas de biopsias de pacientes con tumores colorrectales. Para facilitar la evaluación experimental del biorreactor se dividió el proceso experimental en tres fases distintas: 1) una primera fase que comprendió los pasos necesarios para la colocación de la muestra en el biorreactor, así como el inicio de la perfusión, 2) una fase de perfusión de medio de cultivo continuada en el biorreactor con el fin de preservar la muestra y, 3) la fase final en la que la muestra es recuperada del biorreactor y fijada para su posterior procesamiento histológico. El sistema de apertura reversible permitió realizar en todos los casos el cebado fluídico del sistema y la posterior introducción de la muestra en el biorreactor, permitiendo restablecer el flujo en el circuito conservando la hermeticidad del circuito con el exterior y entre las distintas líneas de flujo del biorreactor entre sí. Así como preservar la estanqueidad de las líneas fluídicas durante la fase de perfusión de medio de cultivo para permitir el mantenimiento *ex vivo* de las muestras derivadas de biopsia. Sin embargo, en esta fase de perfusión en dos de las líneas fluídicas las muestras fueron arrastradas hacia la línea de flujo y acabaron en el tubo colector de medio situado al final del sistema. Esto pudo ser debido a la naturaleza mucinosa de las muestras, que dificultaron su procesamiento

y posiblemente llevaron a infravalorar el tamaño de la parte sólida del tumor y por lo tanto pudieron ser desplazadas hacia las líneas de flujo. Finalmente, las muestras se pudieron recuperar tras el proceso de perfusión para su procesamiento histológico al terminar la fase de perfusión, salvo en un único caso asociado también a la naturaleza mucinosa de la muestra que no pudo ser recuperada íntegramente. Esto demuestra la viabilidad del uso del biorreactor como sistema fluídico que permite la perfusión sobre muestras macroscópicas y su posterior recuperación para su procesamiento. La pérdida de muestras debido a la naturaleza de las mismas puede ser fácilmente corregible a través de cambios en el diseño de los microcanales, incorporando pilares para atrapar el tumor imponiendo así una mayor restricción física al desplazamiento de las muestras hacia la línea de flujo.

Las muestras procedentes de biopsia tienen una organización tisular propia con cambios tanto en la composición como en la distribución de la densidad celular a lo largo de la muestra que puede afectar el perfil del hipotético flujo intersticial creado por la perfusión continuada de medio en el biorreactor. Para evaluar esas posibles diferencias se emplearon muestras derivadas a partir de biopsias de tumores colorrectales obtenidas por ecoendoscopia, separándose en tres grupos: 1) a tiempo cero para evaluar el estado inicial del tejido, 2) mantenidas de forma manual 96 h a través de cambios de medio manuales cada 24 horas y finalmente a perfusión en el biorreactor por un periodo de 96 h. Las muestras a tiempo cero, muestran una elevada densidad celular, consecuente con el mantenimiento de la propia microvasculatura del tejido. Sin que se observara predominancia de núcleos picnóticos en la muestra ni signos evidentes de necrosis o muerte tisular. En las muestras mantenidas en estático, la densidad celular del tejido era pobre en comparación a las muestras de ese mismo tejido fijadas a tiempo cero. La densidad celular en las muestras en estático se concentraba en los bordes del tejido, así como en las zonas de menor empaquetamiento o densidad del mismo, que son las más expuestas al medio de cultivo. Esta distribución es consecuente con la renovación de nutrientes en el tejido mediada por la difusión de nutrientes desde el medio hacia el interior de la muestra. Las muestras mantenidas en biorreactor mostraron una densidad celular similar a la del tejido fijado a tiempo cero como control. Estando la densidad celular distribuida de manera homogénea a lo largo de la muestra sin que se observara la predominancia de núcleos picnóticos en la muestra. Esto es compatible con la hipótesis del mantenimiento de la densidad celular debido a la de la generación de flujo intersticial a través de la muestra durante la fase de perfusión en el biorreactor. Este flujo intersticial permitiría la distribución de nutrientes a través del espesor de la muestra, lo que permite el mantenimiento de la densidad celular a lo largo de esta.

Los tumores son estructuras complejas cuya evolución y desarrollo está condicionado por la diversidad de células no tumorales que pueden ser reclutadas por el tumor y que confieren soporte [REF] así como capacidades invasivas [REF] y de escapar de a la vigilancia inmunitaria [REF]. Esto hace importante el preservar la heterogeneidad celular

de las muestras preservadas en los biorreactores para permitir su uso futuro como plataformas destinadas a la selección y cribado de tratamientos personalizados. Como prueba de concepto, se decidió determinar la presencia de células vimentina positivas en las muestras derivadas de biopsia mantenidas tanto a flujo como en estático durante 96 horas. La vimentina es un filamento intermedio que aparece en el citoesqueleto de células de origen mesenquimal [REF] o bajo una transformación epitelio-mesenquimal [REF] y que se encuentra ausente en las células del epitelio del colon sanas [REF]. El marcaje de núcleos y del citoesqueleto de actina de los cortes histológicos permitió comprobar las diferencias en la densidad celular entre las muestras mantenidas en estático y las muestras mantenidas a perfusión durante 96 horas. Al comparar la superficie ocupada por los núcleos entre ambos tipos de muestra se observaron cambios estadísticamente significativos siendo superior la superficie ocupada por núcleos en las muestras mantenidas en biorreactor. De igual manera sucede en la superficie ocupada por células vimentina positiva, siendo significativamente mayor en las muestras preservadas a través de perfusión en el biorreactor y verse prácticamente desaparecidas en la muestra en estático. Lo que sugiere que el flujo intersticial generado a través de la perfusión de medio fresco en la muestra ayuda a preservar parte de la heterogeneidad tumoral.

Los tumores son estructuras complejas cuya evolución y desarrollo está condicionado por la diversidad de células no tumorales que pueden ser reclutadas por el tumor y que confieren soporte (De Palma, et al. 2017) así como capacidades invasivas (Mlecnik et al. 2016) y de escapar de a la vigilancia inmunitaria (Mohme, et al. 2017). Esto hace importante el preservar la heterogeneidad celular de las muestras preservadas en los biorreactores para permitir su uso futuro como plataformas destinadas a la selección y cribado de tratamientos personalizados. Para valorar esta heterogeneidad en las muestras, se decidió determinar la presencia de células vimentina positivas en las muestras derivadas de biopsia mantenidas tanto a flujo como en estático durante 96 horas. La vimentina es un filamento intermedio que aparece en el citoesqueleto de células de origen mesenquimal o bajo una transformación epitelio-mesenquimal y que se encuentra ausente en las células del epitelio del colon sanas (Lazarova and Bordonaro 2016). El marcaje de núcleos y del citoesqueleto de actina de los cortes histológicos permitió comprobar las diferencias en la densidad celular entre las muestras mantenidas en estático y las muestras mantenidas a perfusión durante 96 horas. Al comparar la superficie ocupada por los núcleos entre ambos tipos de muestra se observaron cambios estadísticamente significativos siendo superior la superficie ocupada por núcleos en las muestras mantenidas en biorreactor. De igual manera sucede en la superficie ocupada por células vimentina positiva, siendo significativamente mayor en las muestras preservadas a través de perfusión en el biorreactor y verse prácticamente desaparecidas en la muestra en estático. Lo que sugiere que el flujo intersticial generado a través de la perfusión de medio fresco en la muestra ayuda a preservar parte de la heterogeneidad tumoral.

El uso del biorreactor como plataforma para el mantenimiento *ex vivo* de muestras de tumorales permite conservar componentes propios del microambiente tumoral que son

difícilmente reproducibles experimentalmente. Tales como, la composición de la matriz extracelular propia del tumor conservando los cambios asociados al desarrollo de este (Pickup, et al. 2014), arquitectura del tejido, densidad celular y parte de la heterogeneidad celular asociada al tumor. El biorreactor aporta ventajas frente a métodos clásicos de preservación de muestras tumorales al permitir la visualización *in vivo* del tumor por microscopía, así como la recuperación simple de la muestra en un sistema fácilmente escalable y con un volumen muerto muy inferior al de modelos de biorreactor clásicos.

Sin embargo, la elevada dependencia de la naturaleza original de la biopsia, presencia o ausencia de tumor puede condicionar la posible respuesta prospectiva al tener que trabajar en ciego sobre las muestras depositadas en el biorreactor. Lo que requeriría del desarrollo de tecnologías auxiliares que permitieran seleccionar con éxito y homogeneizar las muestras a ser incluidas en el biorreactor con el fin de obtener una respuesta terapéutica prospectiva para la confección de tratamientos personalizados.

CONCLUSIONES

Se diseñó y fabricó con éxito un modelo de biorreactor que permite la perfusión continuada de medio sobre muestras derivadas de cáncer colorrectal, con un volumen muerto de 120 μl gracias a la combinación de canales microfluídicos a una cámara de cultivo en la macroescala.

El biorreactor diseñado permitió la observación de la muestra por microscopía óptica permitiendo seguir la evolución de modelos de tumor desarrollados a partir cultivos macroscópicos 3D a alta densidad de células HCT 116-GFP mantenidos en perfusión durante 96 horas sin observarse pérdida de viabilidad en este espacio de tiempo.

El uso del biorreactor diseñado permitió el mantenimiento de cultivo de muestras derivadas a partir de biopsias de tumores colorrectales por espacio de 96 horas a perfusión permitiendo recuperar las muestras tras su uso para su posterior procesamiento y análisis histológico. Lo que permitiría obtener información clínica relevante de las mismas.

Las muestras derivadas de biopsias de tumores colorrectales mantenidas en el biorreactor *ex vivo* por espacio de 96 horas mantuvieron una densidad celular uniforme a lo largo de la muestra, similar a la mostrada por los controles de tejido tomados a tiempo cero. Sin embargo, las muestras mantenidas en estático presentaron una densidad celular pobre en comparación limitada a las zonas más expuestas al medio de cultivo.

Las diferencias en la distribución de la densidad celular entre las muestras mantenidas en biorreactor y las mantenidas en estáticos sugieren la existencia de dos regímenes de renovación de nutrientes en el interior de las mismas. En el caso de las muestras en estático, la distribución espacial en las zonas más expuestas al medio sugiere un mantenimiento de la misma a través de fenómenos de difusión. En contraste, la

distribución homogénea de la celularidad en las muestras mantenidas por perfusión en el biorreactor sugiere la generación de flujo intersticial a través de la muestra que facilita el acceso de nutrientes a las células situadas en las partes interiores de la muestra.

Las muestras derivadas de biopsias de tumores colorrectales mantenidas en el biorreactor ex vivo por espacio de 96 horas mostraron un área ocupada por núcleos y células vimentina positiva estadísticamente superior a las mantenidas en estático por el mismo espacio de tiempo. Sugiriendo, la preservación de al menos parte de la heterogeneidad tumoral en las muestras preservadas ex vivo en los biorreactores.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La toxicidad superficial del SU-8 parece estar relacionada con la descomposición del fotoiniciador y la presencia de material no polimerizado en la cámara de cultivo. La interacción entre las máscaras y la luz UV empleada en la definición de las microestructuras del microdispositivo introduce una fuente de incertidumbre experimental, limitando el uso del material en aplicaciones que requieran de la adhesión celular a este.

La optimización de las condiciones de fabricación empleando máscaras de pírex en vez de máscaras poliméricas reduce la variabilidad en la adhesión. Incrementando de manera significativa el número de células adheridas, así como reduciendo el tiempo necesario para observarse cambios morfológicos asociados a la adhesión celular al sustrato.

El desarrollo de un encapsulado como elemento auxiliar que permitan la conexión entre la microescala del microdispositivo y la macroescala de un circuito auxiliar de flujo permiten la traducción de escalas y la realización de experimentos a flujo en condiciones controladas.

Es posible mantener monocapas de células endoteliales primarias, HUVEC, a flujo en dispositivos fabricados en SU-8 empleando máscaras de pírex por tiempos de hasta 72h preservando la morfología y la viabilidad celular. En los microdispositivos fabricados con máscaras poliméricas, la integridad de la monocapa comienza a verse comprometida en las primeras horas de perfusión, habiendo desaparecido la monocapa a las 72h.

El uso de ETBs (Flexdym™) permite la fabricación de dispositivos de microfluídica destinados a cultivo celular a través de un proceso rápido, sencillo y económico. Estas ventajas con respecto a otros modelos de fabricación basados en termoplásticos y fotopolímeros permitirían la fabricación a pequeña escala reduciendo de forma considerable el coste, tanto económico como temporal, de generación de nuevos prototipos.

Las capacidades autoadhesivas de los ETBs (Flexdym™) por el simple contacto con otras superficies, sin necesidad de emplear solventes o presión y temperatura, permiten realizar simultáneamente el sellado del microdispositivo y la unión, fluídicamente estanca a rangos de presión fisiológicos, de este a un sistema auxiliar o de medida sin necesidad de elementos internos de sellado.

El uso de un sistema de encapsulado y de los protocolos de manipulación de líquidos y conexión libres de burbujas facilitan al usuario el uso del microdispositivo durante la fase experimental. Reduciendo el riesgo de inserción accidental de burbujas en el microdispositivo y permitiendo el uso de elementos de manipulación de líquidos familiares para el usuario.

El diseño del encapsulado como un conjunto de piezas permite incorporar funcionalidades individuales a las mismas, lo que facilita al usuario la manipulación fluidica en el microdispositivo, la traducción de escalas, preservar la esterilidad del cultivo en este, etc. Sin embargo, la necesidad de conectar los distintos elementos entre sí genera puntos débiles, en cada zona de conexión, que al final restan fiabilidad al conjunto y complican el uso correcto del conjunto al usuario.

El uso combinado del encapsulado/microdispositivo permitió la observación del cambio fenotípico en células del epitelio renal (LLC-PK1) tras la estimulación mecánica debida al paso de flujo consistente con el observado en literatura empleando métodos clásicos. Lo que validaría el uso de esta plataforma como modelo para el estudio del efecto de la tensión de corte sobre el tejido del epitelio renal. Reduciendo el consumo en reactivos y células con respecto a los métodos clásicos y aportando unas condiciones de control difícilmente alcanzable por estos, debido a la definición de las microestructuras internas de los microdispositivos.

Se diseñó con éxito una interfaz de conexión fluidica modular e independiente fluidicamente, compuesta de un puerto de conexión fluidico destinado a alojar un conector fluidico comercial al que se asociaron los elementos necesarios para la integración de los protocolos de conexión y manipulación fluidica desarrollados en el capítulo anterior.

La interfaz diseñada se integró con éxito en distintos modelos de dispositivo microfluidicos, preservando la funcionalidad e independencia fluidica con independencia de la geometría interna de los modelos. Siendo finalmente integrada en un prototipo de dispositivo microfluidico de tres canales independientes fabricado por inyección.

El cierre del microdispositivo de inyección a través de una lámina de Flexdym™ permitió definir de manera independiente la geometría de los tres canales del dispositivo de microfluidos. Soportando la unión entre la lámina de Flexdym y el cuerpo del microdispositivo fabricado por inyección presiones fluidicas de 85 KPa.

La funcionalidad del microdispositivo se vio limitada por la presencia de taras en el cuerpo del microdispositivo fabricado por inyección. Aun así, en los canales microfluidicos no afectados por la tara la interfaz de conexión fluidica integrada en el microdispositivo permitió realizar con éxito todos los pasos experimentales necesarios para el cultivo de células de carcinoma de colon Caco2 en el microdispositivo y la estimulación mecánica de las mismas por el paso de un fluido.

Las células Caco2 fueron cultivadas usando el Flexdym™ como sustrato de cultivo con éxito. En condiciones de cultivo en estático, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a viabilidad y proliferación celular entre las células cultivadas en Flexdym™ y las cultivadas en poliestireno, material considerado estándar para el cultivo celular.

La estimulación mecánica de las células en microdispositivos fabricados con suelo de Flexdym™ permitió observar el crecimiento en altura de la monocapa de células Caco2, siendo 1,78 veces superior al cultivo en Flexdym™ en estático. Siendo este comportamiento similar al reportado en bibliografía para este tipo celular al ser estimulado mecánicamente por el paso de un fluido en otros sustratos de cultivo.

Las anteriores conclusiones apoyan la viabilidad del uso del Flexdym™ como material para la construcción de microdispositivos destinados al cultivo celular a través del uso de una lámina de Flexdym™ que actúe tanto como suelo del microdispositivo, permitiendo el sellado rápido y sencillo de este, como de sustrato de cultivo celular.

Se diseñó y fabricó con éxito un modelo de biorreactor que permite la perfusión continuada de medio sobre muestras derivadas de cáncer colorrectal, con un volumen muerto de 120 μ l gracias a la combinación de canales microfluídicos a una cámara de cultivo en la macroescala.

El biorreactor diseñado permitió la observación de la muestra por microscopía óptica permitiendo seguir la evolución de modelos de tumor desarrollados a partir cultivos macroscópicos 3D a alta densidad de células HCT 116-GFP mantenidos en perfusión durante 96 horas sin observarse pérdida de viabilidad en este espacio de tiempo.

El uso del biorreactor diseñado permitió el mantenimiento de cultivo de muestras derivadas a partir de biopsias de tumores colorrectales por espacio de 96 horas a perfusión permitiendo recuperar las muestras tras su uso para su posterior procesamiento y análisis histológico. Lo que permitiría obtener información clínica relevante de las mismas.

Las muestras derivadas de biopsias de tumores colorrectales mantenidas en el biorreactor *ex vivo* por espacio de 96 horas mantuvieron una densidad celular uniforme a lo largo de la muestra, similar a la mostrada por los controles de tejido tomados a tiempo cero. Sin embargo, las muestras mantenidas en estático presentaron una densidad celular pobre en comparación limitada a las zonas más expuestas al medio de cultivo.

Las diferencias en la distribución de la densidad celular entre las muestras mantenidas en biorreactor y las mantenidas en estáticos sugieren la existencia de dos regímenes de renovación de nutrientes en el interior de las mismas. En el caso de las muestras en estático, la distribución espacial en las zonas más expuestas al medio sugiere un mantenimiento de la misma a través de fenómenos de difusión. En contraste, la distribución homogénea de la celularidad en las muestras mantenidas por perfusión en el biorreactor sugiere la generación de flujo intersticial a través de la muestra que facilita el acceso de nutrientes a las células situadas en las partes interiores de la muestra.

Las muestras derivadas de biopsias de tumores colorrectales mantenidas en el biorreactor *ex vivo* por espacio de 96 horas mostraron un área ocupada por núcleos y células vimentina positiva estadísticamente superior a las mantenidas en estático por el

mismo espacio de tiempo. Sugiriendo, la preservación de al menos parte de la heterogeneidad tumoral en las muestras preservadas ex vivo en los biorreactores.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] "Adhesion of Cells to Polystyrene Surfaces." 1983. *The Journal of Cell Biology* 97 (5). The Rockefeller University Press: 1500–1506.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2112677/>.
- [2] Altuna, Ane, Elisa Bellistri, Elena Cid, Paloma Aivar, Beatriz Gal, Javier Berganzo, Gemma Gabriel, et al. 2013. "SU-8 Based Microprobes for Simultaneous Neural Depth Recording and Drug Delivery in the Brain." *Lab on a Chip* 13 (7): 1422. doi:10.1039/c3lc41364k.
- [3] Amstein, C F, and P A Hartman. 1975. "Adaptation of Plastic Surfaces for Tissue Culture by Glow Discharge." *Journal of Clinical Microbiology* 2 (1): 46–54.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC274124/>.
- [4] Aoun, Laurène, Pierre Weiss, Adrian Laborde, Bernard Ducommun, Valérie Lobjois, and Christophe Vieu. 2014. "Microdevice Arrays of High Aspect Ratio Poly(Dimethylsiloxane) Pillars for the Investigation of Multicellular Tumour Spheroid Mechanical Properties." *Lab Chip* 14 (13): 2344–53. doi:10.1039/C4LC00197D.
- [5] Astashkina, Anna, Brenda Mann, and David W Grainger. 2012. "A Critical Evaluation of in Vitro Cell Culture Models for High-Throughput Drug Screening and Toxicity." *Pharmacology & Therapeutics* 134 (1): 82–106.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.001>.
- [6] Au, Anthony K, Wonjae Lee, and Albert Folch. 2014. "Mail-Order Microfluidics: Evaluation of Stereolithography for the Production of Microfluidic Devices." *Lab on a Chip* 14 (7). The Royal Society of Chemistry: 1294–1301. doi:10.1039/C3LC51360B.
- [7] Ayuso, Jose M, María Virumbrales-Muñoz, Alodia Lacueva, Pilar M Lanuza, Elisa Checa-Chavarria, Pablo Botella, Eduardo Fernández, et al. 2016. "Development and Characterization of a Microfluidic Model of the Tumour Microenvironment." *Scientific Reports* 6 (October). The Author(s): 36086. <http://dx.doi.org/10.1038/srep36086>.
- [8] Ayuso, Jose Maria, Rosa Monge, Guillermo A Llamazares, Marco Moreno, Maria Agirregabiria, Javier Berganzo, Manuel Doblaré, Iñaki Ochoa, and Luis J Fernández. 2015. "SU-8 Based Microdevices to Study Self-Induced Chemotaxis in 3D Microenvironments ." *Frontiers in Materials* . <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmats.2015.00037>.
- [9] Badylak, Stephen F. 2002. "The Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13 (5): 377–83.
doi:<https://doi.org/10.1016/S1084952102000940>.
- [10] Bakmand, Tanya, Ane R. Troels-Smith, Maria Dimaki, Jakob D. Nissen, Karsten B. Andersen, Luigi Sasso, Helle S. Waagepetersen, Jan B. Gramsbergen, and Winnie E. Svendsen. 2015. "Fluidic System for Long-Term in Vitro Culturing and Monitoring of Organotypic Brain Slices." *Biomedical Microdevices* 17 (4): 1–7. doi:10.1007/s10544-015-9973-6.
- [11] Baptista, Pedro M., Mohummad M. Siddiqui, Genevieve Lozier, Sergio R. Rodriguez, Anthony Atala, and Shay Soker. 2011. "The Use of Whole Organ Decellularization for the Generation of a Vascularized Liver Organoid." *Hepatology* 53 (2): 604–17.
doi:10.1002/hep.24067.
- [12] Beebe, David J., Glennys A. Mensing, and Glenn M. Walker. 2002. "Physics and Applications of Microfluidics in Biology." *Annual Review of Biomedical Engineering* 4 (1): 261–86. doi:10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916.
- [13] Bertotti, Andrea, Giorgia Migliardi, Francesco Galimi, Francesco Sassi, Davide Torti,

- Claudio Isella, Davide Corà, et al. 2011. "A Molecularly Annotated Platform of Patient-Derived Xenografts ('xenopatients') Identifies HER2 as an Effective Therapeutic Target in Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer." *Cancer Discovery* 1 (6): 508–23. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0109.
- [14] Billiet, Thomas, Mieke Vandenhaute, Jorg Schelfhout, Sandra Van Vlierberghe, and Peter Dubruel. 2012. "A Review of Trends and Limitations in Hydrogel-Rapid Prototyping for Tissue Engineering." *Biomaterials* 33 (26): 6020–41. doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.050.
- [15] Boeck, Marlies De, Micheline Kirsch-Volders, and Dominique Lison. 2003. "Cobalt and Antimony: Genotoxicity and Carcinogenicity." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533 (1–2): 135–52. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.07.012.
- [16] Boj, Sylvia F., Chang Il Hwang, Lindsey A. Baker, Iok In Christine Chio, Dannielle D. Engle, Vincenzo Corbo, Myrthe Jager, et al. 2015. "Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer." *Cell* 160 (1–2): 324–38. doi:10.1016/j.cell.2014.12.021.
- [17] Bonvalet, J. P., and C. de Rouffignac. 1981. "Distribution of Ferrocyanide along the Proximal Tubular Lumen of the Rat Kidney: Its Implications upon Hydrodynamics." *The Journal of Physiology* 318 (1): 85–98. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013852.
- [18] Borysiak, Mark D, Kevin S Bielawski, Nathan J Sniadecki, Colin F Jenkel, Bryan D Vogt, and Jonathan D Posner. 2013. "Simple Replica Micromolding of Biocompatible Styrenic Elastomers." *Lab on a Chip* 13 (14): 2773–84. doi:10.1039/c3lc50426c.
- [19] Calabrese, Giovanna, Raffaella Giuffrida, Claudia Fabbi, Elisa Figallo, Debora Lo Furno, Rosario Gulino, Cristina Colarossi, et al. 2016. "Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro." *PLOS ONE* 11 (3). Public Library of Science: e0151181. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151181.
- [20] Carranza-Torres, Irma Edith, Nancy Elena Guzmán-Delgado, Consuelo Coronado-Martínez, José Inocente Bañuelos-García, Ezequiel Viveros-Valdez, Javier Morán-Martínez, and Pilar Carranza-Rosales. 2015. "Organotypic Culture of Breast Tumor Explants as a Multicellular System for the Screening of Natural Compounds with Antineoplastic Potential." *BioMed Research International* 2015. doi:10.1155/2015/618021.
- [21] Cattaneo, I, L Condorelli, A R Terrinoni, L Antiga, F Sangalli, and A Remuzzi. 2011. "Shear Stress Reverses Dome Formation in Confluent Renal Tubular Cells." *Cellular Physiology and Biochemistry* 28 (4): 673–82. https://www.karger.com/DOI/10.1159/000335813.
- [22] Chi, Meiyang, Banya Yi, Seunghan Oh, Dong June Park, Jong Hwan Sung, and Sungsu Park. 2015. "A Microfluidic Cell Culture Device (MFCCD) to Culture Epithelial Cells with Physiological and Morphological Properties That Mimic Those of the Human Intestine." *Biomedical Microdevices* 17 (3): 1–10. doi:10.1007/s10544-015-9966-5.
- [23] Cui, X., Y. Hartanto, and H. Zhang. 2017. "Advances in Multicellular Spheroids Formation." *Journal of The Royal Society Interface* 14 (127): 20160877. doi:10.1098/rsif.2016.0877.
- [24] Cukierman, Edna, Roumen Pankov, and Kenneth M Yamada. 2002. "Cell Interactions with Three-Dimensional Matrices." *Current Opinion in Cell Biology* 14 (5): 633–40. doi:https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00364-2.
- [25] Davis, Jaeger, Steve P. Crampton, and Christopher C.W. Hughes. 2007. "Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)." *Journal of Visualized Experiments*, no.

3: 2007. doi:10.3791/183.

- [26] Deng, Tao, Hongkai Wu, Scott T. Brittain, and George M. Whitesides. 2000. "Prototyping of Masks, Masters, and Stamps/Molds for Soft Lithography Using an Office Printer and Photographic Reduction." *Analytical Chemistry* 72 (14): 3176–80. doi:10.1021/ac991343m.
- [27] Derose, Yoko S., Guoying Wang, Yi Chun Lin, Philip S. Bernard, Sandra S. Buys, Mark T.W. Ebbert, Rachel Factor, et al. 2011. "Tumor Grafts Derived from Women with Breast Cancer Authentically Reflect Tumor Pathology, Growth, Metastasis and Disease Outcomes." *Nature Medicine* 17 (11). Nature Publishing Group: 1514–20. doi:10.1038/nm.2454.
- [29] Dich, John, and Niels Grunnet. 1992. "A Perifusion System for Cultured Hepatocytes." *Analytical Biochemistry* 206 (1): 68–72. doi:https://doi.org/10.1016/S0003-2697(05)80012-0.
- [30] Duan, Yi, Nanami Gotoh, Qingshang Yan, Zhaopeng Du, Alan M Weinstein, Tong Wang, and Sheldon Weinbaum. 2008. "Shear-Induced Reorganization of Renal Proximal Tubule Cell Actin Cytoskeleton and Apical Junctional Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (32). National Academy of Sciences: 11418–23. doi:10.1073/pnas.0804954105.
- [31] Dulbecco, R, M Vogt, and Published February. 1954. "POLIOMYELITIS VIRUSES * Preparation of Tissue Cultures." *The Journal of Experimental Medicine* 99 (2): 167–82. doi:10.1084/jem.99.2.167.
- [32] Duncombe, Todd A., Augusto M. Tentori, and Amy E. Herr. 2015. "Microfluidics: Reframing Biological Enquiry." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (9). Nature Publishing Group: 554–67. doi:10.1038/nrm4041.
- [33] Dunn, James C Y, Ronald G Tompkins, and Martin L Yarmush. 2002. "Hepatocytes in Collagen Sandwich :Evidencefor Transcriptional and Translational Regulation." *The Journal of Cell Biology* 116 (4). The Rockefeller University Press: 1–11. file:///Users/ronaldfaris/Dropbox/Faris master Library (3-8-2014)/Hepatocytes in Collagen Sandwich - Evidence%5Crfor Transcriptional and Translational Regulation.pdf%5Cnpapers3://publication/uuid/A4DC0EF8-8BC1-44AF-BF61-591872D0E233.
- [34] Duval, Kayla, Hannah Grover, Li-Hsin Han, Yongchao Mou, Adrian F. Pegoraro, Jeffery Fredberg, and Zi Chen. 2017a. "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture." *Physiology* 32 (4): 266–77. doi:10.1152/physiol.00036.2016.
- [35] Earle, Wilton R., Edward L. Schilling, Thomas H. Stark, Nancy P. Straus, Mary F. Brown, and Emma Shelton. 1943. "Production of Malignancy in Vitro. Iv. the Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells." *Journal of the National Cancer Institute* 4 (2): 165–212. doi:10.1093/jnci/4.2.165.
- [36] Edmondson, Rasheena, Jessica Jenkins Broglie, Audrey F. Adcock, and Liju Yang. 2014. "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors." *ASSAY and Drug Development Technologies* 12 (4): 207–18. doi:10.1089/adt.2014.573.
- [37] El-Ali, Jamil, Peter K. Sorger, and Klavs F. Jensen. 2006. "Cells on Chips." *Nature* 442 (7101): 403–11. doi:10.1038/nature05063.

- [38] Elfaki, Yassin, Khalid A Enan, Isam M Elkhidir, and Abdelbagi M Nagi. 2017. "Molecular Detection of Hepatitis B Virus DNA in Human Immunodeficiency Virus Infected Patients in Khartoum , Sudan." *Ol Ci Molecular Biology* 6 (1): 10–13. doi:10.4172/2168-9547.
- [39] Engler, Adam J., Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. 2006. "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." *Cell* 126 (4): 677–89. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [40] Essig, Marie, Fabiola Terzi, Martine Burtin, and Gerard Friedlander. 2001. "Mechanical Strains Induced by Tubular Flow Affect the Phenotype of Proximal Tubular Cells." *Am J Physiol Renal Physiol* 281 (4): F751-762. doi:10.1152/ajprenal.2001.281.4.F751.
- [41] Ezkerra, Aitor, Luis José Fernández, Kepa Mayora, and Jesús Miguel Ruano-López. 2011. "A Microvalve for Lab-on-a-Chip Applications Based on Electrochemically Actuated SU8 Cantilevers." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 155 (2). Elsevier B.V.: 505–11. doi:10.1016/j.snb.2010.12.054.
- [42] Fang, F., S. M. Wasserman, J. Torres-Vazquez, B. Weinstein, F. Cao, Z. Li, K. D. Wilson, et al. 2014. "The Role of Hath6, a Newly Identified Shear-Stress-Responsive Transcription Factor, in Endothelial Cell Differentiation and Function." *Journal of Cell Science* 127 (7): 1428–40. doi:10.1242/jcs.136358.
- [43] Farris, Ashley L., Alexandra N. Rindone, and Warren L. Grayson. 2016. "Oxygen Delivering Biomaterials for Tissue Engineering." *J. Mater. Chem. B* 4 (20): 3422–32. doi:10.1039/C5TB02635K.
- [44] Fernández, Luis J., Ane Altuna, Maria Tijero, Gemma Gabriel, Rosa Villa, Manuel J. Rodríguez, Montse Batlle, Roman Vilares, Javier Berganzo, and F. J. Blanco. 2009. "Study of Functional Viability of SU-8-Based Microneedles for Neural Applications." *Journal of Micromechanics and Microengineering* 19 (2). doi:10.1088/0960-1317/19/2/025007.
- [45] Figeys, Daniel, Yuebin Ning, and Ruedi Aebersold. 1997. "A Microfabricated Device for Rapid Protein Identification by Microelectrospray Ion Trap Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 69 (16). American Chemical Society: 3153–60. doi:10.1021/ac970057c.
- [46] Fredrickson, Carl K, and Z Hugh Fan. 2004. "Macro-to-Micro Interfaces for Microfluidic Devices." *Lab on a Chip* 4 (6). The Royal Society of Chemistry: 526–33. doi:10.1039/B410720A.
- [47] Friedrich, C. 2006. "Podocytes Are Sensitive to Fluid Shear Stress in Vitro." *AJP: Renal Physiology* 291 (4): F856–65. doi:10.1152/ajprenal.00196.2005.
- [48] Gebel, T. 1997. "Arsenic and Antimony: Comparative Approach on Mechanistic Toxicology." *Chemico-Biological Interactions* 107 (3): 131–44. doi:10.1016/S0009-2797(97)00087-2.
- [49] Gilpin, Anna, and Yong Yang. 2017. "Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications." *BioMed Research International* 2017 (April). Hindawi: 9831534. doi:10.1155/2017/9831534.
- [50] Gumuscu, Burcu, Hugo J. Albers, Albert Van Den Berg, Jan C.T. Eijkel, and Andries D. Van Der Meer. 2017. "Compartmentalized 3D Tissue Culture Arrays under Controlled Microfluidic Delivery." *Scientific Reports* 7 (1). Springer US: 1–9. doi:10.1038/s41598-017-01944-5.
- [51] Hassell, Bryan A, Girija Goyal, Esak Lee, Alexandra Sontheimer-Phelps, Oren Levy,

- Christopher S Chen, and Donald E Ingber. 2018. "Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro." *Cell Reports* 21 (2). Elsevier: 508–16. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.043.
- [52] Hidalgo, Ismael J., Thomas J. Raub, and Ronald T Borchardt. 2011. "Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability." *The AAPS Journal* 13 (3): 323–27. doi:10.1208/s12248-011-9283-8.
- [53] Holton, Angela Babetski, Francly L. Sinatra, Jenny Krehling, Amy J. Conway, David A. Landis, and Soner Altioek. 2017. "Microfluidic Biopsy Trapping Device for the Real-Time Monitoring of Tumor Microenvironment." *PLoS ONE* 12 (1): 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0169797.
- [54] Hribar, Kolin C., Kyle Meggs, Justin Liu, Wei Zhu, Xin Qu, and Shaochen Chen. 2015. "Three-Dimensional Direct Cell Patterning in Collagen Hydrogels with near-Infrared Femtosecond Laser." *Scientific Reports* 5 (November). Nature Publishing Group: 1–7. doi:10.1038/srep17203.
- [55] Huang, Carlos P., Jente Lu, Hyeryung Seon, Abraham P. Lee, Lisa A. Flanagan, Ho-Young Kim, Andrew J. Putnam, and Noo Li Jeon. 2009. "Engineering Microscale Cellular Niches for Three-Dimensional Multicellular Co-Cultures." *Lab on a Chip* 9 (12): 1740. doi:10.1039/b818401a.
- [56] Huh, Dongeun, Geraldine A Hamilton, and Donald E Ingber. 2011a. "From 3D Cell Culture to Organs-on-Chips." *Trends in Cell Biology* 21 (12): 745–54. doi:https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005.
- [57] Huh, Dongeun, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martin Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin, and Donald E. Ingber. 2010. "Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip." *Science* 328 (5986): 1662–68. doi:10.1126/science.1188302.
- [58] Hung, Paul J, Philip J Lee, Poorya Sabounchi, Nima Aghdam, Robert Lin, and Luke P Lee. 2005. "A Novel High Aspect Ratio Microfluidic Design to Provide a Stable and Uniform Microenvironment for Cell Growth in a High Throughput Mammalian Cell Culture Array." *Lab on a Chip* 5 (1). The Royal Society of Chemistry: 44–48. doi:10.1039/B410743H.
- [59] Jang, Kyung-Jin, Hye Sung Cho, Do Hyun Kang, Won Gyu Bae, Tae-Hwan Kwon, and Kahp-Yang Suh. 2011. "Fluid-Shear-Stress-Induced Translocation of Aquaporin-2 and Reorganization of Actin Cytoskeleton in Renal Tubular Epithelial Cells." *Integrative Biology* 3 (2). The Royal Society of Chemistry: 134–41. doi:10.1039/C0IB00018C.
- [60] Jang, Kyung-Jin, Ali Poyan Mehr, Geraldine A Hamilton, Lori A McPartlin, Seyoon Chung, Kahp-Yang Suh, and Donald E Ingber. 2013. "Human Kidney Proximal Tubule-on-a-Chip for Drug Transport and Nephrotoxicity Assessment." *Integrative Biology* 5 (9). The Royal Society of Chemistry: 1119–29. doi:10.1039/C3IB40049B.
- [61] Jang, Kyung-Jin, and Kahp-Yang Suh. 2010. "A Multi-Layer Microfluidic Device for Efficient Culture and Analysis of Renal Tubular Cells." *Lab on a Chip* 10 (1). The Royal Society of Chemistry: 36–42. doi:10.1039/B907515A.
- [62] Janmey, Paul A, and Christopher A McCulloch. 2007. "Cell Mechanics: Integrating Cell Responses to Mechanical Stimuli." *Annual Review of Biomedical Engineering* 9 (1). Annual Reviews: 1–34. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151927.
- [63] Jaroch, Karol, Alina Jaroch, and Barbara Bojko. 2018. "Cell Cultures in Drug Discovery and Development: The Need of Reliable in Vitro-in Vivo Extrapolation for Pharmacodynamics

- and Pharmacokinetics Assessment." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147: 297–312. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.023>.
- [64] Jokinen, Ville, Pia Suvanto, and Sami Franssila. 2012. "Oxygen and Nitrogen Plasma Hydrophilization and Hydrophobic Recovery of Polymers." *Biomicrofluidics* 6 (1). American Institute of Physics: 16501–10. doi:10.1063/1.3673251.
- [65] Kang, Myeongwoo, Jae Hwan Byun, Sangcheol Na, and Noo Li Jeon. 2017. "Fabrication of Functional 3D Multi-Level Microstructures on Transparent Substrates by One Step Back-Side UV Photolithography." *RSC Advances* 7 (22). Royal Society of Chemistry: 13353–61. doi:10.1039/C6RA28812J.
- [66] Katt, Moriah E., Amanda L. Placone, Andrew D. Wong, Zinnia S. Xu, and Peter C. Searson. 2016. "In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 4 (February). doi:10.3389/fbioe.2016.00012.
- [67] Khademhosseini, Ali, Robert Langer, Jeffrey Borenstein, and Joseph P Vacanti. 2006. "Microscale Technologies for Tissue Engineering and Biology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2480 LP-2487. <http://www.pnas.org/content/103/8/2480.abstract>.
- [68] Kim, Hyun Jung, Dongeun Huh, Geraldine Hamilton, and Donald E. Ingber. 2012. "Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-like Motions and Flow." *Lab on a Chip* 12 (12): 2165. doi:10.1039/c2lc40074j.
- [69] Kim, Hyun Jung, and Donald E. Ingber. 2013. "Gut-on-a-Chip Microenvironment Induces Human Intestinal Cells to Undergo Villus Differentiation." *Integrative Biology* 5 (9): 1130. doi:10.1039/c3ib40126j.
- [70] Kim, Sudong, Hyunjae Lee, Minhwan Chung, and Noo Li Jeon. 2013. "Engineering of Functional, Perfusable 3D Microvascular Networks on a Chip." *Lab on a Chip* 13 (8): 1489. doi:10.1039/c3lc41320a.
- [71] Kim, Sun Wook, Jonathan Ehrman, Mok-Ryeon Ahn, Jumpei Kondo, Andrea A. Mancheno Lopez, Yun Sik Oh, Xander H. Kim, et al. 2017. "Shear Stress Induces Noncanonical Autophagy in Intestinal Epithelial Monolayers." *Molecular Biology of the Cell* 28 (22): 3043–56. doi:10.1091/mbc.E17-01-0021.
- [72] Kleinman, Hynda K, and George R Martin. 2005. "Matrigel: Basement Membrane Matrix with Biological Activity." *Seminars in Cancer Biology* 15 (5): 378–86. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>.
- [73] Kruse Jr., Paul F. 1972. "2 - USE OF PERFUSION SYSTEMS FOR GROWTH OF CELL AND TISSUE CULTURES BT - Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture." In , 11–66. Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-598302-0.50008-9>.
- [74] Lachaux, Julie, Clara Alcaine, Blanca Gomez-Escoda, Cecile M Perrault, David Olea Duplan, Pei-Yun Jenny Wu, Inaki Ochoa, et al. 2017. "Thermoplastic Elastomer with Advanced Hydrophilization and Bonding Performances for Rapid (30 s) and Easy Molding of Microfluidic Devices." *Lab Chip* 17 (15). The Royal Society of Chemistry: 2581–94. doi:10.1039/C7LC00488E.
- [75] Lake, Melinda, Melinda Lake, Cody Narciso, Kyle Cowdrick, Thomas Storey, Siyuan Zhang, Jeremiah Zartman, and David Hoelzle. 2015. "Microfluidic Device Design, Fabrication, and Testing Protocols." *Protocol Exchange*, no. July: 1–26. doi:10.1038/protex.2015.069.

- [76] Lazarova, Darina L., and Michael Bordonaro. 2016. "Vimentin, Colon Cancer Progression and Resistance to Butyrate and Other HDACis." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20 (6): 989–93. doi:10.1111/jcmm.12850.
- [77] LeCluyse, E L, K L Audus, and J H Hochman. 1994. "Formation of Extensive Canalicular Networks by Rat Hepatocytes Cultured in Collagen-Sandwich Configuration." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 266 (6). American Physiological Society: C1764–74. doi:10.1152/ajpcell.1994.266.6.C1764.
- [78] Lee, Philip J, Paul J Hung, and Luke P Lee. 2007. "An Artificial Liver Sinusoid with a Microfluidic Endothelial-like Barrier for Primary Hepatocyte Culture." *Biotechnology and Bioengineering* 97 (5). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 1340–46. doi:10.1002/bit.21360.
- [79] Lerman, Max J, Josephine Lembong, Shin Muramoto, Greg Gillen, and John P Fisher. 2018. "The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material." *Tissue Engineering Part B: Reviews*, April. Mary Ann Liebert, Inc., publishers. doi:10.1089/ten.TEB.2018.0056.
- [80] Lichtenberg, Artur, Goekhan Dumlu, Thorsten Walles, Michael Maringka, Stefanie Ringes-Lichtenberg, Arjang Ruhparwar, Heike Mertsching, and Axel Haverich. 2005. "A Multifunctional Bioreactor for Three-Dimensional Cell (Co)-Culture." *Biomaterials* 26 (5): 555–62. doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.063.
- [81] Lochovsky, Conrad, Sanjesh Yasotharan, and Axel Gunther. 2012. "Bubbles No More: In-Plane Trapping and Removal of Bubbles in Microfluidic Devices." *Lab on a Chip* 12 (3). The Royal Society of Chemistry: 595–601. doi:10.1039/C1LC20817A.
- [82] Ma, Huipeng, Tingjiao Liu, Jianhua Qin, and Bingcheng Lin. 2010. "Characterization of the Interaction between Fibroblasts and Tumor Cells on a Microfluidic Co-Culture Device." *Electrophoresis* 31 (10): 1599–1605. doi:10.1002/elps.200900776.
- [83] Mair, Dieudonne A., Emil Geiger, Albert P. Pisano, Jean M. J. Fréchet, and Frantisek Svec. 2006. "Injection Molded Microfluidic Chips Featuring Integrated Interconnects." *Lab Chip* 6 (10): 1346–54. doi:10.1039/B605911B.
- [84] Maria, Bokhari, Carnachan Ross J., Cameron Neil R., and Przyborski Stefan A. 2007. "Culture of HepG2 Liver Cells on Three Dimensional Polystyrene Scaffolds Enhances Cell Structure and Function during Toxicological Challenge." *Journal of Anatomy* 211 (4). Wiley/Blackwell (10.1111): 567–76. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00778.x.
- [85] Martinez-Duarte, Rodrigo, and Marc Madou. 2011. "SU-8 Photolithography and Its Impact on Microfluidics." *Microfluidics and Nanofluidics Handbook*, no. 2006: 231–68. doi:10.1201/b11188-11.
- [86] McCain, M. L., H. Lee, Y. Aratyn-Schaus, A. G. Kleber, and K. K. Parker. 2012. "Cooperative Coupling of Cell-Matrix and Cell-Cell Adhesions in Cardiac Muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (25): 9881–86. doi:10.1073/pnas.1203007109.
- [87] Meer, A D van der, A A Poot, J Feijen, and I Vermes. 2010. "Analyzing Shear Stress-Induced Alignment of Actin Filaments in Endothelial Cells with a Microfluidic Assay." *Biomicrofluidics* 4 (1). American Institute of Physics: 11103. doi:10.1063/1.3366720.
- [88] Meer, B. J. van, H. de Vries, K. S.A. Firth, J. van Weerd, L. G.J. Tertoolen, H. B.J. Karperien, P. Jonkheijm, C. Denning, A. P. IJzerman, and C. L. Mummery. 2017. "Small Molecule Absorption by PDMS in the Context of Drug Response Bioassays." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (2). Elsevier Ltd: 323–28.

doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.062.

- [89] Mehta, Geeta, Jay Lee, Wansik Cha, Yi-Chung Tung, Jennifer J. Linderman, and Shuichi Takayama. 2009. "Hard Top Soft Bottom Microfluidic Devices for Cell Culture and Chemical Analysis." *Analytical Chemistry* 81 (10): 3714–22. doi:10.1021/ac802178u.
- [90] Meijer, Titia G, Kishan At Naipal, Agnes Jager, and Dik C van Gent. 2017. "Ex Vivo Tumor Culture Systems for Functional Drug Testing and Therapy Response Prediction." *Future Science OA* 3 (2): FSO190. doi:10.4155/fsoa-2017-0003.
- [91] Merkel, T C, V I Bondar, K Nagai, B D Freeman, and I Pinnau. 2000. "Gas Sorption, Diffusion, and Permeation in Poly(Dimethylsiloxane)." *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 38 (3). John Wiley & Sons, Inc.: 415–34. doi:10.1002/(SICI)1099-0488(20000201)38:3<415::AID-POLB8>3.0.CO;2-Z.
- [92] Mlecnik, Bernhard, Gabriela Bindea, Amos Kirilovsky, Helen K. Angell, Anna C. Obenauf, Marie Tosolini, Sarah E. Church, et al. 2016. "The Tumor Microenvironment and Immunoscore Are Critical Determinants of Dissemination to Distant Metastasis." *Science Translational Medicine* 8 (327). doi:10.1126/scitranslmed.aad6352.
- [93] Mohme, Malte, Sabine Riethdorf, and Klaus Pantel. 2017. "Circulating and Disseminated Tumour Cells-Mechanisms of Immune Surveillance and Escape." *Nature Reviews Clinical Oncology* 14 (3). Nature Publishing Group: 155–67. doi:10.1038/nrclinonc.2016.144.
- [94] Moore, Thomas, Peter M Brodersen, and Edmond W.K. Young. 2017. "Multiple Myeloma Cell Drug Responses Differ in Thermoplastic vs. PDMS Microfluidic Devices." *Analytical Chemistry*, acs.analchem.7b02351. doi:10.1021/acs.analchem.7b02351.
- [95] Morigi, M, C Zoja, M Figliuzzi, M Foppolo, G Micheletti, M Bontempelli, M Saronni, G Remuzzi, and A Remuzzi. 1995. "Fluid Shear Stress Modulates Surface Expression of Adhesion Molecules by Endothelial Cells." *Blood* 85 (7): 1696 LP-1703. <http://www.bloodjournal.org/content/85/7/1696.abstract>.
- [96] Mukhopadhyay, Rajendrani. 2007. "When PDMS Isn't the Best." *Analytical Chemistry* 79 (9): 3248–53. doi:10.1021/ac071903e.
- [97] Muz, Barbara, Pilar de la Puente, Feda Azab, and Abdel Kareem Azab. 2015. "The Role of Hypoxia in Cancer Progression Angiogenesis Metastasis and Resistane to Therapy." *Hypoxia* 3: 83–92. doi:http://dx.doi.org/10.2147/HP.S93413.
- [98] Naipal, Kishan A.T., Nicole S. Verkaik, Humberto Sánchez, Carolien H.M. van Deurzen, Michael A. den Bakker, Jan H.J. Hoeijmakers, Roland Kanaar, Maaïke P.G. Vreeswijk, Agnes Jager, and Dik C. van Gent. 2016. "Tumor Slice Culture System to Assess Drug Response of Primary Breast Cancer." *BMC Cancer* 16 (1). BMC Cancer: 1–13. doi:10.1186/s12885-016-2119-2.
- [99] Nemani, Krishnamurthy V., Karen L. Moodie, Jeoffry B. Brennick, Alison Su, and Barjor Gimi. 2013. "In Vitro and in Vivo Evaluation of SU-8 Biocompatibility." *Materials Science and Engineering C* 33 (7). Elsevier B.V.: 4453–59. doi:10.1016/j.msec.2013.07.001.
- [100] Neumann, Christiane, Elisabeth Wilhelm, Thomas Duttenhofer, Leonardo Pires, and Bastian E. Rapp. 2014. "A Chemically Inert Multichannel Chip-to-World Interface to Connect Microfluidic Chips" 8976: 89760E. doi:10.1117/12.2044660.
- [101] Nii, Michelle, Janice H. Lai, Michael Keeney, Li Hsin Han, Anthony Behn, Galym Imanbayev, and Fan Yang. 2013. "The Effects of Interactive Mechanical and Biochemical Niche Signaling on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells Using

- Combinatorial Hydrogels." *Acta Biomaterialia* 9 (3). Acta Materialia Inc.: 5475–83. doi:10.1016/j.actbio.2012.11.002.
- [102] O'Brien, Fergal J. 2011. "Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering." *Materials Today* 14 (3): 88–95. doi:https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [103] Ogonczyk, D, J Wegrzyn, P Jankowski, B Dabrowski, and P Garstecki. 2010. "Bonding of Microfluidic Devices Fabricated in Polycarbonate." *Lab on a Chip* 10 (10). The Royal Society of Chemistry: 1324–27. doi:10.1039/B924439E.
- [104] Oh, Kwang W, Chinsung Park, Kak Namkoong, Jintae Kim, Kyeong-Sik Ock, Suhyeon Kim, Young-A Kim, Yoon-Kyoung Cho, and Christopher Ko. 2005. "World-to-Chip Microfluidic Interface with Built-in Valves for Multichamber Chip-Based PCR Assays." *Lab on a Chip* 5 (8). The Royal Society of Chemistry: 845–50. doi:10.1039/B503437J.
- [105] Orcheston-Findlay, Louise, Azadeh Hashemi, Ashley Garrill, and Volker Nock. 2018. "A Microfluidic Gradient Generator to Simulate the Oxygen Microenvironment in Cancer Cell Culture." *Microelectronic Engineering* 195 (October 2017). Elsevier: 107–13. doi:10.1016/j.mee.2018.04.011.
- [106] Palma, Michele De, Daniela Biziato, and Tatiana V. Petrova. 2017. "Microenvironmental Regulation of Tumour Angiogenesis." *Nature Reviews Cancer* 17 (8). Nature Publishing Group: 457–74. doi:10.1038/nrc.2017.51.
- [107] Palsson, Bernhard, and Sangeeta Bhatia. 2004. *Tissue Engineering*. Upper Saddle River, N.J. : Pearson Prentice Hall.
- [108] Pampaloni, Francesco, Emmanuel G Reynaud, and Ernst H K Stelzer. 2007. "The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (October). Nature Publishing Group: 839. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2236>.
- [109] Patrino, Natasha, Jessica Mary McLachlan, Sarah Nicole Faria, Jayna Chan, and Peter R. Norton. 2007. "A Novel Metal-Protected Plasma Treatment for the Robust Bonding of Polydimethylsiloxane." *Lab on a Chip* 7 (12): 1813. doi:10.1039/b709761a.
- [110] Perdignes, Francisco, Carmen Aracil, José M. Moreno, Antonio Luque, and José M. Quero. 2014. "Highly Integrable Pressurized Microvalve for Portable SU-8 Microfluidic Platforms." *Journal of Microelectromechanical Systems* 23 (2): 398–405. doi:10.1109/JMEMS.2013.2276934.
- [111] Pereira, Rúben F, Cristina C Barrias, Paulo J Bártolo, and Pedro L Granja. 2018. "Cell-Instructive Pectin Hydrogels Crosslinked via Thiol-Norbornene Photo-Click Chemistry for Skin Tissue Engineering." *Acta Biomaterialia* 66: 282–93. doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.016.
- [112] Petersen, O W, L Rønnev-Jessen, A R Howlett, and M J Bissell. 1992. "Interaction with Basement Membrane Serves to Rapidly Distinguish Growth and Differentiation Pattern of Normal and Malignant Human Breast Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (19): 9064 LP-9068. <http://www.pnas.org/content/89/19/9064.abstract>.
- [113] Pickup, M. W., J. K. Mouw, and V. M. Weaver. 2014. "The Extracellular Matrix Modulates the Hallmarks of Cancer." *EMBO Reports* 15 (12): 1243–53. doi:10.15252/embr.201439246.
- [114] Piruska, Aigars, Irena Nikcevic, Se Hwan Lee, Chong Ahn, William R. Heineman, Patrick A.

- Limbach, and Carl J. Seliskar. 2005. "The Autofluorescence of Plastic Materials and Chips Measured under Laser Irradiation." *Lab on a Chip* 5 (12): 1348. doi:10.1039/b508288a.
- [115] Prodanov, Ljupcho, Rohit Jindal, Shyam Sundhar Bale, Manjunath Hegde, William J McCarty, Inna Golberg, Abhinav Bhushan, Martin L Yarmush, and O Berk Usta. 2016. "Long Term Maintenance of a Microfluidic 3-D Human Liver Sinusoid." *Biotechnology and Bioengineering* 113 (1): 241–46. doi:10.1002/bit.25700.
- [116] Puck, T T, and H W Fisher. 1956. "GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS." *The Journal of Experimental Medicine* 104 (3): 427 LP-434. <http://jem.rupress.org/content/104/3/427.abstract>.
- [117] Rapp, Bastian E. 2017. "Chapter 1 - Introduction BT - Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics." In *Micro and Nano Technologies*, 3–7. Oxford: Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3141-1.50001-0>.
- [118] Raya-Rivera, Atlántida M, Diego Esquiliano, Reyna Fierro-Pastrana, Esther López-Bayghen, Pedro Valencia, Ricardo Ordorica-Flores, Shay Soker, James J Yoo, and Anthony Atala. 2014. "Tissue-Engineered Autologous Vaginal Organs in Patients: A Pilot Cohort Study." *The Lancet* 384 (9940): 329–36. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60542-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60542-0).
- [119] Reisher, S R, T E Hughes, J M Ordovas, E J Schaefer, and S I Feinstein. 1993. "Increased Expression of Apolipoprotein Genes Accompanies Differentiation in the Intestinal Cell Line Caco-2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (12): 5757–61. doi:10.1073/pnas.90.12.5757.
- [120] Roskelley, Calvin D, Anabella Srebrow, and Mina J Bissell. 1995. "A Hierarchy of ECM-Mediated Signalling Regulates Tissue-Specific Gene Expression." *Current Opinion in Cell Biology* 7 (5): 736–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933201/>.
- [121] Roybal, Kole T. 2018. "Refining Cell Therapy." *Science* 359 (6380): 1112 LP-1113. <http://science.sciencemag.org/content/359/6380/1112.abstract>.
- [122] Rubin, Shawn. 2011. "The Future Is Now." *Journal of Humanistic Psychology* 51 (4): 432–35.
- [123] Sackmann, Eric K, Anna L Fulton, and David J Beebe. 2014. "The Present and Future Role of Microfluidics in Biomedical Research." *Nature* 507 (March). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 181. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13118>.
- [125] Sakolish, Courtney M., and Gretchen J. Mahler. 2017. "A Novel Microfluidic Device to Model the Human Proximal Tubule and Glomerulus." *RSC Adv.* 7 (8). Royal Society of Chemistry: 4216–25. doi:10.1039/C6RA25641D.
- [126] Sato, Toshiro, Daniel E. Stange, Marc Ferrante, Robert G J Vries, Johan H. Van Es, Stieneke Van Den Brink, Winan J. Van Houdt, et al. 2011. "Long-Term Expansion of Epithelial Organoids from Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium." *Gastroenterology* 141 (5). Elsevier Inc.: 1762–72. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.050.
- [127] Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis." *Nat Meth* 9 (7). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 676–82.

<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

- [128] Schmeichel, Karen L, Valerie M Weaver, and Mina J Bissell. 1998. "Structural Cues from the Tissue Microenvironment Are Essential Determinants of the Human Mammary Epithelial Cell Phenotype." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3 (2): 201–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933208/>.
- [129] Schmid, H., and B. Michel. 2000. "Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography." *Macromolecules* 33 (8): 3042–49. doi:10.1021/ma982034l.
- [130] Shamloo, Amir, Ning Ma, Mu-ming Poo, Lydia L Sohn, and Sarah C Heilshorn. 2008. "Endothelial Cell Polarization and Chemotaxis in a Microfluidic Device." *Lab on a Chip* 8 (8). The Royal Society of Chemistry: 1292–99. doi:10.1039/B719788H.
- [131] Shim, Kyu-Young, Dongwook Lee, Jeonghun Han, Nam-Trung Nguyen, Sungsu Park, and Jong Hwan Sung. 2017. "Microfluidic Gut-on-a-Chip with Three-Dimensional Villi Structure." *Biomedical Microdevices* 19 (2): 37. doi:10.1007/s10544-017-0179-y.
- [132] Sikanen, Tiina, Santeri Tuomikoski, Raimo A Ketola, Risto Kostianen, Sami Franssila, and Tapio Kotiaho. 2005. "Characterization of SU-8 for Electrokinetic Microfluidic Applications." *Lab on a Chip* 5 (8). The Royal Society of Chemistry: 888–96. doi:10.1039/B503016A.
- [133] Skelley, Alison M, and Joel Voldman. 2008. "An Active Bubble Trap and Debubbler for Microfluidic Systems." *Lab on a Chip* 8 (10). The Royal Society of Chemistry: 1733–37. doi:10.1039/B807037G.
- [134] Song, Jonathan W, and Lance L Munn. 2011a. "Fluid Forces Control Endothelial Sprouting." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (37): 15342 LP-15347. <http://www.pnas.org/content/108/37/15342.abstract>.
- [135] Stanciu, Irina. 2012. "Dispersion of SU-8 Photolithography Process for Fabrication of Microfluidic Devices." *UPB Scientific Bulletin, Series C: Electrical Engineering* 74 (2): 127–42.
- [136] Stewart, B W, and C P Wild. 2014. "World Cancer Report 2014." *World Health Organization*, 1–2. doi:9283204298.
- [137] Sung, Jong Hwan, and Michael L Shuler. 2009. "Prevention of Air Bubble Formation in a Microfluidic Perfusion Cell Culture System Using a Microscale Bubble Trap." *Biomedical Microdevices* 11 (4): 731–38. doi:10.1007/s10544-009-9286-8.
- [138] Tamaddon, M, M Burrows, S A Ferreira, F Dazzi, J F Apperley, A Bradshaw, D D Brand, J Czernuszka, and E Gentleman. 2017. "Monomeric, Porous Type II Collagen Scaffolds Promote Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Vitro." *Scientific Reports* 7 (March). The Author(s): 43519. <http://dx.doi.org/10.1038/srep43519>.
- [139] Tanaka, Hiroshi, Christopher L. Murphy, Chiho Murphy, Mitsuhiro Kimura, Shinya Kawai, and Julia M. Polak. 2004. "Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells: Effects of Culture Conditions and Dexamethasone." *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (3): 454–62. doi:10.1002/jcb.20171.
- [140] Thompson, C. Shea, and Adam R. Abate. 2013. "Adhesive-Based Bonding Technique for PDMS Microfluidic Devices." *Lab on a Chip* 13 (4): 632. doi:10.1039/c2lc40978j.
- Tibbitt, Mark W, and Kristi S Anseth. 2009. "Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D

- Cell Culture." *Biotechnology and Bioengineering* 103 (4): 655–63. doi:10.1002/bit.22361.
- [141] Toepke, Michael W, and David J Beebe. 2006. "PDMS Absorption of Small Molecules and Consequences in Microfluidic Applications." *Lab on a Chip* 6 (12). The Royal Society of Chemistry: 1484–86. doi:10.1039/B612140C.
- [142] Torrejon, Karen Y., Dennis Pu, Magnus Bergkvist, John Danias, Susan T. Sharfstein, and Yubing Xie. 2013. "Recreating a Human Trabecular Meshwork Outflow System on Microfabricated Porous Structures." *Biotechnology and Bioengineering* 110 (12): 3205–18. doi:10.1002/bit.24977.
- [143] Tsao, Chia-Wen, and Don L DeVoe. 2009. "Bonding of Thermoplastic Polymer Microfluidics." *Microfluidics and Nanofluidics* 6 (1): 1–16. doi:10.1007/s10404-008-0361-x.
- [144] Tung, Yi-Chung, Amy Y. Hsiao, Steven G. Allen, Yu-suke Torisawa, Mitchell Ho, and Shuichi Takayama. 2011. "High-Throughput 3D Spheroid Culture and Drug Testing Using a 384 Hanging Drop Array." *The Analyst* 136 (3): 473–78. doi:10.1039/C0AN00609B.
- [145] Tzima, Eleni, Mohamed Irani-Tehrani, William B Kiosses, Elizabetta Dejana, David A Schultz, Britta Engelhardt, Gaoyuan Cao, Horace DeLisser, and Martin Alexander Schwartz. 2005. "A Mechanosensory Complex That Mediates the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress." *Nature* 437 (September). Nature Publishing Group: 426. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03952>.
- [146] Urbaczek, Ana Carolina, Paulo Augusto Gomes Carneiro Leão, Fayene Zeferino Ribeiro De Souza, Ana Afonso, Juliana Vieira Alberice, Luciana Teresa Dias Cappelini, Iracilda Zeppone Carlos, and Emanuel Carrilho. 2017. "Endothelial Cell Culture Under Perfusion On A Polyester-Toner Microfluidic Device." *Scientific Reports* 7 (1): 1–12. doi:10.1038/s41598-017-11043-0.
- [147] Varma, Sarvesh, and Joel Voldman. 2015. "A Cell-Based Sensor of Fluid Shear Stress for Microfluidics." *Lab on a Chip* 15 (6): 1563–73. doi:10.1039/c4lc01369g.
- [148] Vedula, Else M., José Luis Alonso, M. Amin Arnaout, and Joseph L. Charest. 2017. "A Microfluidic Renal Proximal Tubule with Active Reabsorptive Function." *PLoS ONE* 12 (10): 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0184330.
- [149] Verjans, Eddy-Tim, Jordi Doijen, Walter Luyten, Bart Landuyt, and Liliane Schoofs. 2017. "Three-Dimensional Cell Culture Models for Anticancer Drug Screening: Worth the Effort?" *Journal of Cellular Physiology*, no. June 2017: 1–26. doi:10.1002/jcp.26052.
- [150] Vernekar, Varadraj N., D. Kacy Cullen, Nick Fogleman, Yoonsu Choi, Andrés J. García, Mark G. Allen, Gregory J. Brewer, and Michelle C. Laplaca. 2009. "SU-8 2000 Rendered Cytocompatible for Neuronal BioMEMS Applications." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 89 (1): 138–51. doi:10.1002/jbm.a.31839.
- [151] Wang, Ling, Ming En Xu, Li Luo, Yongyong Zhou, and Peijian Si. 2018. "Iterative Feedback Bio-Printing-Derived Cell-Laden Hydrogel Scaffolds with Optimal Geometrical Fidelity and Cellular Controllability." *Scientific Reports* 8 (1). Springer US: 1–13. doi:10.1038/s41598-018-21274-4.
- [152] Weaver, V M, O W Petersen, F Wang, C A Larabell, P Briand, C Damsky, and M J Bissell. 1997. "Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and In Vivo by Integrin Blocking Antibodies." *The Journal of Cell Biology* 137 (1): 231 LP-245. <http://jcb.rupress.org/content/137/1/231.abstract>.

- [153] Whitesides, George M, Emanuele Ostuni, Shuichi Takayama, Xingyu Jiang, and Donald E Ingber. 2001. "Soft Lithography in Biology and Biochemistry." *Annual Review of Biomedical Engineering* 3 (1). Annual Reviews: 335–73. doi:10.1146/annurev.bioeng.3.1.335.
- [154] Wilmer, Martijn J, Chee Ping Ng, Henriëtte L Lanz, Paul Vulto, Laura Suter-Dick, and Rosalinde Masereeuw. 2016. "Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening." *Trends in Biotechnology* 34 (2). Elsevier: 156–70. doi:10.1016/j.tibtech.2015.11.001.
- [155] Xu, Jie, Regis Vaillant, and Daniel Attinger. 2010. "Use of a Porous Membrane for Gas Bubble Removal in Microfluidic Channels: Physical Mechanisms and Design Criteria." *Microfluidics and Nanofluidics* 9 (4): 765–72. doi:10.1007/s10404-010-0592-5.
- [156] Yanagawa, Fumiki, Shinji Sugiura, and Toshiyuki Kanamori. 2016. "Hydrogel Microfabrication Technology toward Three Dimensional Tissue Engineering." *Regenerative Therapy* 3. Elsevier Taiwan LLC: 45–57. doi:10.1016/j.reth.2016.02.007.
- [157] You, Jae Bem, Kyoung-Ik Min, Bora Lee, Dong-Pyo Kim, and Sung Gap Im. 2013. "A Doubly Cross-Linked Nano-Adhesive for the Reliable Sealing of Flexible Microfluidic Devices." *Lab on a Chip* 13 (7): 1266. doi:10.1039/c2lc41266g.
- [158] Young, Edmond W K, and David J Beebe. 2010. "Fundamentals of Microfluidic Cell Culture in Controlled Microenvironments." *Chemical Society Reviews* 39 (3): 1036–48. doi:10.1039/b909900j.
- [159] Young, Edmond W K, Erwin Berthier, David J Guckenberger, Eric Sackmann, Casey Lamers, Ivar Meyvantsson, Anna Huttenlocher, and David J Beebe. 2011. "Rapid Prototyping of Arrayed Microfluidic Systems in Polystyrene for Cell-Based Assays." *Analytical Chemistry* 83 (4): 1408–17. doi:10.1021/ac102897h.
- [160] Zanoni, Michele, Filippo Piccinini, Chiara Arienti, Alice Zamagni, Spartaco Santi, Rolando Polico, Alessandro Bevilacqua, and Anna Tesei. 2016. "3D Tumor Spheroid Models for in Vitro Therapeutic Screening: A Systematic Approach to Enhance the Biological Relevance of Data Obtained." *Scientific Reports* 6 (November 2015). Nature Publishing Group: 1–11. doi:10.1038/srep19103.
- [161] Zervantonakis, Ioannis K, Shannon K Hughes-Alford, Joseph L Charest, John S Condeelis, Frank B Gertler, and Roger D Kamm. 2012. "Three-Dimensional Microfluidic Model for Tumor Cell Intravasation and Endothelial Barrier Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (34). National Academy of Sciences: 13515–20. doi:10.1073/pnas.1210182109.
- [162] Zheng, Wenfu, Zhuo Wang, Wei Zhang, and Xingyu Jiang. 2010. "A Simple PDMS-Based Microfluidic Channel Design That Removes Bubbles for Long-Term on-Chip Culture of Mammalian Cells." *Lab on a Chip* 10 (21). The Royal Society of Chemistry: 2906–10. doi:10.1039/C005274D.

