

**EBERS MEDICAL TECHNOLOGY Y GRUPO DE MECÁNICA ESTRUCTURAL Y
MODELADO DE MATERIALES (GEMM) DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
EN INGENIERIA DE ARAGÓN (I3A)**



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo de fin de grado

**Cultivos celulares 3D bajo condiciones de
estimulación mecánica en el ámbito de la
ingeniería de tejidos**

**Realizado por:
Albert Espona Noguera**

**Director:
Pedro Moreo Calvo**

ÍNDICE

0. Resumen/Abstract.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 El cultivo celular.....	3
1.2 La microfluídica.....	3
1.3 Desarrollo de dispositivos microfluídicos para cultivo celular.....	4
1.4 Los chips microfluídicos.....	5
1.5 Los encapsulados.....	6
1.6 El sistema completo.....	7
1.7 El glioblastoma multiforme.....	8
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1 Materiales.....	10
3.1.1 Material para el cultivo celular.....	10
3.1.2 Materiales testados.....	10
3.1.3 Reactivos para los ensayos.....	10
3.2 Métodos.....	10
3.2.1 Cultivo celular.....	10
3.2.1.1 Descongelación de células.....	11
3.2.1.2 Pasajes.....	11
3.2.1.3 Elaboración del hidrogel de colágeno.....	12
3.2.2 Viabilidad y biocompatibilidad celular.....	13
3.2.3 Análisis de adhesión celular mediante microscopio de fuerza atómica (AFM).....	13
3.2.4 inmunofluorescencia.....	15
3.2.5 Ensayo de toxicidad de temozolomida (TMZ) en cultivo 2D de glioblastoma.....	16

3.2.6 Ensayo de toxicidad de temozolamida (TMZ) en cultivo 3D de glioblastoma mediante FDA/IP.....	16
3.2.7 Cultivo de células en un chip microfluídico.....	17
3.2.7.1 Siembra de células en el chip microfluídico de flujo.....	17
3.2.7.2 Evaluación del comportamiento celular en un ensayo con flujo continuo de medio de cultivo.....	17
4. Resultados.....	18
4.1 Evaluación de los materiales de fabricación del chip.....	18
4.1.1 Análisis de viabilidad y biocompatibilidad celular.....	18
4.1.2 Análisis de adhesión celular mediante microscopio de fuerza atómica (AFM).....	18
4.2 Estudio de glioblastoma multiforme.....	19
4.2.1 Estudio de la tasa de crecimiento de glioblastoma mediante inmunofluorescencia.....	19
4.2.2 Estudio de toxicidad de temozolomida (TMZ) en cultivo 2D de glioblastoma.....	20
4.2.3 Estudio de toxicidad de temozolamida (TMZ) en cultivo 3D de glioblastoma mediante FDA/IP.....	22
4.3 Aplicación biomédica del chip microfluídico.....	23
4.3.1 Siembra y cultivo de células en el chip de flujo en estático y con flujo continuo de medio de cultivo.....	23
5. Conclusiones y discusión.....	24
6. Bibliografía.....	26

RESUMEN

El cultivo celular ha sido una herramienta muy útil en los últimos 100 años. Sin embargo, ha sido poco el desarrollo que se ha realizado desde el punto de vista técnico de los sustratos de cultivo. A este respecto, la microfluídica aparece como una nueva herramienta muy prometedora que podría ayudar a simular entornos más biomiméticos en los cultivos celulares y aportar nuevos enfoques y resultados a las investigaciones actuales. El objetivo general de este proyecto es desarrollar herramientas de cultivo celular basadas en dispositivos microfluídicos para poder estudiar la respuesta a fármacos de células de glioblastoma en entornos tridimensionales y su evolución en respuesta a gradientes y/o estímulos mecánicos. Concretamente, este proyecto lo hemos dividido en dos líneas diferentes, por un lado hemos trabajado en la puesta a punto de los chips microfluídicos con lo que respecta al material de fabricación y la puesta a punto de ensayos a flujo. Por otro lado estudiaremos el glioblastoma multiforme (GMB) y el bajo efecto terapéutico de la temozolomida (TMZ), que constituye el fármaco de primera línea para tratar dicha enfermedad.

El material de desarrollo habitual de los chips en el grupo GEMM es el SU-8, pero el proceso de fabricación de los chips de SU-8 es algo lento y, además, trasladar la tecnología empleada para la fabricación a nivel industrial implicaría elevados costes. Uno de los objetivos del grupo actualmente es trasladar la producción a gran escala de los chips microfluídicos para su comercialización, por este motivo, para reducir costes, ha sido necesario elegir un material y método de producción alternativos para la industrialización del producto que permita reproducir las microestructuras. El material escogido fue el poliestireno, porque es el material de uso común en laboratorios de cultivo celular. Hemos realizado ensayos de biocompatibilidad y adhesión celular sobre ambos materiales y el poliestireno muestra un mayor rendimiento sobre el SU-8.

A pesar de ser el fármaco de primera línea, junto con la radioterapia, para tratar los GMB, la TMZ no da resultados muy satisfactorios en clínica, Viendo el efecto de la Temozolamida sobre GMB en cultivos 2D y en 3D es donde observamos una diferencia destacable. En cultivo 2D las células se dividen y como la TMZ afecta a la replicación del DNA, esta provoca mortalidad en la población de GMB. En cambio en el cultivo en 3D no se dividen. Al no dividirse, no entran en la fase de mitosis del ciclo celular y por lo tanto no se ven afectadas por la TMZ, que sólo es efectiva sobre células en proliferación.

Finalmente en los ensayos con los chips microfluídicos de flujo se ha conseguido avanzar, ya que inicialmente un cultivo celular con aplicación de flujo de medio de cultivo no se conseguía mantenerlo adherido en el material. Después de optimizar los tratamientos de plasma de oxígeno se ha conseguido mantener cultivos celulares dentro de las cámaras de cultivo del chip con una viabilidad celular elevada. Esto nos permitirá en un futuro realizar dispositivos microfluídicos que mimeticen el micro entorno tumoral y que contengan un gel 3D con células tumorales rodeado por un endotelio vascular por el que se aplica un flujo.

ABSTRACT

Cell culture has been a very useful tool over the last century. However, there has been little development from a technical point of view of culture substrates. In this regard, microfluidics appears as a promising new tool that could help simulate more biomimetic environments in cell cultures and provide new approaches and results in current research. The overall objective of this project is to develop cell culture tools based on microfluidic devices to study drug response of glioblastoma cells in three-dimensional environments and their development in response to gradients and/or mechanical stimuli. Specifically, this project has taken two different lines. On one hand, we worked on the development of microfluidic regarding the manufacturing material and the development of flow tests. On the other hand, we have studied the glioblastoma multiforme (GBM) and the low therapeutic effect of temozolomide (TMZ), which is the first-line drug for treating the disease.

The usual development material of the chip in GEMM group is SU-8, but the manufacturing process of the SU-8 chip is somewhat slow and also, transferring the technology used to manufacture at industrial level would involve high costs. Currently, one of the aims of the group is to move the production of the microfluidic chips to a larger scale for marketing. For this reason, to reduce costs, it was necessary to choose an alternative material and production method for the product industrialization as to reproduce the microstructures. The material chosen was polystyrene, commonly used in cell culture laboratories. We conducted tests of biocompatibility and cell adhesion on both materials and polystyrene shows a better performance on the SU-8.

Despite being the first-line drug along with radiation therapy to treat the GBM, TMZ does not give very satisfactory results in clinical results. Seeing the effect of temozolomide on GBM 2D and 3D cultures is where we see a remarkable difference. In 2D culture, cells divide and as TMZ affects DNA replication this causes mortality in the population of GBM. However, they do not divide in the 3D culture. Therefore, they do not enter the mitotic phase of the cell cycle, so they are not affected by TMZ, which only affects proliferating cells.

Finally, in trials with the flow microfluidic chips, progress has been made since initially a cell culture with application of flow medium could not remain attached to the material. After optimizing the oxygen plasma treatment cell cultures within the culture chambers of the chip have been managed to be maintained with high cell viability. In the future, this will allow us to make microfluidic devices that will mimic the tumor micro environment and that will contain a 3D gel with tumor cells surrounded by a vascular endothelium where a flow is applied.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL CULTIVO CELULAR

Las técnicas de cultivo *in vitro* de células obtenidas a partir de animales y plantas se desarrollaron a principios del siglo XX de manera conjunta al desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos y órganos explantados. De esta manera el cultivo *in vitro* acabó convirtiéndose en técnicas de uso común en los laboratorios de investigación a partir de mediados del siglo XX [1].

Las técnicas de cultivo celular tienen muchas ventajas, algunas de las cuáles se detallan a continuación: Permiten observar la morfología y el estado físico de las células, así como llevar a cabo análisis bioquímicos acerca del efecto que tiene sobre ellas determinadas moléculas. Esta gran cantidad de ventajas han permitido que el cultivo celular sea utilizado como una alternativa a la experimentación animal para el estudio de fármacos, cosméticos, etc. [2,3].

Sin embargo, aunque el cultivo celular es una muy buena herramienta de trabajo, ésta tiene algunas desventajas: Las células utilizadas normalmente están modificadas para una supervivencia indefinida, por lo que son poco representativas de la estirpe original por su inestabilidad genética. Además, en algunos casos los resultados que se obtienen en ensayos *in vitro* no son reproducibles *in vivo*. Por tanto, aunque se pueden llevar a cabo muchos experimentos *in vitro*, existe aún mucha experimentación animal (*in vivo*) debido a la poca reproducibilidad del cultivo celular en determinados casos.

El motivo por el cual sucede este fenómeno, es debido a que las células *in vitro* se encuentran en unas condiciones diferentes a las que se encuentran *in vivo*. De esta manera la caracterización celular y la respuesta celular a estímulos generados son diferentes. Por ejemplo, las células endoteliales de las arterias están sometidas a un estrés mecánico ejercido por el flujo de la sangre, llamado estrés de cizallamiento (*Shear Stress*), que cambia la morfología de estas y la capacidad de respuesta ante estímulos determinados. En cambio, en un frasco de cultivo las células endoteliales cultivadas proliferan con ausencia de estrés de cizallamiento, y por lo tanto, no tienen la misma morfología ni capacidad de respuesta ante estímulos determinados que en el estado fisiológico.

Actualmente, la necesidad de producir un entorno de cultivo celular que sea similar al fisiológico, reemplazando o reduciendo de este modo la experimentación animal, está haciendo evolucionar las técnicas de cultivo en lo que se refiere al recipiente de cultivo [4]. La ciencia que ha permitido llevar a cabo este paso hacia adelante es la microfluídica aplicada al cultivo celular.

1.2 LA MICROFLUÍDICA

La microfluídica es la ciencia que estudia la manipulación de fluidos a microescala (de 10^{-9} a 10^{-18} litros) utilizando canales con dimensiones desde unas pocas micras hasta

cientos de micras [5]. Se considera que los primeros trabajos fundamentales en microfluídica comenzaron alrededor del año 1846 realizados por Poiseuille, en los que trabajaba con canales de diámetros entre los 30 μ m y 150 μ m. Desde entonces se fueron estudiando las propiedades de los fluidos dentro de los sistemas microfluídicos; una de las propiedades principales de los microfluidos es su bajo número de Reynolds (Re), lo que indica que dentro de los dispositivos microfluídicos se comportan con un régimen laminar (figura 1A). Esta propiedad es muy importante, ya que a diferencia que en el régimen turbulento (figura 1B), podemos predecir el comportamiento del flujo del fluido [6].



Figura 1. Diagrama de flujo laminar con su perfil de distribución de velocidades (A), diagrama de flujo turbulento con su perfil de distribución de velocidades (B).

En los últimos 10 años, con el desarrollo de la biotecnología, la microelectrónica y la ciencia de los materiales, el uso de dispositivos microfluídicos ha ido incrementándose. La primera aplicación de la microfluídica fue para el desarrollo de un sistema de cromatografía de gases; más tarde llegarían sistemas de cromatografía de líquidos a altas presiones, electroforesis capilar, bombas electro-osmóticas, micromezcladores, etc. [7].

1.3 DESARROLLO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS PARA EL CULTIVO CELULAR

Tras identificar este nuevo campo como una oportunidad comercial, la empresa aragonesa EBERS Medical Technology en colaboración con el Grupo de Mecánica Estructural y Modelado de Materiales (GEMM) del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), está desarrollando una plataforma de chips microfluídicos que permite reproducir *in vitro* una gran variedad de entornos fisiológicos. Buscan, de este modo, respuestas *in vitro* más próximas a las producidas *in vivo* y con ello reemplazar, reducir o retrasar la experimentación con animales. El régimen laminar es uno de los factores que permite simular entornos fisiológicos, ya que este tipo de flujo es el que se produce en la mayoría de partes del organismo debido a la escala en la que se producen. Además, ofrece más ventajas ya que permite la miniaturización de los sistemas de cultivo, con lo cual también se reduce costes a nivel de consumo de medio de cultivo y reactivos, dado que se trabaja con volúmenes muy pequeños.

Hay tres prototipos de chips en fase de desarrollo, cada uno tiene un diseño microfluídico particular que le permite simular unas condiciones ambientales de cultivo en las que determinadas células se encuentran *in vivo*, por lo tanto éstas células dentro de los chips van responder ante estímulos químicos y/o mecánicos de una forma más parecida *in vivo*. Los tres chips en desarrollo son el chip de flujo (*Flow chip*), el chip de

flujo cruzado (*TransFlow*) y el chip de gradiente (*Gradient chip*). A continuación se hará una breve descripción de los chips con los que vamos a trabajar y sus posibles aplicaciones biológicas y biomédicas.

1.4 LOS CHIPS MICROFLUÍDICOS

Chip de flujo

El chip de flujo es un chip multicanal que tiene tres cámaras de cultivo independientes permitiendo obtener triplicados internos en cada experimento, incrementando el rendimiento del trabajo. Este tipo de chip permite generar tensiones tangenciales sobre las células cultivadas (estrés de cizallamiento) mediante la aplicación de flujo (figura 2). De este modo se puede simular las condiciones fisiológicas en las que se encuentran por ejemplo las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

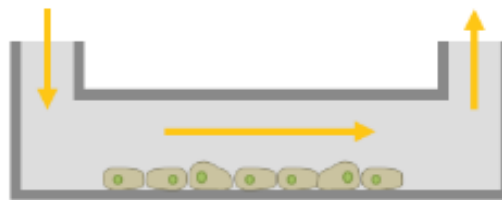


Figura 2. Células cultivadas en una de las cámaras de cultivo del chip de flujo sometidas a estrés de cizallamiento.

Chip de gradiente

El chip de gradiente tiene una cámara de cultivo central y dos microcanales laterales comunicados a la cámara central mediante unos microcanales aún más pequeños (figura 4). Este chip está pensado para generar gradientes estables en el tiempo de moléculas de señalización y oxígeno disuelto sobre cultivos tanto en 2D como en 3D.

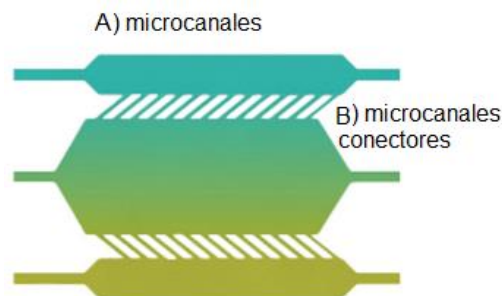


Figura 3. Estructura del chip de gradiente, microcanales (A) y microcanales conectores (B).

Estos chips han sido desarrollados y fabricados por el grupo GEMM empleando como material de desarrollo para los primeros prototipos la resina fotonegativa SU-8 (figura 4A). El SU-8 es un polímero fotoresistente basado en grupos epoxi. Este material tiene las propiedades químicas y mecánicas idóneas para la fabricación de micro-estructuras, por este motivo, es uno de los principales materiales utilizados para la fabricación de dispositivos microfluídicos. Originariamente fue desarrollado para la industria de la

microelectrónica, pero en los últimos años se está utilizando en otros campos como por ejemplo en la biomedicina [8].

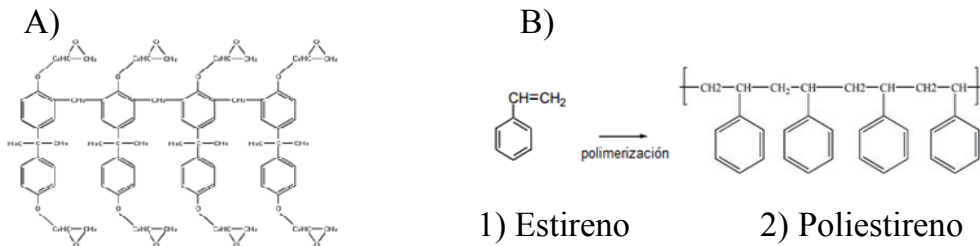


Figura 4. Estructura química del SU-8 (A), estructura química de monómero de estireno (B1), estructura química del poliestireno (B2).

El proceso de fabricación de los chips de SU-8 es algo lento y además trasladar la tecnología empleada para la fabricación a nivel industrial implicaría elevados costes. El objetivo principal es la producción a gran escala de los chips microfluídicos para su comercialización. Por este motivo, para reducir costes, ha sido necesario elegir un material y método de producción alternativos para la industrialización del producto que permita reproducir las microestructuras.

A este efecto se escogió el poliestireno porque es el material de uso común en laboratorios de cultivo celular. Este material es un termoplástico que, por su bajo coste, fácil procesamiento y propiedades físico-químicas, es utilizado en una gran cantidad de fines, como por ejemplo, envases alimentarios, carcasas de electrodomésticos, etc. Este homopolímero (figura 4B) es incoloro, tiene unas propiedades ópticas excelentes, buena resistencia mecánica y con un tratamiento adecuado presenta una elevada biocompatibilidad. Todas estas propiedades han hecho que sea el material por excelencia en la fabricación de instrumental para el cultivo celular [9].

1.5 LOS ENCAPSULADOS

Cada sistema de cultivo lo integran tres elementos: el chip microfluídico que contiene los canales y las cámaras de cultivo, una base, compuesta por dos piezas, donde se aloja el chip y una cubierta con 6 puertos fluídicos (3 de entrada y 3 de salida) que conectan fluídicamente los puertos de entrada y salida con las cámaras de cultivo del chip. La base y la cubierta forman el encapsulado que permite una conexión fluídica desde el exterior hasta las cámaras de cultivo del chip. La base y el chip tienen un diseño que permite la colocación correcta del chip (corte de una de las esquinas).

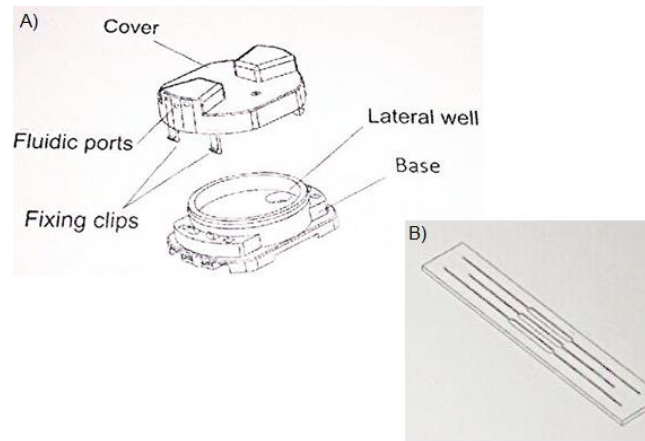


Figura 5. Dispositivo de cultivo celular con la cubierta y la base alojando el chip microfluídico en su interior (A), chip de flujo (B).

1.6 SISTEMA COMPLETO

Los dispositivos de cultivo (encapsulado con el chip en su interior) necesitan la circulación de medio de cultivo a través de las cámaras de cultivo para nutrir las células. Para ello se requiere un circuito compuesto por juntas teóricas, tubos, conectores, reservorios con el medio de cultivo, filtros para el intercambio gaseoso y una bomba peristáltica o de jeringa para impulsar el medio de cultivo a través de todo el circuito (figura 6). Todos estos elementos permiten un sistema de cultivo cerrado y estéril. La bomba peristáltica, los reservorios, los tubos y los conectores están disponibles comercialmente.

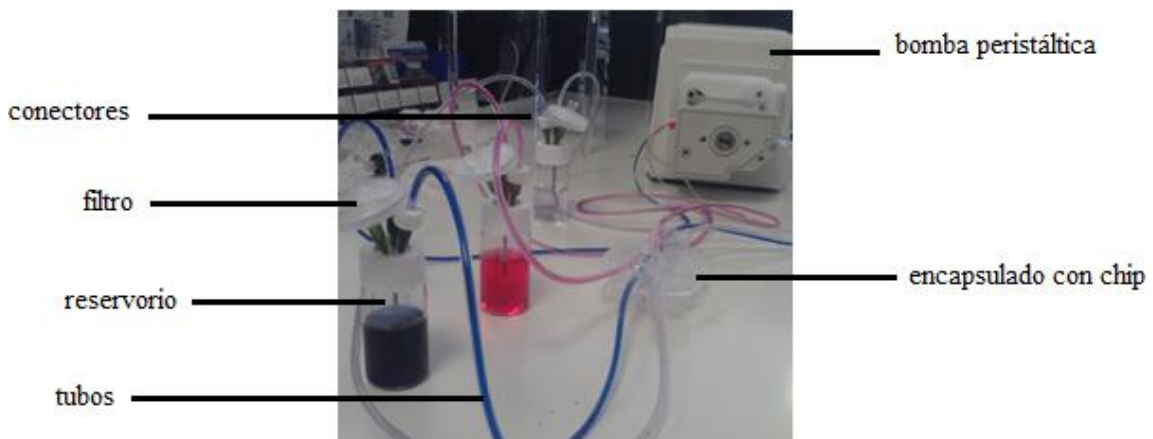


Figura 6. Montaje de un circuito cerrado con flujo de agua destilada con distintos colorantes alimentarios para observar la conexión fluídica entre todos los elementos del sistema.

El sistema de cultivo que se busca en estos dispositivos con los chips microfluídicos es muy novedoso y no se ha hecho nada parecido anteriormente. Los prototipos con los que se trabaja aún se encuentran en fase de desarrollo. Tanto los chips microfluídicos como los encapsulados son de fabricación propia, por lo que los materiales y métodos de fabricación deben ser evaluados y optimizados con tal de obtener un buen rendimiento de todos los elementos que integran el sistema. Además, aún no hay establecidos protocolos de trabajo con los sistemas de cultivo, con lo cual, también hay

otra línea de trabajo en esta dirección para la puesta a punto de los dispositivos. Como se puede observar, las aplicaciones de estos dispositivos son muy amplias, pero con el fin de validarlos se ha optado por realizar estudios en un tumor cerebral incurable con poca esperanza de vida en el que no se ha avanzado significativamente en la mejora clínica en los últimos años, el glioblastoma multiforme.

1.7 EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Los gliomas son un tipo de tumores que representan más del 60% de los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC). Dentro de los gliomas se incluyen una serie de tumores denominados gliomas entre los cuales se encuentra el glioblastoma multiforme (GBM); todos se originan a partir de las células gliales y tienen una alta capacidad de infiltrar el tejido cerebral adyacente. El GMB es el glioma más agresivo en la población adulta siendo una enfermedad progresiva en la que la supervivencia media de los afectados, incluso con tratamiento médico, es en torno a un año [10].

Se ha descrito que el GMB es un tipo de tumor con una tasa de migración celular muy elevada inducida probablemente por la hipoxia. Este fenómeno está mediado por factores promigratorios secretados por las células tumorales en condiciones de hipoxia, como por ejemplo, el factor inducible por la hipoxia 1 (HIF-1). También se ha descrito que el GMB tiene una tasa de duplicación celular baja en comparación con otros tipos de tumores [11]. En conjunto estos resultados sugieren que el origen de la agresividad del GBM se encuentra en su capacidad invadir el tejido y no en una elevada proliferación.

El tratamiento inicial para el GMB es la cirugía, seguida por posterior quimioterapia y radioterapia combinadas. El medicamento estándar para el tratamiento del GBM es la temozolamida (TMZ). Este fármaco es un agente alquilante que actúa inhibiendo la replicación del ADN durante la mitosis. Las células quedan detenidas en la fase G2-M del ciclo celular y finalmente entran en apoptosis o muerte celular programada. Además, y a diferencia de otros agentes alquilantes, este fármaco es capaz de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el aumento de la supervivencia de los pacientes tratados con TMZ y radioterapia con respecto a aquellos tratados sólo con radioterapia es de tan sólo 2 meses más [12]. Sin embargo cuando se testa su eficacia en ensayos "in vitro" en placa Petri, la TMZ reduce drásticamente la viabilidad en células de GBM. Esto señala que el cultivo clásico en placa Petri no refleja la compleja realidad fisiológica, y por lo tanto para un eficaz desarrollo de fármacos nuevos modelos más complejos son necesarios. En este contexto, los dispositivos microfluídicos y los cultivos celulares en sistemas tridimensionales en dispositivos microfluídicos son de gran interés. Dichos sistemas permiten la recreación de un entorno 3D similar al de los tejidos, y al mismo tiempo es posible establecer diferentes gradientes y estudiar la respuesta celular.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es desarrollar herramientas de cultivo celular basadas en dispositivos microfluídicos para poder estudiar la respuesta a fármacos de células de glioblastoma en entornos tridimensionales y su evolución en respuesta a gradientes y/o estímulos mecánicos. En este proyecto trabajaremos en dos líneas diferentes, por un lado trabajaremos en la puesta a punto de los chips microfluídicos, y por el otro nos familiarizaremos y estudiaremos el GMB para entender el bajo efecto terapéutico de la TMZ y también para que en un futuro podamos aplicar la tecnología que ofrece esta plataforma de chips microfluídicos a estudiar esta enfermedad.

Para la puesta a punto de los chips microfluídicos trabajaremos con los materiales de fabricación, SU-8 y poliestireno, con el objetivo de consolidar el poliestireno como material para el escalado del producto a nivel industrial. Para ello se realizaron los siguientes ensayos:

- Análisis de biocompatibilidad y viabilidad celular con los distintos materiales de fabricación.
- Análisis de adhesión celular en los distintos materiales mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

Para estudiar el GMB y el efecto terapéutico de la TMZ vamos se realizaron los siguientes ensayos:

- Detección de la proliferación celular de una línea celular de GMB (U-251) mediante inmunofluorescencia de ki67 y comparación con una línea tumoral de cáncer de colon humano (HCT-116).
- Estudio de la toxicidad de la TMZ sobre U-251 en cultivo en 2D.
- Estudio de la toxicidad de la TMZ sobre U-251 en cultivo 3D en un hidrogel de colágeno.

Para la futura aplicación biomédica de los chips microfluídicos, en primer lugar se debe optimizar el proceso de montaje y de siembra. Para ello se realizaron los siguientes ensayos:

- Siembra y cultivo de células en el chip de flujo en estático
- Siembra y cultivo de células en el chip de flujo con flujo de medio de cultivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIAL PARA CULTIVO CELULAR

El cultivo de las células U-251 y HCT116 se ha hecho en medio de cultivo DMEM alto en glucosa (Lonza ref. BE12-614F) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma ref. F7524) y penicilina y estreptomicina (DE 17-602E). Las células MET5A se han cultivado en medio M199 (Lonza ref. 12-117F) suplementado de igual modo que el medio descrito previamente. También se ha empleado tampón fosfato salino (PBS) (Lonza ref. 17-516F), tripsina/EDTA 10X (Lonza, ref. LONZ02-007E), azul tripán (invitrogen, ref. 15250061).

Para realizar cultivo en 3D se ha utilizado colágeno tipo I de cola de rata (Corning, ref. 354236), NaOH 1N (Fluka, ref. 71463) y agua destilada.

3.1.2 MATERIALES PARA CULTIVO CELULAR TESTADOS

Para los ensayos de evaluación del material de fabricación de los chips microfluídicos se han utilizado discos de SU-8 y de poliestireno de 6mm de diámetro.

3.1.3 REACTIVOS PARA LOS ENSAYOS

- Fluoresceína diacetato (FDA) stock a 5mg/mL y yoduro de propidio (IP) stock a 2mg/mL (Sigma, ref. F7378-5G y P4170-10MG respectivamente) para evaluar la viabilidad celular.
- Presto blue (Invitrogen, ref. A-13261) para determinar la viabilidad celular mediante espectrofotometría con un lector de placas Synergy HT de Biotek.
- Para la inmunofluorescencia se ha utilizado: formol al 4%, solución tampón de lavado 0,05% Tween20 (Sigma, P1379) en PBS, solución permeabilizante 0,1% Tritón X-100 (Sigma, ref. T8787), en PBS, solución bloqueante (1% BSA en PBS), un anticuerpo primario anti ki67 de ratón (Santa Cruz biotechnology, ref. sc-23900) y un anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 anti-ratón (Invitrogen, ref. A-11001) para detectar ki67. Se ha utilizado DAPI (Sigma, ref. D9564) para detectar los núcleos celulares.
- Para el ensayo de toxicidad se ha utilizado Temozolamida (Calbiochem, ref. cat#500609).
- Para el ensayo con el chip microfluídico de flujo se ha utilizado el chip, el encapsulado, tubos, conectores, reservorio con medio de cultivo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CULTIVO CELULAR

Cuando se trabaja con cultivos celulares se trabaja en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar (Bio II A, Telstar), y además todo el material utilizado

debe ser esterilizado previamente (puntas de micropipeta, pinzas, etc.). Debe evitarse la entrada de agentes biológicos externos dentro del cultivo (bacterias, hongos u otros tipos celulares eucariotas) para mantener la integridad del cultivo y evitar interferencias indeseadas.

3.2.1.1 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Se mantiene el vial de células congeladas en un baño termostatzado a 37°C durante 1 o 2 minutos hasta que la muestra esté en estado líquido. Se pone la muestra en 8-10mL de medio de cultivo en un tubo falcon para diluir el DMSO, que a pesar de su uso como crioprotector es tóxico para las células. Se centrifuga 5 minutos a 450 rcf (centrifugadora eppendorf 5810R), se retira el medio y se resuspende el precipitado de células (*pellet*) en 2-3mL de medio de cultivo fresco.

3.2.1.2 PASAJES

A medida que las células se dividen dentro del frasco de cultivo la superficie ocupada por las mismas va aumentando. Finalmente, las células podrían llegar a ocupar toda la superficie del frasco y no podrían crecer más por el proceso conocido como inhibición por contacto, en este estado las células se encuentran en confluencia. Las células no deberían alcanzar este estado de confluencia, ya que experimentan cambios tanto genéticos como metabólicos que puede afectarlas negativamente. Para que esto no suceda se hace un pasaje, es decir, se coge tan sólo una fracción de estas células y se vuelven a sembrar en otro frasco de cultivo. Para ello se comienza retirando el medio de cultivo con una pipeta. Se lava dos veces con 5mL de PBS. Una vez lavado, se añade 1mL de tripsina para romper las uniones de las células con la superficie del frasco y se deja entre 2 y 5 minutos en el incubador. Se observan las células en el microscopio para asegurarse que se han despegado del frasco, si no es así se dan unos pequeños golpes al frasco para acabar de soltarlas. Se añade 3mL de medio de cultivo en el frasco de cultivo y se lleva todo el volumen un tubo falcon. El suero del medio de cultivo contiene una alta concentración de proteínas, de esta manera se bloquea la actividad de dicha enzima por saturación, impidiendo que degrade proteínas necesarias para las células. Se lleva el tubo falcon a la centrifuga (5min, 450rcf), se elimina el sobrenadante y se resuspende en 2-3mL de medio de cultivo nuevo.

El siguiente paso es determinar cuántas células viables hay en los 2-3mL del tubo falcon. Para ello, se resuspende bien la muestra y se coge una pequeña alícuota de 20µl. Seguidamente se añade 20µl de un colorante vital, en concreto se ha empleado azul tripán. Este colorante no es capaz de atravesar la membrana celular a menos que se encuentre dañada, lo que permitirá diferenciar las células vivas y las muertas en el microscopio. Una vez hecha la mezcla, se coge 10µl y se introducen en la cámara de Neubauer, que va a permitir contar las células en el microscopio óptico. Al microscopio, en la cámara de Neuobauer se visualiza una estructura que define cuatro cámaras cuadradas cada una de 1mm de lado y un espesor de 0,1 mm. Conociendo estas dimensiones, se cuentan todas las células viables que se observan dentro de los 4

cuadrantes de la cámara de Neubauer para después mediante una serie de cálculos calcular la densidad celular inicial.

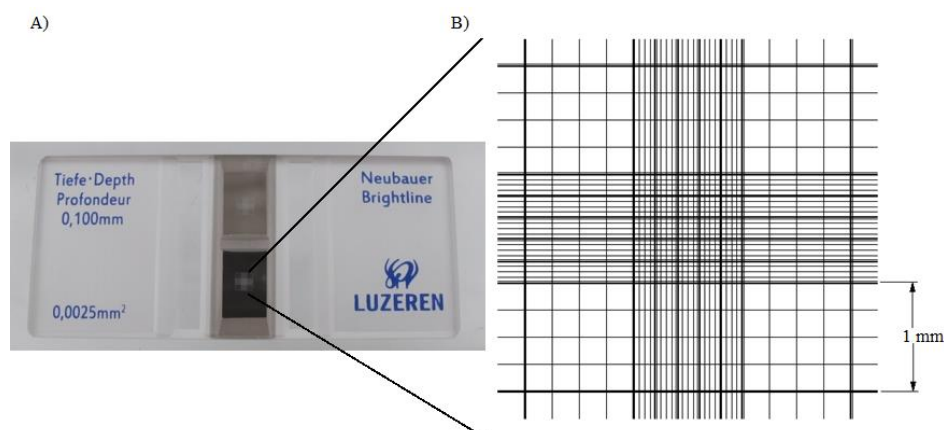


Figura 7. Cámara de Neubauer (A) con los 4 cuadrantes ampliados (B). Cada cuadrante tiene unas dimensiones de 1x1mm de ancho y largo y un espesor de 0,1mm, con lo que tiene un volumen de 0,1mm³ que son 10⁻⁴mL.

La concentración de células viables en el cultivo inicial se calcula del siguiente modo:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células} \times \text{factor de dilución del azul tripán} (2) \times 10^4}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes}} = \text{células/mL}$$

Sabiendo el número de células por mL que hay en el cultivo celular y el número de células que se quiere sembrar, se hacen los cálculos pertinentes para saber el volumen que hay que sembrar.

Finalmente se diluye el volumen de células determinado en un volumen de 7-8mL de medio de cultivo y se pasa todo al nuevo frasco de cultivo.

3.2.1.3 ELABORACIÓN DEL HIDROGEL DE COLÁGENO

Para la preparación de 100µl de un hidrogel de colágeno tipo I de cola de rata (concentración final de 1,5mg/mL) se tienen que mezclar los siguientes componentes en un determinado orden: Primero se añaden 41,9 µl de agua destilada estéril en un tubo eppendorf, después 20µl de medio de cultivo DMEM 5X y seguidamente 0,93µl de NaOH 1N. Llegados a este punto se pone el tubo eppendorf en hielo para enfriarlo, ya que el colágeno, una vez neutralizado su pH, a temperatura ambiente polimeriza muy rápidamente. Una vez enfriado se añade 37,13µl de la solución madre de colágeno que está a una concentración de 4.03mg/mL.

Mientras se mantenga en hielo, la reacción de polimerización es muy lenta y esta preparación puede aguantar en estado líquido 2-3 horas. Finalmente se vierte la preparación en la placa de cultivo con la que se esté trabajando y se deja que polimerice durante 15 minutos dentro del incubador.

Si se pretende embeber las células dentro del hidrogel de colágeno, se sustituirá parte del volumen de agua por el volumen deseado de suspensión celular. Deberá reajustarse

también el volumen de DMEM5X. La suspensión celular se añade siempre en último lugar, para evitar dañar las células durante la adición de los mencionados reactivos.

3.2.2 VIABILIDAD Y BIOCMPATIBILIDAD CELULAR

Para estudiar la viabilidad y biocompatibilidad del SU-8 y el poliestireno utilizados para la fabricación de los chips microfluídicos se utilizó una placa de cultivo celular de 24 pocillos. En seis pocillos se introdujo un disco de poliestireno de 6mm de diámetro sin tratamiento previo, en otros seis pocillos un disco de SU-8, en los siguientes seis pocillos un disco de poliestireno con tratamiento previo de plasma de oxígeno y en los últimos seis pocillos se sembraron las células directamente sobre el fondo de la placa de poliestireno comercial como control. Se sembraron células MG63, una línea celular de fibroblastos óseos. De los seis pocillos con cada material se sembró en tres de ellos 5000 células y en los otros tres 2500 células. Para observar la viabilidad de las células en los distintos materiales se hizo una tinción con fluoresceína diacetato (FDA) y yoduro de propidio (IP). Para hacer la preparación se añadieron 990µl de PBS no estéril en un eppendorf y después 6µl de FDA (5 mg/ml) y 4µl de IP (4 mg/ml). Es importante proteger la preparación de la luz para poder mantener las propiedades fluorescentes de los dos componentes. Se retiró el medio de la placa de cultivo, se lavó con PBS y se añadió la mezcla de FDA/PI. Se añadió un volumen suficiente como para cubrir la muestra, en este caso fueron 100µl. Después se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos protegiendo la muestra de la luz. Transcurridos los 5 minutos se lavó con PBS una vez y se añadió más PBS para pasar a observar las muestras en el microscopio confocal. La FDA es un compuesto hidrofóbico que será capaz de pasar a través de las membranas celulares. Una vez dentro de las células, las esterases la metabolizan generando un compuesto fluorescente verde polar que no es capaz de salir de las células. Las células muertas son las únicas que incorporan el IP, debido a la presencia de poros en la membrana. Una vez dentro de las células se une al DNA, emitiendo fluorescencia roja. Tomamos imágenes con el microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti-E y módulo confocal C1) de cada muestra y después se analizaron las imágenes con el programa Fiji. En este ensayo se analizó la viabilidad celular a día 1 y 3 después de la siembra de las células.

3.2.3 ANÁLISIS DE ADHESIÓN CELULAR MEDIANTE MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es una potente técnica capaz de determinar la topografía de una superficie, así como de cuantificar las fuerzas de interacción entre la superficie de una muestra, y la punta de una sonda o cantiléver. Las fuerzas existentes entre la punta y la muestra cuando éstas se encuentran a una distancia muy corta, provocan la deflexión o doblado del cantiléver. Ésta puede ser cuantificada gracias a la acción de un láser que refleja en la parte posterior del cantiléver y es finalmente captado por un fotodetector.

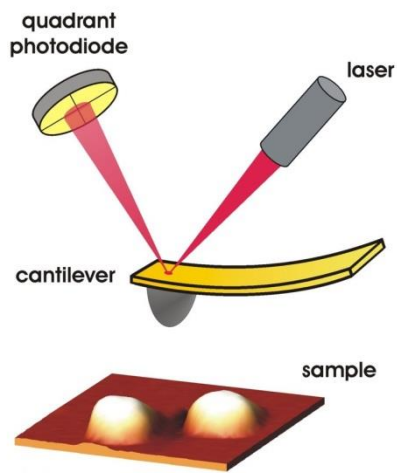


Figura 8. Esquema general de un microscopio de fuerza atómica (AFM).

En la espectroscopía de fuerzas, un microscopio de este tipo es capaz de cuantificar qué fuerzas existen entre una sonda y la superficie de la muestra. Esto hace que este tipo de microscopía captando las fuerzas de interacción del cantiléver con la superficie de la misma.

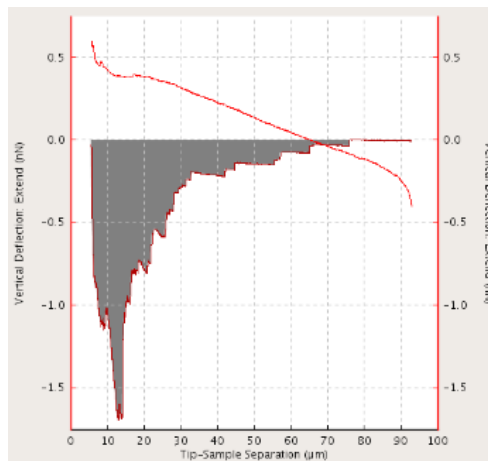


Figura 9. Representación de la fuerza punta-muestra en función de la altura a la que se encuentra la sonda en una curva de espectroscopía de fuerzas. En cada una de las regiones aparece detallado el evento que tiene lugar.

Una de las múltiples aplicaciones de la microscopía de fuerza atómica es la posibilidad de realizar ensayos de adhesión celular sobre materiales. Con esta técnica se evaluará la fuerza de adhesión celular en cada uno de los materiales del chip, en SU-8 y en poliestireno.

Para ello, se empleó un microscopio de fuerza atómica JPK con un módulo CellHesion montado sobre un microscopio invertido NIKON Ti. La línea celular escogida fue MG-63, ya empleada previamente por el grupo GEMM en otros trabajos. Los cantilévares escogidos carecían de punta (ArrowTL1 de NanoAndMore GMBH) y tenían una constante elástica de 0,01 N/m. Previamente a su uso se funcionalizaron con fibronectina para propiciar la adhesión celular a los mismos.

Una vez encendido el microscopio, software del equipo y mesas anti-vibratorias y colocado el cantiléver en el bloque de cuarzo correspondiente, debe enfocarse y centrarse la imagen del cantiléver en el microscopio. Una vez hecho esto, se alineará el láser sobre el cantiléver. El siguiente paso es poner la placa con un cubreobjetos pasivado y discos de SU-8 y poliestireno. Éstos últimos se pegaron a la placa con silicona biocompatible para evitar que floten en el medio de cultivo.

Una vez atemperada la placa, se añadió 50µl de suspensión celular sobre el cubreobjetos pasivado. Se dejó sedimentar las células y atemperar el medio de cultivo (tamponado con HEPES). Una vez hecho esto, se aproximó el cantiléver automáticamente a la superficie de la placa y se retrae 100 micras. Seguidamente, se posicionó el cantiléver sobre una célula y se realizó una medida de espectroscopía de fuerza sobre una de las células. De este modo, la célula se adhirió al cantiléver. Se dejó reposar la célula 15 minutos para permitir su correcta adhesión al cantiléver. Una vez hecho esto, se realizó una nueva medida de espectroscopía de fuerza, esta vez sobre el material a estudiar. Una vez obtenida la curva de adhesión de cada material se procede al análisis del resultado. Primero de todo se establece la línea base como referencia (se corresponde al momento en que la célula ya no está en contacto con el material). Después se reajusta la curva al punto 0.0 para obtener los valores finales directamente. Después se determina el punto mínimo de la curva y finalmente el propio programa integra toda el área comprendida entre la curva y la línea base establecida. Esta área se corresponde a la energía de adhesión de la célula sobre el material en el que se ha hecho el ensayo. De este modo se verá que material ofrece las mejores condiciones para cultivo celular.

3.2.4 INMUNOFLUORESCENCIA

Se sembraron 15000 células de U251 y de HCT 116 por pocillo en una placa de 96 pocillos en 2D. Tras dos días en el incubador se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS. Después se fijó con formol al 4% durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se lavó con la solución tampón de lavado (0,05% Tween20 en PBS) durante 5-8 minutos. Se repitió el lavado 2 veces y después se añadió la solución permeabilizante (0,1% Tritón X-100 en PBS) durante 5-8 minutos a temperatura ambiente. Esta exposición al detergente Tritón X-100 generará poros en las membranas celulares y permite la entrada de los anticuerpos dentro de la célula. Después de esta permeabilización, se lavó 2 veces con la solución de tampón de lavado y se añadió la solución bloqueante (1% BSA en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 30 minutos se añadió el anticuerpo primario anti-ki67 de ratón (dilución del stock 1:125 en solución 1% BSA y 0,1% Tritón X-100) y se incubó toda la noche a 4°C. Tras 24 horas se lavó 3 veces con la solución tampón de lavado y se añadió el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 anti-ratón (dilución del stock 1:500 en solución 1% BSA y 0,1% Tritón X-100). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad en el caso de cultivos 2D y durante 24h en las mismas condiciones en cultivos 3D. Después de incubar se añadió el DAPI a una concentración 0,5µg/mL en PBS y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se lavó 3 veces con la solución de tampón de lavado y se observó

al microscopio de fluorescencia. Se tomaron imágenes con el microscopio confocal de cada muestra y después se analizaron las imágenes con el programa Fiji.

3.2.5 ENSAYO DE TOXICIDAD DE TMZ EN CULTIVO 2D DE GLIOBLASTOMA

Se sembraron 10000 células U-251 por pocillo en una placa de 96 pocillos en 2D, y se dejan toda la noche en el incubador. Al día siguiente se añadieron diferentes concentraciones de TMZ (50 μ M, 100 μ M y 200 μ M). Otros pocillos se cultivaron con medio de cultivo normal o medio con DMSO al 0,2% para descartar un posible efecto negativo debido al DMSO en el que se encuentra disuelta la TMZ. Se dejaron varios pocillos tan solo con medio como blanco para comprobar la señal generada por el medio de cultivo tanto sin DMSO como con DMSO al 0,2%. Para realizar la medida de viabilidad mediante presto blue, se añadió 10 μ l del reactivo en cada pocillo y se dejó incubar durante 4 horas en el incubador a 37°C. Este compuesto (resazurina) tiene un color azul, que las células viables serán capaces de metabolizar y cambiará a color violeta (resorufina). Este cambio se puede detectar con un lector de placas (espectrofotómetro) como un cambio en el ratio entre las longitudes de onda de 570nm y 600nm.

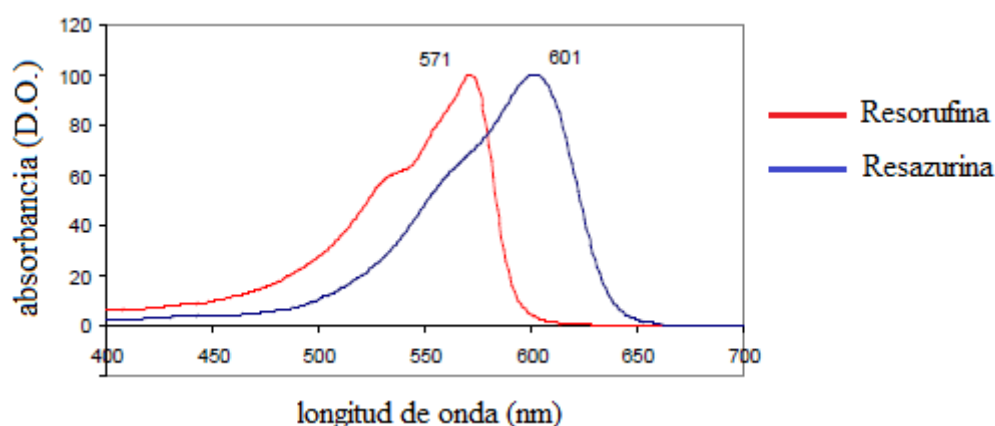


Figura 10. Espectros de absorción de la resorufina (rojo) y la resazurina (azul).

Una vez realizada la medida se retiró el presto blue y se lavó con PBS tres veces. Después del lavado se añadió en cada pocillo la TMZ o medio correspondiente y se dejaron las células en el incubador a 37°C hasta la siguiente medida. En este ensayo se realizaron medidas a días 1, 3 y 7 después de la siembra de las células. El último día (7) se realizó también una tinción con FDA/IP y se tomaron imágenes de cada muestra con el microscopio confocal y se analizaron con el programa Fiji.

3.2.6 ESTUDIO DE TOXICIDAD DE TMZ EN CULTIVO 3D DE GLIOBLASTOMA MEDIANTE FDA/IP

Se sembraron las células U-251 a una densidad de 4000 células/ μ l en una placa de 96 pocillos en 3D: un pocillo control sin TMZ, 3 pocillos a los que añadiremos 3 concentraciones diferentes de TMZ (50 μ M, 100 μ M y 200 μ M) y un pocillo con DMSO al 0,2%. Se midió la viabilidad celular a días 1, 3 y 7 después de la siembra mediante la

tinción con FDA/IP. En cada medida se realizaron fotografías con el microscopio confocal para analizarles después con el programa Fiji.

3.2.7 CULTIVO DE CÉLULAS EN UN CHIP MICROFLUÍDICO

3.2.7.1 SIEMBRA DE CÉLULAS EN EL CHIP DE FLUJO

Para poder sembrar células en un chip microfluídico en primer lugar hay que esterilizar el chip. Para ello se sumergió los chips en isopropanol en una placa de Petri y se llevaron a la campana de flujo laminar. Con la ayuda de una micropipeta se cogieron 100µl de isopropanol y se perfundieron por cada uno de los canales del chip, tanto por las entradas como por las salidas. Después se retiró todo el isopropanol mediante una pipeta Pasteur de vidrio conectada a la línea de vacío, y de este modo se dejó completamente seco el exterior y el interior del chip. Seguidamente se lavó con agua del mismo modo y se volvió a secar el chip. Una vez hecho esto, se perfundieron 100µl de medio de cultivo fresco y después se sembraron las células perfundiendo 10µ de suspensión celular. En este caso se sembraron células MET5A a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/mL. Estas células se cree que son sensibles al estrés de cizallamiento generado por el flujo.

3.2.7.2 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CELULAR EN UN ENSAYO CON FLUJO CONTINUA DE MEDIO DE CULTIVO

Para poder llevar a cabo un experimento con flujo hay que esterilizar todas las piezas del encapsulado y los tubos que van a componer el sistema completo. Para ello se utilizó el autoclave para los tubos y conectores, y el mismo método de esterilización por isopropanol para las piezas del encapsulado. Una vez estériles, se llevaron todas las piezas a la campana de flujo laminar para empezar el montaje. Se conectaron los distintos tubos a las entradas microfluídicas del encapsulado, se conecta el sensor de flujo y el reservorio de medio. El chip con células MET5A sembradas se colocó dentro del encapsulado y se cerró de forma estanca para evitar la entrada de bacterias u otros agentes biológicos. Finalmente todo el sistema se deja dentro del incubador con excepción del sensor de flujo que queda conectado al ordenador y del reservorio, que se conecta a una línea de aire a presión para generar el flujo a través del sistema.

4. RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DEL MATERIAL DE FABRICACIÓN DEL CHIP

4.1.1 ANÁLISIS DE VIABILIDAD Y BIOCOMPATIBILIDAD CELULAR DEL SU-8 Y EL POLIESTIRENO

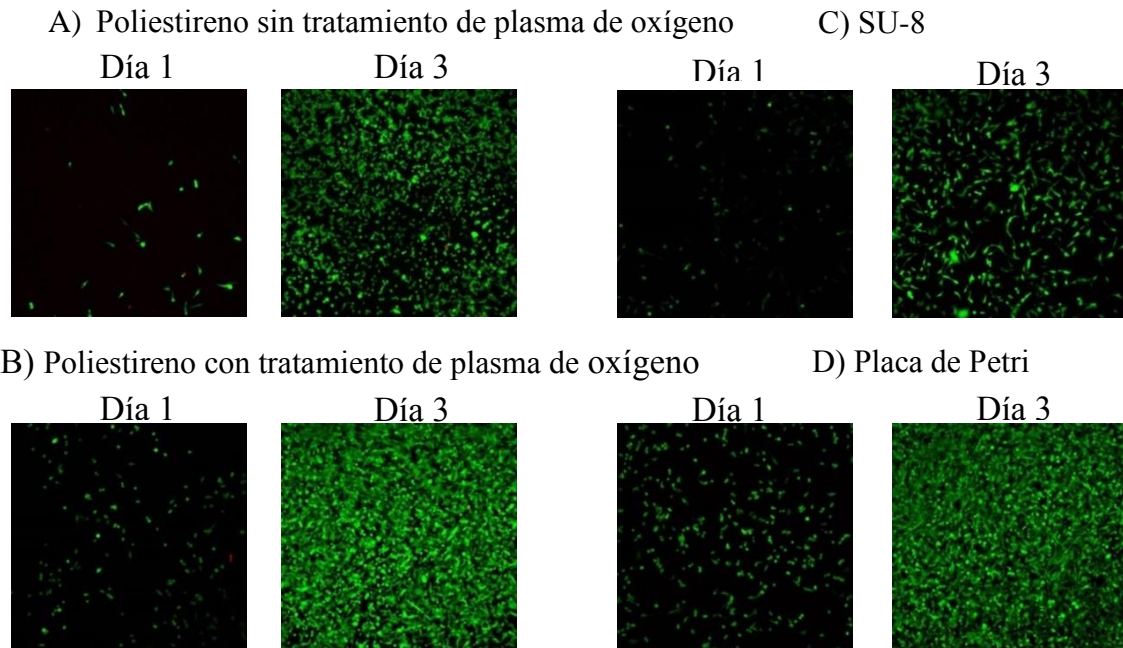


Figura 11. Ensayo de biocompatibilidad en distintos materiales utilizados para la fabricación de chips microfluídicos. Control negativo (disco de poliestireno sin tratamiento de plasma de oxígeno (A), disco de poliestireno con tratamiento de plasma de oxígeno (B), disco de SU-8 (C) y control positivo (poliestireno comercial para cultivo celular, fondo de la placa) (D).

En estos resultados podemos observar que, aunque a día 1 en la placa de Petri hay más células con respecto a los otros materiales, a día 3 la placa de Petri y el disco poliestireno tratado con plasma de oxígeno tienen una densidad celular similar. En cambio el resultado para SU-8 es más parecido al poliestireno sin tratar, con un crecimiento celular a 3 días mucho menor. Comparando los resultados de los dos materiales testados, observamos que los discos de poliestireno tratados con plasma tienen mejores propiedades para el cultivo celular que el SU-8.

4.1.2 ANÁLISIS DE ADHESIÓN CELULAR MEDIANTE MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

Habitualmente el parámetro preferido para cuantificar los resultados de este tipo de ensayos es la energía. La energía media de adhesión para el SU-8 fue de $3.50464 \times 10^{-14} \text{J}$ y para el poliestireno fue de $4.44 \times 10^{-14} \text{J}$. Éste último valor lo que se encuentra en rango para el poliestireno tratado para cultivo celular, que suele usarse a modo de control en este tipo de ensayos. Por lo tanto, el poliestireno ofrece una mayor adhesión para las células, siendo así, un buen sustituto para la fabricación del chip microfluídico.

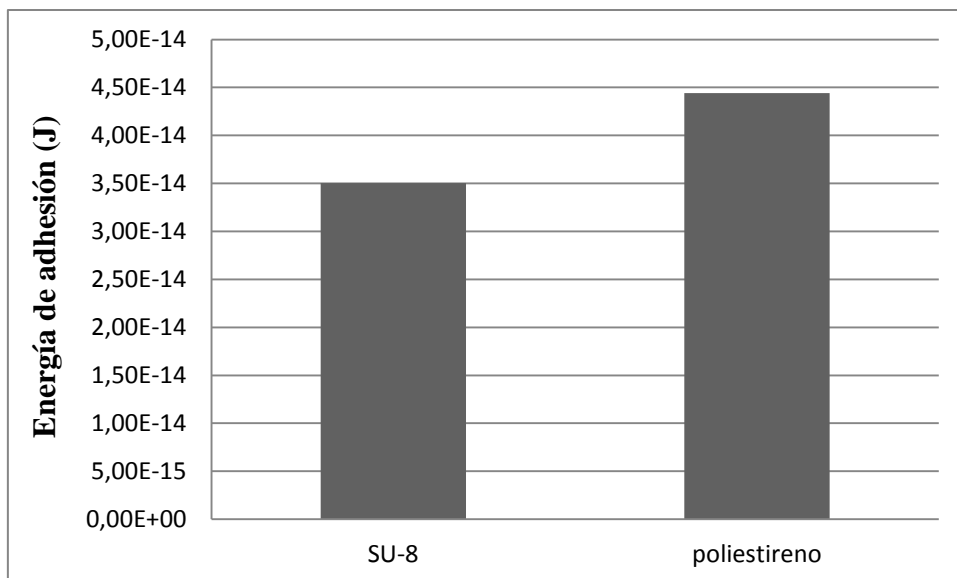


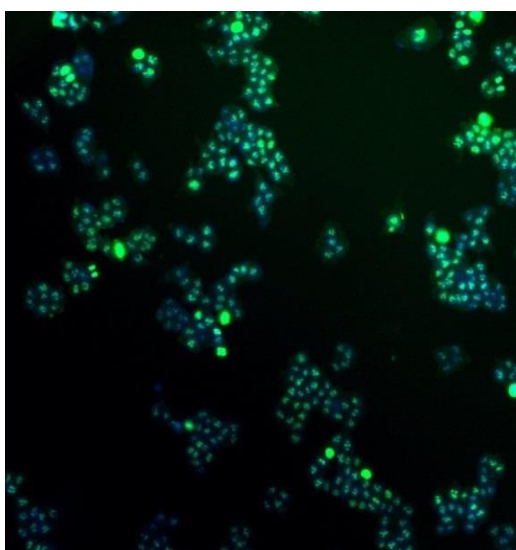
Figura 12. Representación gráfica de las energías de adhesión de las células MG-63 en cada material de fabricación de los chips, en SU-8 y en poliestireno.

4.2 ESTUDIO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

4.2.1 ESTUDIO DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE GLIOBLASTOMA MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

La detección de Ki-67, una proteína que se expresa durante la mitosis celular, mediante inmunofluorescencia permitió diferenciar aquellas células que se encontraban en división. La detección de Ki-67 se llevó a cabo en HCT-116 y en U-251.

Tumor de colon humano HCT116



Glioblastoma U251

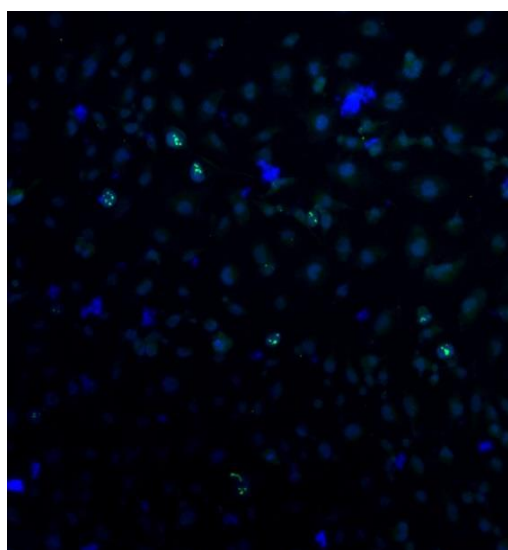


Figura 13. Comparación de la tasa de división celular entre células de glioblastoma (U251) y de tumor de colon humano (HCT116). Las células en división expresan ki-67 y las quiescentes no. Se ha detectado ki-67 mediante un anticuerpo primario anti-ki67 de ratón (dilución del stock 1:125 en solución 1% BSA y 0,1% Tritón X-100) y un anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 anti-ratón (dilución del stock 1:500 en solución 1% BSA y 0,1% Tritón X-100) que emite fluorescencia amarilla. También se han teñido los núcleos con DAPI que emite fluorescencia azul.

Tal y cómo se esperaba, la proporción de células en mitosis en HCT-116, la línea celular de cáncer de colon, es muy elevada. Por otro lado, la tasa de proliferación de las células de glioblastoma, U-251, es muy baja, menor del 5%. Concordando con los datos obtenidos de pacientes, que también muestran una baja tasa de proliferación.

4.2.2 ESTUDIO DE TOXICIDAD DE TEMOZOLAMIDA (TMZ) EN CULTIVO 2D DE GLIOBLASTOMA

En el control y en el DMSO se observa un crecimiento celular positivo similar en ambos casos sin diferencia significativa (p -valor $>0,05$). En cambio en los cultivos de glioblastoma tratados con la TMZ se observa una caída significativa del crecimiento celular hasta llegar a densidades celulares parecidas a las del día 1.

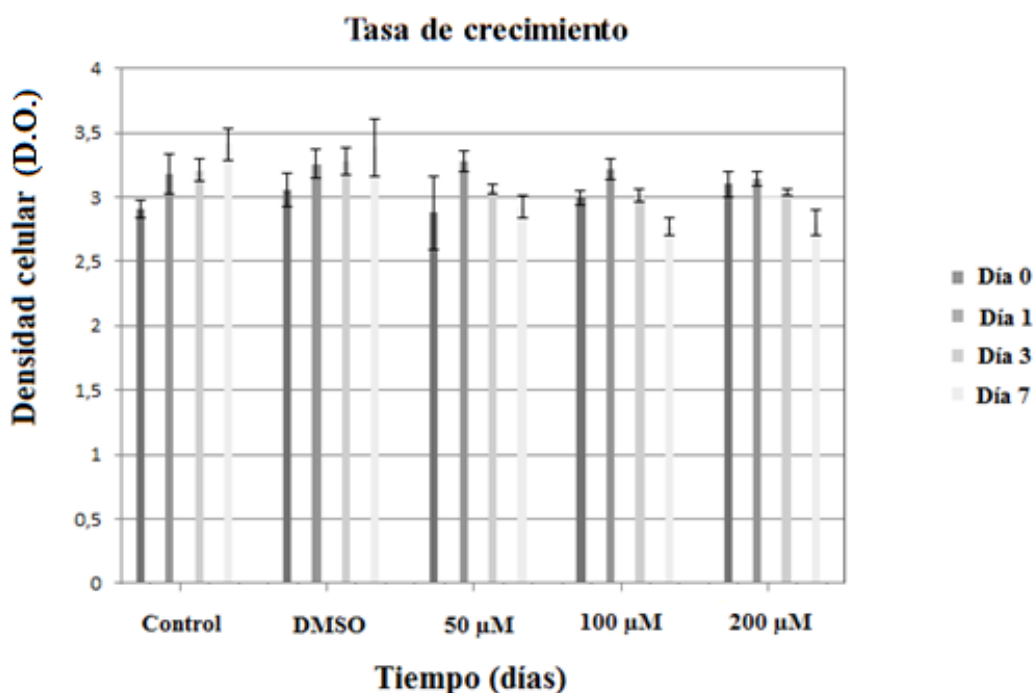


Figura14. Gráfica de barras donde observamos la tasa de crecimiento de cada cultivo al expresa la densidad celular frente al tiempo en días. En rojo el control, en verde la TMZ 50µM, en naranja la TMZ 100µM, en azul la TMZ 200µM y en amarillo el DMSO.

En todos los casos vemos que la TMZ ha reducido la proliferación de las células U-251, pero no hay mucha diferencia entre las distintas concentraciones de TMZ. En principio a mayor concentración de TMZ esperábamos observar mayor mortalidad. Por este motivo a día 7 realizamos una tinción vital con FDA e IP para observar al microscopio de fluorescencia cada cultivo y compararlos entre ellos para ver si se corresponde a los resultados obtenidos con el prestoblue.

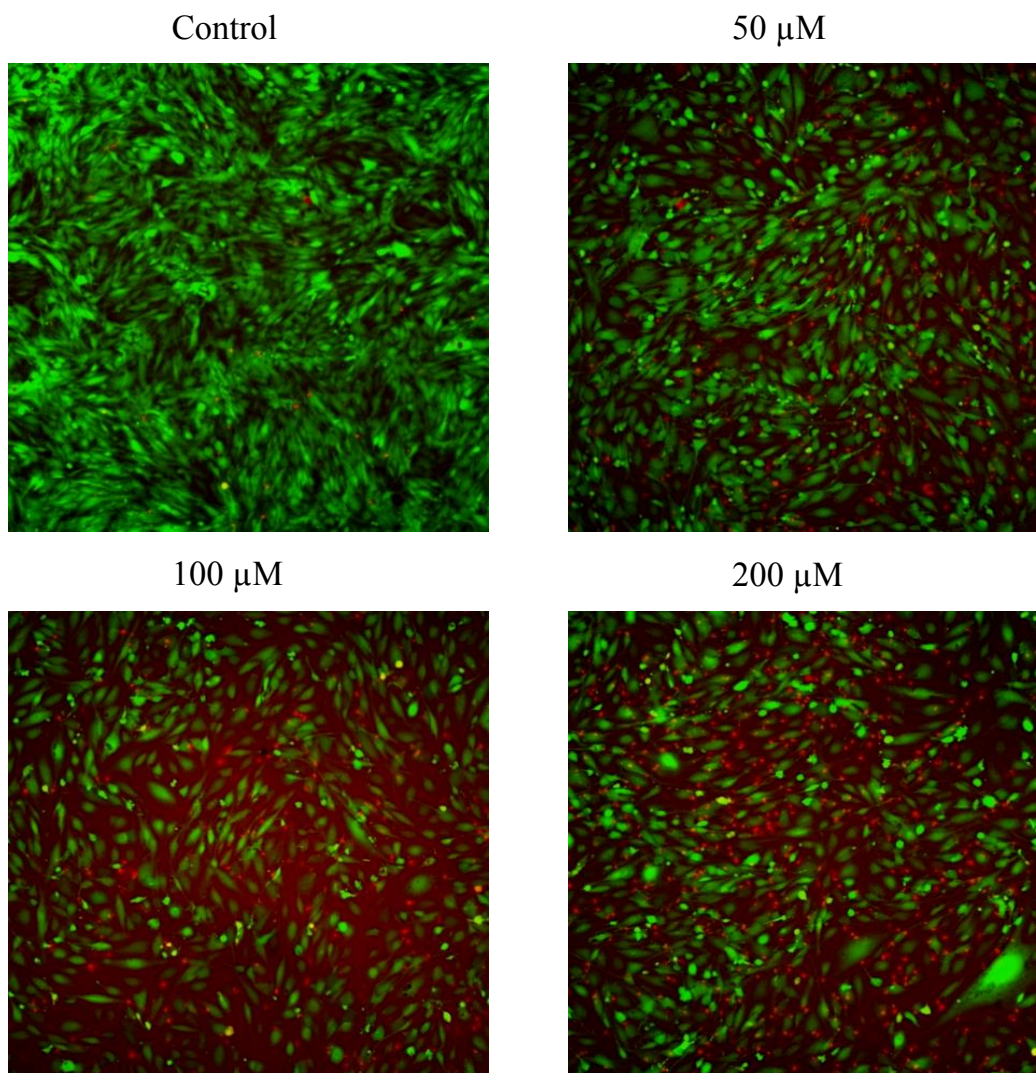


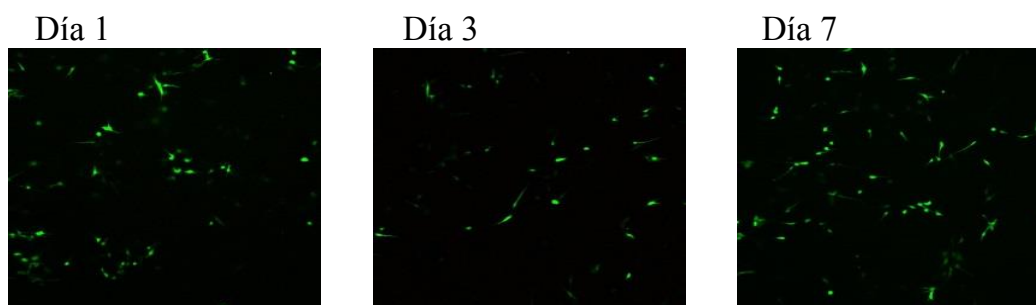
Figura 15. Tinción con FDA e IP de células cultivadas en 2D después de 7 días tratadas a distintas concentraciones de TMZ: control sin TMZ y a 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M de TMZ. Las células verdes son viables y las rojas no viables.

Mediante esta tinción se puede observar el efecto de la TMZ sobre las células de forma individual, viendo que en los pocillos con el fármaco hay mucha más mortalidad celular que en los pocillos control o con DMSO. En este caso también vemos la relación esperada entre concentración de TMZ y mortalidad celular; a mayor concentración de TMZ se da una mayor mortalidad. El motivo de esta discrepancia entre los datos obtenidos por prestoblue y FDA/IP podría ser que el tiempo de exposición al prestoblue, para estas densidades celulares, es demasiado elevado. En estas condiciones, la relación entre absorbancia y cantidad de células ha dejado de ser lineal y no podemos relacionar directamente cantidad de células con intensidad de presto blue.

En las imágenes de 100 y 200 μ M TMZ se observa un fondo intenso de color rojo, a pesar de los tiempos de exposición en todas las condiciones se mantuvieron constantes. Creemos que este se puede deber a que parte de las células muertas por la TMZ habrían liberado sus componentes intracelulares al medio de cultivo, entre ellos los ácidos nucleicos. Estos componentes se encontrarían disueltos en el medio de cultivo y podrían reaccionar con el IP, generando este fondo de color rojizo.

4.2.3 ESTUDIO DE TOXICIDAD DE TEMOZOLAMIDA (TMZ) EN CULTIVO 3D DE GLIOBLASTOMA MEDIANTE FDA/IP

A) Control



B) TMZ 200 μ M

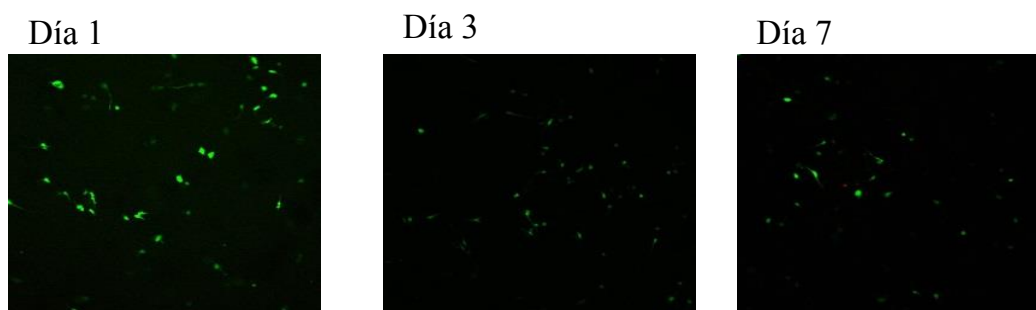


Figura 16. Ensayo de viabilidad celular mediante FDA e IP de células de glioblastoma U251 en un cultivo en 3D en un gel de colágeno de tipo I. Tinción vital del control a días 1, 3 y 7 (A) y tinción vital del cultivo celular tratado con TMZ a 200 μ M a días 1, 3 y 7 (B).

Por otro lado, en los ensayos en 3D el efecto de la TMZ sobre las U-251 es muy diferente. Aunque es cierto que también reduce la viabilidad celular, el efecto es mucho menor que en 2D.

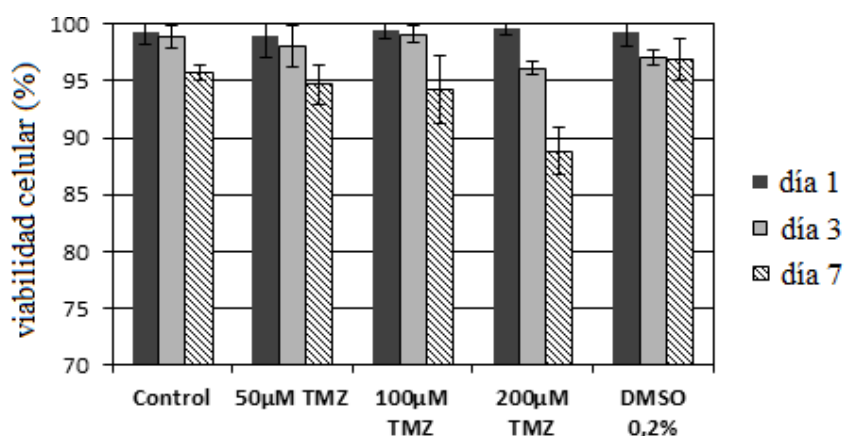


Figura 17. Representación gráfica de la viabilidad celular a días 1, 3 y 7 de cada experimento: control, TMZ 50 μ M, TMZ 100 μ M, TMZ 200 μ M y DMSO 0.2%.

Mientras que en el control, tras 7 días en cultivo, la viabilidad está en torno al 96%, en la TMZ la viabilidad es del 95%, 94% y 89% a 50, 100 y 200 μ M respectivamente. Hemos analizando la proliferación celular en los sistemas 3D y hemos comprobado que

tras los 7 días que duró el experimento el número de células ni siquiera se duplicó. Esto sugiere que en 3D estas células tienen una tasa de proliferación muy baja y por lo tanto apenas se verían afectadas por la TMZ cuando se encuentran embebidas en un ambiente 3D. No hay diferencia significativa entre la viabilidad en el control y el DMSO al 0,2%.

4.3 APLICACIÓN BIOMÉDICA DEL CHIP MICROFLUÍDICO

4.3.1 SIEMBRA Y CULTIVO DE CÉLULAS EN EL CHIP DE FLUJO EN ESTÁTICO Y CON FLUJO CONTÍNUO DE MEDIO DE CULTIVO

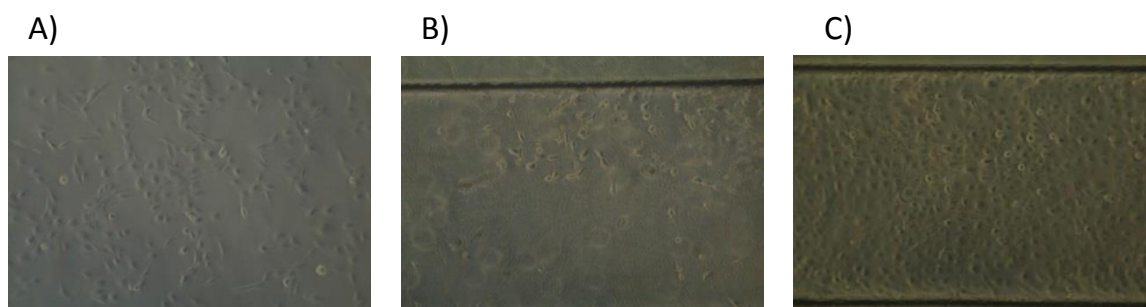
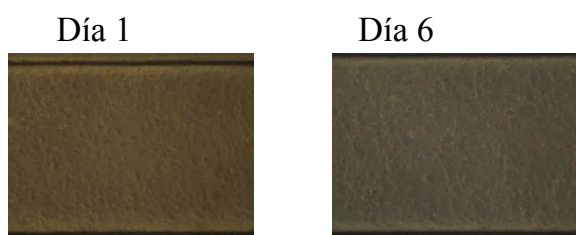


Figura 18. Ensayo a flujo en el chip microfluídico de flujo. Células MET5A en el frasco de cultivo (A), células MET5A a día 1 en chip de poliestireno sin tratamiento de plasma de oxígeno (B) y células MET5A a día 1 en chip de poliestireno con tratamiento de plasma de oxígeno (C).

En este ensayo se observó que en poliestireno sin tratamiento de plasma de oxígeno a día 1 las células tenían problemas de adhesión, y si se les aplicaba flujo la mayoría eran despegadas de chip a las pocas horas. Una vez tratados los chips con plasma de oxígeno se consiguió una buena adhesión celular y una morfología similar a la observada en el frasco de cultivo.

A) Chip de flujo con tratamiento de plasma de oxígeno en



B) Chip de flujo con tratamiento de plasma de oxígeno con flujo

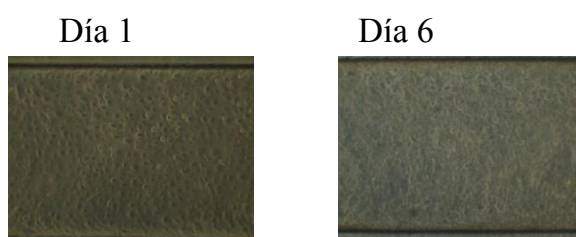


Figura 19. Evaluación de la orientación y morfología celular de MET5A dentro del chip microfluídico de flujo tratado con plasma de oxígeno (180 vatios 50 segundos 50% oxígeno) en un ensayo en estático (A) y otro con flujo continuo de medio de cultivo (B)

Con el tratamiento de plasma de oxígeno se consiguió mantener las células adheridas en la cámara de cultivo del chip tanto en estático como durante la aplicación de flujo continuo de medio de cultivo. De este modo se ha demostrado que el sistema es válido para llevar a cabo ensayos de estrés mecánico (estrés de cizallamiento) sobre las células. Se hizo una tinción con FDA/IP para evaluar la viabilidad tras 6 días en flujo continuo. En el control en estático el medio de cultivo fue renovado una vez al día de forma manual.

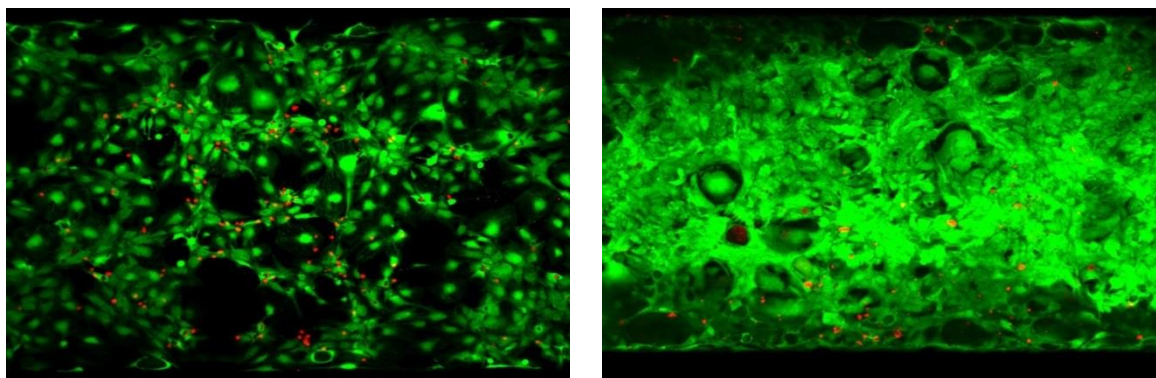


Figura 20. Tinción vital con FDA e IP de MET5A en un ensayo en chip microfluídico de flujo tratado con plasma de oxígeno (180 vatios 50 segundos 50% oxígeno) al cabo de 6 días en estático (A) y en condiciones de estrés mecánico por la aplicación de flujo continuo de medio de cultivo (B).

En la tinción con FDA/IP se observó que la viabilidad de las células MET5A en el ensayo a flujo era mayor que en estático. También se observó claramente que con la aplicación del estrés mecánico en el ensayo a flujo se veía modificada la morfología de las células.

5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto fin de grado se han llevado a cabo una serie de ensayos celulares empleando dispositivos microfluídicos. En primer lugar se ha evaluado la viabilidad y proliferación celular sobre los dos materiales empleados para la fabricación de microdispositivos. Tanto el SU-8 como el poliestireno mostraron una elevada viabilidad celular, aunque la proliferación/supervivencia en SU-8 era significativamente menor. Por otro lado, en el ensayo de adhesión celular mediante AFM, también es el poliestireno quien presenta una mejor adhesión para el cultivo celular. De este modo el poliestireno resulta ser un buen sustituto como material para la fabricación de los chips microfluídicos.

En ensayos de flujo con el chip microfluídico se ha conseguido cultivar células en sus cámaras de cultivo y se ha observado diferencias en el comportamiento celular entre un cultivo en estático y otro con flujo continuo de medio de cultivo.

Por la otra parte, en el estudio del GBM mediante el análisis de la proteína ki67 se ha podido detectar la proliferación de células U-251. Al igual que ocurre in vivo, esta línea celular posee una baja tasa de proliferación, especialmente si se compara con otros tumores como el tumor de colon humano. Además, comparando los resultados del cultivo de U-251 en 2D y en 3D, observamos que en 3D esta proliferación es incluso mucho menor que en 2D. En concordancia con esto, observamos que en el cultivo en 2D la TMZ causa una elevada mortalidad, ya que en estas condiciones las células se dividen. En cambio en 3D las células no se dividen y la TMZ no tiene apenas efecto terapéutico que se espera sobre las U-251. De esta manera se puede entender el porqué de la baja efectividad este fármaco ya que solo consigue alargar la media de supervivencia 2 meses.

El siguiente paso en esta línea para poder estudiar más a fondo el glioblastoma sería realizar ensayos con gradientes de oxígeno y nutrientes dentro del chip de gradiente y observar el proceso de invasión celular.

5. CONCLUSIONS AND DISCUSION

In this final degree project we have carried out a series of cellular tests using microfluidic devices. First, we evaluated the viability and proliferation of both materials used for manufacturing microdevices. Both the SU-8 as polystyrene showed a high cell viability but the proliferation/survival in SU-8 was significantly lower. Moreover, in the cell adhesion test, using AFM, polystyrene has also better adhesion to the cell culture. Therefore, polystyrene proves to be a good substitute as a material for microfluidic chips.

In the flow tests we cultured cells in their culture chambers with the microfluidic chip. We also observed the differences in cell behavior between a static culture and a continuous flow of culture medium.

On the other hand, in the study of GBM using protein Ki67 proliferation of U-251 cells were detected. As in in vivo, this cell line has a low proliferation rate, especially when compared with other tumors including human colon tumor. Furthermore, by comparing the results of U-251 culture in 2D and 3D we note that in 3D this proliferation is even much lower than in 2D. In line with this, it's worth mentioning that in 2D culture TMZ causes high mortality, since under these conditions the cells divide. In contrast, 3D cells don't divide and TMZ has almost no expected therapeutic effect on U-251. This way, we can understand the reason for the low effectiveness of this drug as it's only able to extend median survival to 2 months.

The next step in further studies in this line of glioblastoma would be testing with gradients of oxygen and nutrients within the chip gradient and to observe the process of cell invasion.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Freshney RI, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Wiley-Liss, Fifth edition 2005.
2. Pablo E, Gil-Loyzaga, *Cultivo de células animales y humanas, aplicaciones en medicina regenerativa*, Editorial Vision libros 2011 (páginas 18-19)
3. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of The Cell*, Garland Publishing Inc. tercera edición (página 167)
4. Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide
5. Dongeun Huh, Geraldine A. Hamilton and Donald E. Ingber, *From 3D cell culture to organs-on-chips*, Vol. 21 Trends in cell biology 2011, Páginas 745–754
6. Revista Cuba de Física, *Microfluidos: ¿cuánto hay de nuevo*, vol. 25, No. 2B 2008 páginas 142-149.
7. B.H. Lapizco-Encinas, *Revista Mexicana de Ingeniería Química, Aplicaciones de microfluídica en bioseparaciones*, Vol. 7, No. 3 (2008) páginas 205-214.
8. Krishnamurthy V. Nemani, Karen L. Moodie, Jeffry B. Brennick, Alison Su, Barjor Gimi, *Materials Science and Engineering: In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility*, Volumen 33 2013, Páginas 4453–4459
9. Nexant Chem systems. PERP Program-polystyrene. New report alert, 2006. http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/abstracts/0405_4_abs.pdf
10. Daniel J. Brat, MD, PhD. *Glioblastoma: Biology, Genetics, and Behavior*, Educational Book 2012.
11. Daniel J. Brat, Amilcar A. Castellano-Sanchez, Stephen B. Hunter, et al. *Actively Migrating Cell Population Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by anPseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic*, *Express. CANCER RESEARCH* 64, 920–927, February 1, 2004
12. R. Stupp, W, et al., Mirimanoff, *Concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) for newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM). Conclusive results of a randomized phase III trial by the EORTC Brain & RT Groups and NCIC Clinical Trials Group*, *Journal of Clinical Oncology*, 2004