



Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio de la respuesta endotelial a estímulos mecánicos presentes en los vasos sanguíneos.

Study of the endothelial response to mechanical stimulation in blood vessels.

AUTORA:

Lorena Barreda Abillá

DIRECTORAS:

Estefanía Peña Baquedano

Itziar Ríos Ruiz

CURSO ACADÉMICO:

2020-2021

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MECÁNICA

Agradecimientos

En primer lugar, gracias Itziar por todos los ratos que hemos compartido durante este año, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por tu dedicación y tu tiempo, pero sobre todo, gracias por ayudarme a entender que a veces las cosas no salen como se esperan pero que también es una forma de aprender.

Gracias a todos los profesores que durante mi vida académica me han animado a seguir adelante, y que, de alguna forma o de otra, han dejado huella.

A mis compañeras de clase, ha sido una suerte haber vivido con vosotras estos 4 años y haber crecido tanto a vuestro lado. Me llevaré siempre un pedacito de cada una de vosotras.

Reservo el último párrafo para mi familia y amigos, gracias por creer en mi incondicionalmente y por dejaros la piel para que cumpla todas mis metas. Gracias Arnau, por acompañarme durante todo el camino.

Gracias por enseñarme a luchar por lo que merece la pena conseguir.

ÍNDICE

<i>1. Introducción</i>	2
<i>1.1 Patología</i>	2
<i>1.2 Estado del arte</i>	4
<i>1.3 Objetivo</i>	6
<i>2. Materiales y métodos</i>	6
<i>2.1 Dispositivo microfluídico</i>	6
<i>2.2 Cultivo celular</i>	8
<i>2.3 Ensayos de flujo</i>	10
<i>2.4 Bomba OBI</i>	12
<i>2.5 Tinciones</i>	12
<i>3. Resultados: Análisis de imagen y procesado</i>	16
<i>3.1 Ensayo estático</i>	17
<i>3.2 Ensayo de flujo bajo</i>	18
<i>3.3 Ensayo de flujo alto</i>	19
<i>4. Discusión</i>	21
<i>5. Conclusiones</i>	23
<i>6. Bibliografía</i>	24

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic alteration that affects blood vessels and belongs to cardiovascular diseases, which are the main cause of death in industrialized countries.

High levels of low-density lipoproteins (LDL) in the bloodstream favor the appearance of atheroma plaques which are a cardiovascular risk. High amounts of lipoproteins can accumulate in subendothelial space causing the progressive narrowing of a blood vessel. Atherosclerosis usually occurs in areas of bifurcation, which have in common a disturbed blood flow.

Blood flow can modify shape and orientation of endothelial cells. Both cell features are related to blood vessel permeability. When permeability increases, lipoproteins cross the wall more easily which facilitates the accumulation. Therefore, studying the influence of blood flow on endothelial cells is a critical step to understand this pathology.

In this work, microfluidic tests have been developed and performed with Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) to analyse their response to blood flow by studying their shape and orientation through an image analyze program that postprocesses the information obtained in the microscope.

RESUMEN

La aterosclerosis es una alteración crónica que afecta principalmente a las arterias y que pertenece al grupo de enfermedades cardiovasculares, que son la principal causa de muerte en países industrializados.

La presencia de niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el torrente sanguíneo favorece la aparición de placas de ateroma que suponen un riesgo cardiovascular. Cuando las lipoproteínas se encuentran en exceso pueden acumularse en el espacio subendotelial donde son oxidadas produciendo como efecto final el endurecimiento del vaso sanguíneo y la reducción de su diámetro. La formación de placas de ateroma se produce, con mayor frecuencia, en las zonas de bifurcación donde se observa un flujo sanguíneo turbulento.

Las células del endotelio son susceptibles al flujo sanguíneo, ya que pueden modificar su forma y orientación dependiendo del mismo. Estas dos características de las células están directamente relacionadas con la permeabilidad del vaso. Cuando se produce un aumento de la permeabilidad, las lipoproteínas atraviesan la pared con mayor facilidad favoreciendo la acumulación. Por ello, estudiar la influencia del flujo sanguíneo sobre las células endoteliales es un paso crítico para entender esta patología.

Durante este trabajo se han desarrollado ensayos microfluídicos con células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVECs) para analizar su respuesta al flujo sanguíneo estudiando su forma y orientación a través de técnicas de procesamiento de imágenes obtenidas por microscopía.

1. *Introducción*

1.1 *Patología*

Comprender las enfermedades cardiovasculares es fundamental para poder prevenirlas y tratarlas ya que son la principal causa de muerte en los países occidentales (1). Destaca la aterosclerosis, patología caracterizada por el depósito de lípidos y otros componentes celulares, principalmente macrófagos y células musculares lisas (CML), en la zona íntima de las arterias (ver *Figura 1*). El mecanismo por el cual se produce la enfermedad conlleva eventos celulares y bioquímicos y su complejidad no ha permitido, hasta el momento, la comprensión íntegra del proceso. Por ello, trabajos que se centren en el estudio de esta patología son muy útiles para complementar la caracterización.

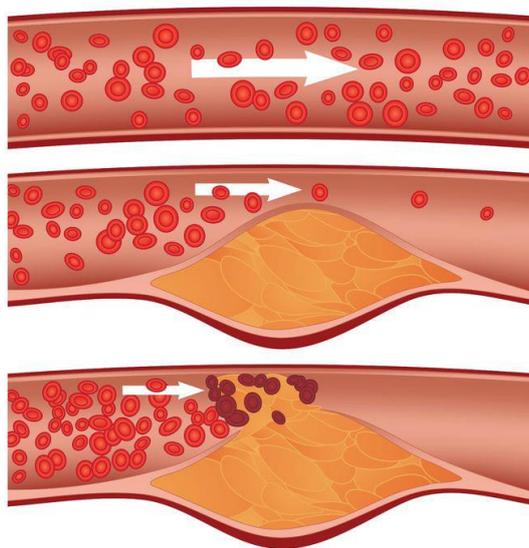


Figura 1. Proceso de formación de placa de ateroma. Lípidos y otros componentes celulares se depositan en la zona íntima del vaso sanguíneo reduciendo el flujo sanguíneo que lo atraviesa llegando, en algunos casos, a impedir su paso al completo. (2)

Es comúnmente aceptado que el desencadenante de la aterosclerosis es el daño en el endotelio de la pared vascular, que puede estar provocado por hipertensión arterial o por altos niveles de colesterol, que produce una respuesta inflamatoria especializada. También se están analizando otras posibles causas que desencadenen la formación de placas de ateroma como pueden ser el tabaquismo o la diabetes. (3)

Como consecuencia del daño producido en el endotelio aumenta la permeabilidad de las células permitiendo la entrada a los vasos sanguíneos de macromoléculas como son las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Cuando las LDL se encuentran en el interior del vaso son oxidadas al dejar de estar en contacto con los agentes antioxidantes de la sangre. Esto favorece la expresión

de moléculas de adhesión celular por parte de las células del endotelio que atrapan linfocitos T y monocitos en la pared. Además, las células endoteliales secretan moléculas señalizadoras, las quimiocinas, que atraen a los leucocitos.

Los monocitos reclutados en la pared del endotelio se diferencian a macrófagos que tratan de reducir las cantidades de lípidos mediante su fagocitosis. Durante el metabolismo de los lípidos fagocitados se generan ésteres de colesterol que se acumulan en el interior de los macrófagos que pasan a denominarse “células espumosas”. Las células espumosas en la zona íntima de las arterias generan las estrías grasas que es la lesión incipiente de las lesiones ateroscleróticas (4) (5).

Durante esta etapa, también se produce la activación de las plaquetas y la proliferación de células musculares lisas. Estas últimas, sintetizan y secretan proteínas de matriz extracelular formando una cubierta fibrosa que engloba el resto de los componentes de la placa de ateroma. La afectación coronaria es producida por la rotura o erosión de las placas que suele desembocar en la formación de trombos (ver *Figura 2*).

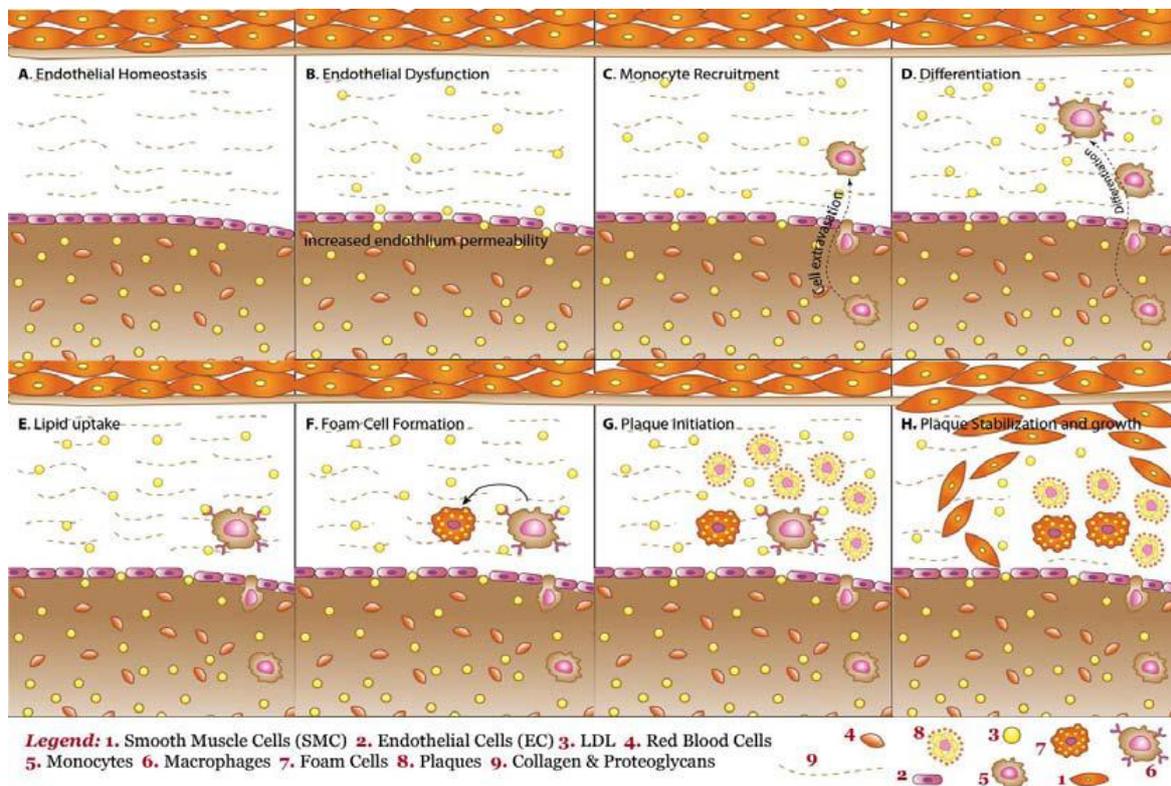


Figura 2. (A) Condición de homeostasis donde el vaso funciona correctamente. (B) Como resultado de una disfunción en el endotelio, se produce un aumento de la permeabilidad endotelial y las LDL pueden penetrar al vaso sanguíneo. (C) Debido a la presencia de estas moléculas, los monocitos son reclutados. (D) Los monocitos reclutados se diferencian a macrófagos. (E) Los macrófagos comienzan a fagocitar las moléculas de LDL presentes en los vasos. (F) Cuando los macrófagos acumulan mucho lípido, se transforman en las células espumosas. (G) Las células espumosas se acumulan y comienza la formación de la placa de ateroma. (H) Las células musculares lisas por la presencia de las células espumosas sufren una transformación y secretan proteínas que generan la cubierta de la placa. (3)

1.2 Estado del arte

Un aspecto primordial en la formación de las placas de ateroma es la permeabilidad del endotelio. Cuando aumenta la permeabilidad, las macromoléculas atraviesan con más facilidad al vaso sanguíneo aumentando las posibilidades de desarrollar la enfermedad.

Se piensa que el Wall Shear Stress (WSS) es el principal factor mecánico que afecta a la permeabilidad. Se define como la fuerza tangencial ejercida por el fluido sobre la pared del conducto por el que fluye. Las células endoteliales son capaces de detectar esta fuerza a través de mecanorreceptores, iniciando una cascada de transducción que concluye con cambios en la morfología celular.

Un flujo sanguíneo laminar implica altos niveles de WSS y eso conlleva un efecto protector de aterosclerosis, ya que, en este caso, las células se elongan y orientan en la dirección del flujo produciendo una menor permeabilidad. Sin embargo, en determinadas zonas donde el flujo es turbulento, el WSS puede ser bidireccional e irregular por lo que las células se encontrarán redondeadas y sin una orientación prevalente por lo que la permeabilidad será mayor. (6)

Simulaciones dinámicas de fluidos basados en autopsias de arterias coronarias, bifurcaciones carótideas y aortas abdominales distales muestran una correlación entre las zonas donde se produce la aterosclerosis y niveles bajos de WSS. Esto se apoyó mediante experimentos en modelos animales. (5)

Debido a la influencia directa del WSS sobre la permeabilidad celular, se han desarrollado múltiples dispositivos microfluídicos para simular diferentes condiciones de flujo. Durante este trabajo se ha utilizado uno de esos dispositivos con dos zonas diferentes de WSS sobre las que se han cultivado las células para el estudio de su forma y orientación y obtener la respuesta celular a estas condiciones.

Hay varios estudios publicados previamente que han utilizado la microfluídica para la investigación vascular. Los dispositivos microfluídicos son muy utilizados ya que presentan diversas ventajas para la manipulación y análisis de los cultivos celulares. Entre ellas, destaca que el tamaño es reducido por lo que se requiere una cantidad limitada de reactivos y medios lo cual puede ser beneficioso. Además, utilizar estos dispositivos conlleva una renovación continua de medio fresco para las células. En líneas generales se dividen en dos tipos según el dispositivo microfluídico utilizado: de forma cónica o de canales. (9)

Brevemente, los dispositivos de forma cónica o de platos paralelos se componen de una placa donde se siembran las células y un cono o una placa paralela a la anterior que provoca el WSS mediante la rotación en el medio de cultivo. La rotación se produce a través de un eje ortogonal a la placa inferior. Este sistema presenta múltiples ventajas como una homogeneidad del estímulo, la facilidad de muestreo y la sencillez del dispositivo. (ver ***Figura 3***) (9)

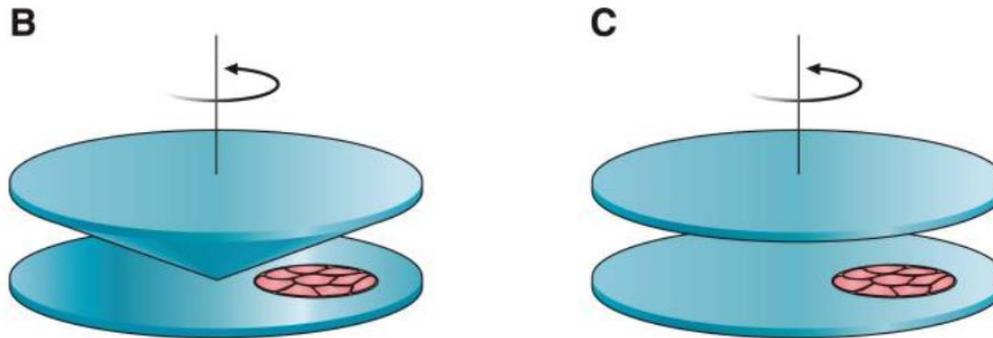


Figura 3. (B) Dispositivo de cono y plato (C) Dispositivo de platos paralelos. (9)

Por otro lado, los dispositivos microfluídicos de canales son también muy utilizados. Consiste en un canal longitudinal que normalmente contiene un escalón debajo del cual se produce una recirculación del flujo que concluye con un flujo laminar unidireccional. Las células adheridas al dispositivo se encuentran en monocapa y se puede analizar directamente su respuesta frente al flujo aplicado. (Ver **Figura 4**)

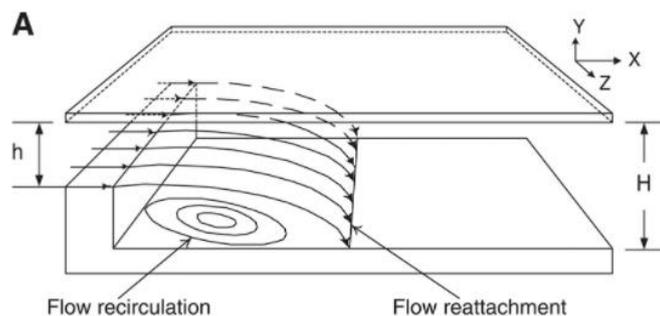


Figura 4. Diagrama esquemático de el canal en el dispositivo microfluídico y el patrón de comportamiento del flujo después del escalón.

La mayoría de los dispositivos microfluídicos para trabajar con células son elaborados con PDMS porque es un material biocompatible, barato y transparente (8). Las células endoteliales responden de la misma forma al flujo, es decir, se orientan y se alargan en la dirección del mismo, pero a diferentes niveles de WSS. En el caso de las células endoteliales de las arterias, como las BAEC o HCAEC, se observa respuesta para valores de WSS entre 1-8 Pa mientras que para las endoteliales de las venas, como las HUVEC, entre 0.1-0.6 Pa. (10)

Normalmente en los estudios publicados, no se cuantifican los cambios de forma sino que se analizan cualitativamente y es interesante realizar la cuantificación para poder utilizar esa información en la elaboración de modelos computacionales.

1.3 Objetivo

El objetivo de este trabajo es analizar la orientación y forma de células endoteliales HUVEC en función del Wall Shear Stress (WSS) al que se someten.

Para ello, las células son cultivadas en unos dispositivos microfluídicos con tres canales, cada uno de ellos con dos zonas diferentes de WSS. El medio de cultivo fluye por los canales de forma continua gracias a una bomba simulando lo que ocurre *in vivo* con el flujo sanguíneo. Se analiza el comportamiento de las células endoteliales a valores de flujo de 2.5 y 3.5 ml/min mediante ensayos de 24h de duración.

Dada la importancia de la permeabilidad del endotelio en el proceso de formación de las placas de ateroma y su relación directa con la forma y orientación celular, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser ventajosos para estudios futuros de caracterización de la patología. El siguiente paso podría ser analizar el comportamiento de las células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC).

2. Materiales y métodos

2.1 Dispositivo microfluídico

Para estudiar la respuesta celular frente al WSS se requiere un dispositivo sólido que albergue las células donde se experimenten valores distintos de dicho estrés, por encima y por debajo del valor fisiológico. El rango fisiológico para células HUVEC en el que cabría esperar orientación es 1-6 dyn/cm² (0.1- 0.6 Pa). (10)

El WSS se define como τ_w y es directamente proporcional al producto de la viscosidad (μ) por el gradiente de velocidad (v) dividido entre la distancia entre placas (h). (ver ***Ecuación 1***).

$$T_w = \mu * \frac{v}{h} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El dispositivo microfluídico se compone de tres canales donde se van a cultivar las células. Cada uno de los canales contiene un contra escalón, es decir, una reducción en la altura del canal que permite diferenciar dos zonas con diferente WSS (ver ***Figura 5***).

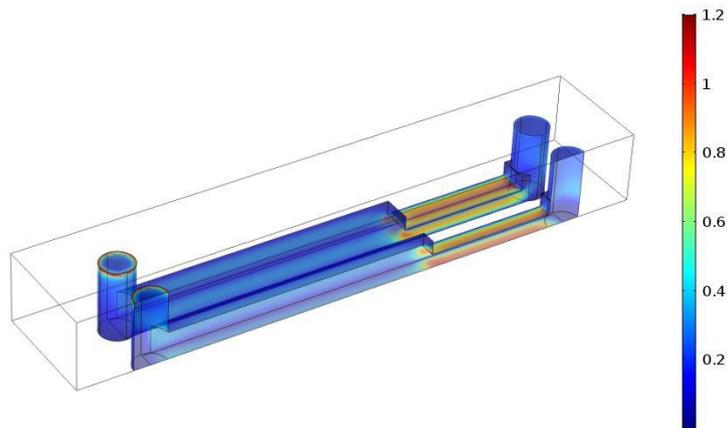


Figura 5. Representación estructural del dispositivo microfluídico. Se observan dos áreas con diferente WSS (medido en Pa) que se muestran en la barra de color. El flujo se desplaza de izquierda a derecha.

El material seleccionado para la elaboración de los dispositivos es el PDMS cuyo comportamiento mecánico fue caracterizado mediante ensayos de tracción en el Laboratorio de Caracterización de Tejidos y Biomateriales del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A).

El PDMS se elabora a partir de un kit de la marca DOWSIL™ que contiene la silicona base y un agente curante que se mezclan en proporción 10:1 en peso. La mezcla se centrifuga a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y se mantiene a -20 °C mínimo durante una noche para homogeneizar las propiedades mecánicas.

Para la elaboración del dispositivo se requiere un molde sobre el cual se adiciona el PDMS (ver **Figura 6**). El molde se ha elaborado a partir de una resina fotocurable. Una de las características imprescindibles en la selección del material era que no hubiera intercambio de masa en el horno mientras se curaba el PDMS ya que esto podría conllevar problemas de citotoxicidad en las células.

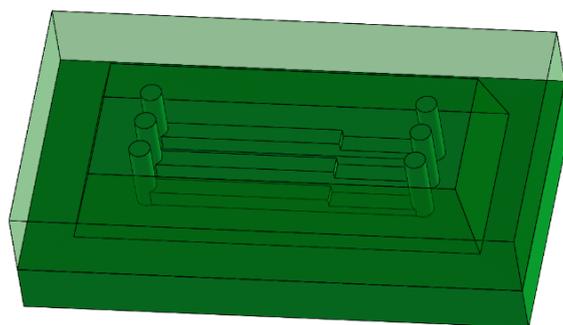


Figura 6. Representación estructural del molde para la elaboración del dispositivo microfluídico obtenido a partir del software de modelado mecánico SolidWorks.

Cuando se adiciona el PDMS al molde es importante evitar la formación de burbujas que comprometerían la esterilidad de los canales o impedirían una posterior visualización de los mismos. Para ello, se utiliza la máquina de vacío que permite eliminarlas. Una vez añadido todo el PDMS se cura en la estufa a 60°C durante toda la noche. Finalmente, se separa el dispositivo formado del molde y se pega a una base de PDMS que también ha sido curada en la tapa de una placa de Petri (ver *Figura 7*).

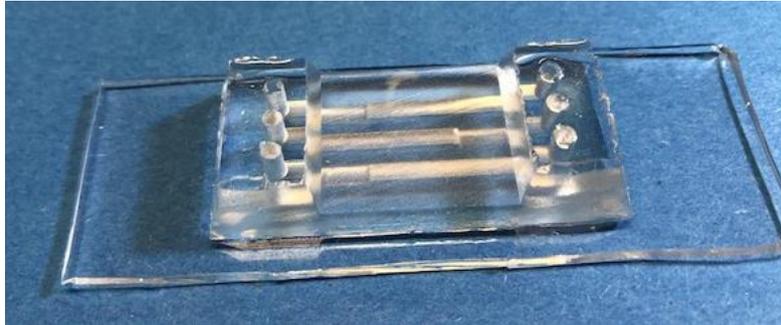


Figura 7. Resultado final del dispositivo microfluídico.

Antes de cultivar las células en el dispositivo, debe ser autoclavado a 120°C durante 20 minutos para asegurar que nos encontramos en condiciones de esterilidad.

2.2 Cultivo celular

Las células utilizadas para la caracterización de la orientación y forma con respecto del flujo son las HUVEC, células endoteliales aisladas a partir de cordón umbilical humano.

Las células se encuentran congeladas en nitrógeno líquido y cada uno de los criotubos contiene medio millón de células con medio de cultivo y DMSO como criopreservante. Para iniciar un ensayo, las células se sacan del tanque y se introducen en el baño a 37°C aproximadamente un minuto (hasta antes de que se terminen de descongelar completamente) para evitar la toxicidad del DMSO sobre las células. Se coge todo el volumen (1 ml) y se añade a un flask de 25 cm². Las células se crecen en una incubadora a 37°C con 5% CO₂. El medio se cambia cada 48 horas para evitar su agotamiento y por lo tanto la muerte de las células. Una vez las células se encuentran en fase de confluencia son cultivadas en el dispositivo microfluídico para la elaboración del ensayo.

Las células son crecidas con medio MesoEndo Cell Growth Medium (212-500) de Sigma-Aldrich. Como el objetivo es caracterizar lo que ocurre *in vivo* cuando se produce la aterosclerosis, el flujo del medio en el dispositivo microfluídico debe poder compararse con el flujo sanguíneo. La viscosidad del medio (0,95 mPa.s) se encuentra muy por debajo de la viscosidad de la sangre (4-4.5 mPa.s) por lo que añadimos un componente que aumente dicha viscosidad, el dextrano. (11)

Después de realizar las pruebas pertinentes, la solución debe contener 4.93% de dextrano (w/v) para simular el ambiente fisiológico y alcanzar una viscosidad de 3.9 mPa.s. La solución es filtrada con un filtro de Nylon de 0.2 µm para eliminar cualquier contaminación que haya podido ocurrir durante la preparación del medio que se incorpora en el dispositivo microfluídico.

Para cultivar las células en el dispositivo microfluídico, primero deben ser despegadas del flask en el que se encuentran, para ello, se retira el medio, se lava con PBS y se añaden 2 ml de tripsina. La tripsina favorece que las células se despeguen y cuando observamos en el microscopio óptico que la mayoría de las células ya no están pegadas en el flask, añadimos 3 ml de medio de cultivo que neutraliza la acción de la tripsina. Esos 5 ml son centrifugados a 1200 rpm durante 5 minutos y obtenemos un sobrenadante que desechamos y un pellet donde se encuentran todas las células que se resuspende en un determinado volumen de medio de cultivo.

Es importante conocer la densidad celular de las células en el flask (ver *Ecuación 2*) y para ello realizamos un conteo en el microscopio óptico a través de la Cámara de Neubauer (ver *Figura 8*) que nos indicará el volumen que debemos añadir al dispositivo en función de la cantidad de células que queremos tener en él.

La cantidad ideal de células sembradas por dispositivo es entre 300.000-400.000 células totales debido a que no todas se adherirán finalmente al dispositivo. Esta cantidad está optimizada para tener el número de células necesario para formar una monocapa sin que haya un exceso celular donde se transmitirían señales de muerte intercelulares.



Figura 8. Cámara de Neubauer o hemocitómetro que permite el conteo de células basado en cuatro cuadrantes para determinar la densidad celular de una muestra.

$$\text{Densidad celular (células/ml)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas} * 10^4 * \text{dilución}}{4 \text{ cuadrantes}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Previo a la siembra de las células, es necesario aumentar la reactividad del dispositivo microfluídico para favorecer la adhesión celular ya que el PDMS es un material hidrófobo y las células no se adherirían a la superficie sin el tratamiento. En primer lugar, el dispositivo se somete a la máquina de plasma de oxígeno y, en segundo lugar, se añade fibronectina (5µg/cm²)

junto con PBS en frío (para evitar su polimerización) a cada uno de los canales (3 μg de fibronectina por canal) y se deja actuar durante una hora. Ambos procesos van a contribuir a que las células queden adheridas con mayor facilidad.

Las células resuspendidas se cultivan en el dispositivo, repartidas entre los tres canales y se incuban durante la noche antes del tratamiento de flujo.

2.3 Ensayos de flujo

Antes de realizar los ensayos de flujo, es imprescindible que el sistema de tubos y el dispositivo microfluídico hayan sido previamente autoclavados para evitar las contaminaciones.

Los elementos requeridos son: una bomba peristáltica (Peristaltic Pump for Incubator G100-1J de Darwin Microfluidics), una serie de tubos que van a conectar todo el sistema, un frasco de 5 ml que contiene el medio de cultivo y el dispositivo microfluídico que contiene las células en monocapa. Además, añadimos un amortiguador que transforma los pulsos de flujo producidos por la bomba peristáltica en un flujo constante (ver *Figura 9*). Junto al medio de cultivo, es recomendable añadir la solución tampón HEPES ya que el incubador para microfluídica no contiene CO_2 .

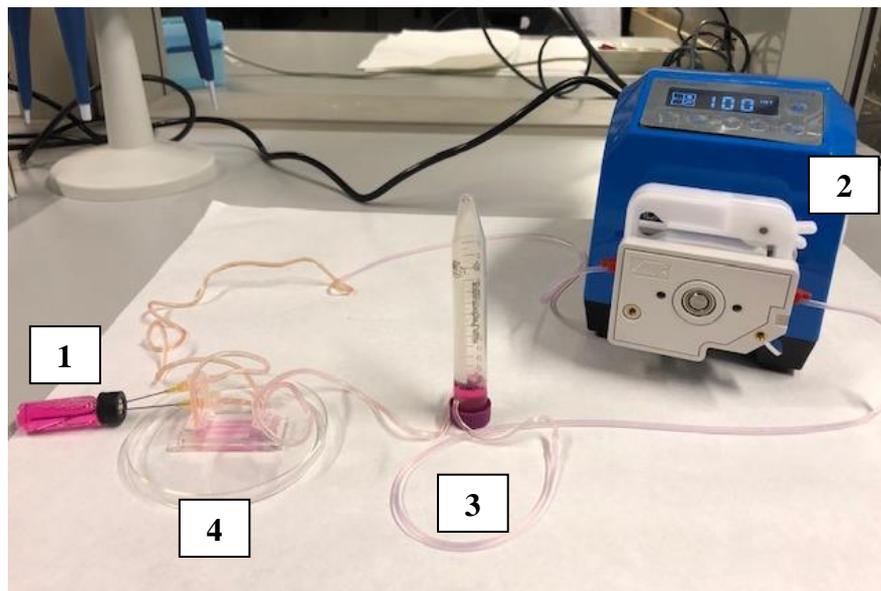


Figura 9. Estructura del montaje resultante compuesto de un reservorio de medio con dextrano (1), la bomba peristáltica (2), un amortiguador para unificar el flujo (3) y el dispositivo fluidoico que contiene las células en los canales (4). Todos los elementos se mantienen conectados a través de tubos que han sido previamente autoclavados.

Los valores de flujo que se aplican en los ensayos se seleccionan en función del WSS que generan calculado mediante un programa de simulación multifísica (COM SOL Multiphysics). Los flujos seleccionados para los ensayos celulares son: 2.5 ml/ min y 3.5 ml / min (ver *Tabla I*).

Flujo (ml/min)	WSS Alto (Pa)	WSS Bajo (Pa)	Rpm
2.50	0.55	0.16	41.7
3.50	0.77	0.23	58.3

Tabla 1. Representación de los valores de WSS en cada una de las dos zonas de cada canal del dispositivo en función del flujo aplicado. También, se indica el valor de rpm de la bomba de flujo asignado a cada flujo.

Para determinar a qué revoluciones por minuto (rpm) de la bomba peristáltica se obtienen los valores de flujo de interés, se realizan ensayos de calibración. En ellos, ponemos la bomba a distintos valores de rpm y vemos el volumen que se recoge al cabo de un minuto para fluidos en diferentes condiciones (PBS, PBS con dextrano y PBS con dextrano a 37°C). Con estas pruebas de calibración aseguramos la alta reproducibilidad de los ensayos ya que las variaciones observadas en el flujo son despreciables. Los datos obtenidos durante los ensayos de calibración se muestran en la **tabla 2**.

Rpm	Flujo PBS (ml/min)	Flujo PBS + dextrano (ml/min)	Flujo PBS + dextrano 37°C (ml/min)
41.7	2.5	2.5	2.6
42.0	2.6	-	-
58.0	3.4	-	-
58.3	3.5	3.5	3.5
59.0	3.6	-	-
75.0	4.5	4.5	4.4
80.0	4.7	-	-
100.0	5.9	-	-

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de calibración para la bomba peristáltica G100-1J de Darwin Microfluidics. Subrayados en gris los valores de rpm aceptados para la realización de los ensayos en los flujos deseados.

Antes de aplicar el flujo, se toman imágenes control de las células en los tres canales en el microscopio por contraste de fases. Esto nos permitirá obtener los cambios en la orientación y forma.

Una vez que tenemos el sistema cerrado, se aplica el flujo comenzando con velocidades bajas para asegurar que el medio no se sale por ninguna de las conexiones y que no hay aperturas que permitirían una contaminación, además de evitar un brusco arrastre inicial en las células.

Tras comprobar que el sistema es hermético, se selecciona el flujo de interés y se mantiene, en conjunto, durante 24 horas en el incubador. Este tiempo es suficiente para observar la respuesta de las células a flujo. (12)

Durante este periodo se van tomando imágenes para determinar el estado de las células a lo largo del tiempo. Las imágenes se toman a las 0, 2, 4, 8, 16 y 24h de ensayo. La frecuencia es mayor al inicio del ensayo ya que es cuando se aprecian los mayores cambios de morfología y orientación y así se tiene mejor caracterizado. (12)

Tras concluir el ensayo, las células pueden fijarse en el dispositivo para teñirlas o simplemente para observarlas con posterioridad. Para ello, se vacía el contenido de los canales del dispositivo microfluídico y se lava con PBS. Se añade paraformaldehído (PFA) al 4% y se deja actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se retira el PFA y el dispositivo microfluídico se conserva sumergido en PBS a 4°C.

2.4 Bomba OB1

De forma paralela, se puso a punto el ensayo con la bomba de presión OB1 y una válvula de inyección, Mux Inj de ElveFlow. Esta bomba permite aplicar shear stress de forma unidireccional sobre el chip. La válvula es bidireccional y permite realizar cambios entre dos configuraciones (bidireccional y pulsátil) haciendo que el medio de cultivo se desplace en un sentido o en el otro.

Debido a que solo se necesitaba un flujo unidireccional que se podía conseguir con la bomba peristáltica más sencilla, esta puesta a punto se dejó preparada para posteriores ensayos más complejos de flujos pulsátiles.

El montaje se compone de la bomba OB1 MK3 y controlador de flujo, un sensor de flujo, la válvula Mux Inj, el dispositivo microfluídico con las células y un reservorio de medio de cultivo (ver *Figura 10*).

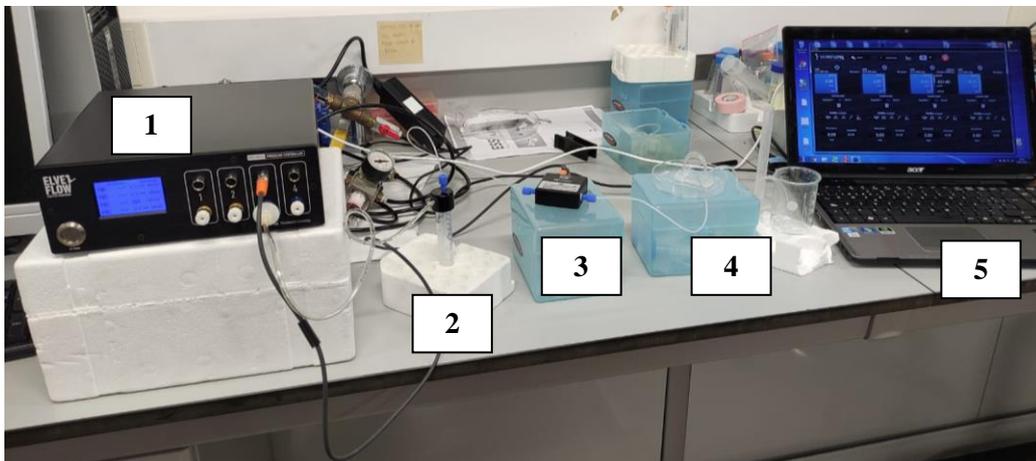


Figura 10. Montaje completo de la bomba OB1. (1) OB1 MK3 (2) Reservorio de medio de cultivo (3) Sensor de flujo (4) Dispositivo microfluídico (5) Ordenador controlador de flujo.

2.5 Tinciones

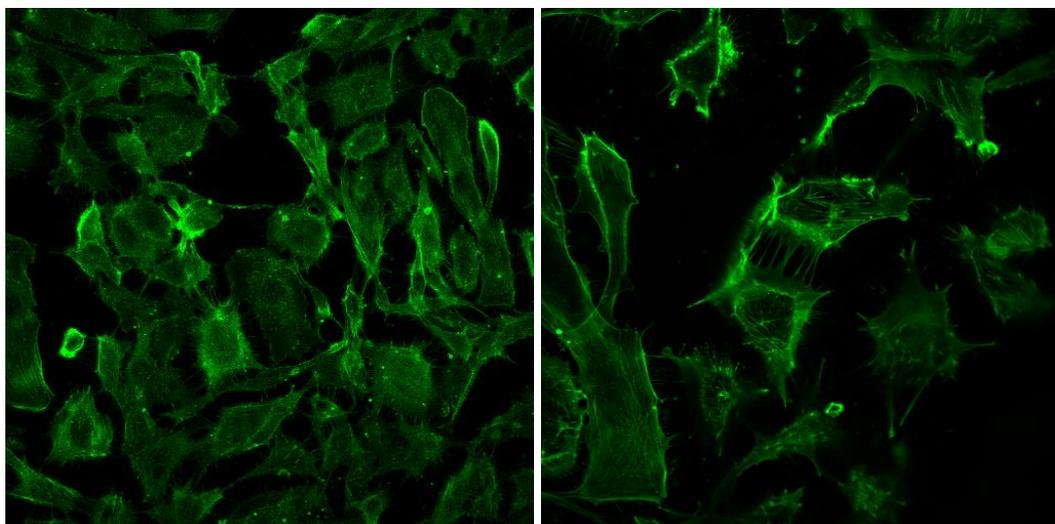
Para analizar las células al microscopio de una forma más visual realizamos una serie de tinciones que permiten conocer la morfología, orientación y adherencia entre las células.

❖ Actina

En primer lugar, la tinción de actina permite visualizar el citoesqueleto de las células. La actina es una proteína que se encuentra formando parte de los microfilamentos en el citoesqueleto de las células. El reactivo ActinGreen™ 488 Ready Probes™ de ThermoFisher es una sonda selectiva de F-actina conjugada con el colorante brillante de color verde y fotoestable.

El reactivo para la tinción de actina se aplica sobre células fijadas con PFA 4% y permeabilizadas con una solución de Tritón X-100. Se añaden dos gotas del reactivo por cada mililitro de medio de medio completo o solución tampón y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El tinte ActinGreen 488 presenta un máximo de emisión a 518 nm y puede detectarse a través de filtros estándar GFP o FITC (ver *Figuras 11 y 12*).



Figuras 11 y 12. Imágenes con el microscopio de fluorescencia de la tinción de actina. Se observan los filamentos alargados que componen las células. La imagen de la derecha se ha obtenido a 40 aumentos y la de la izquierda a 20 aumentos.

❖ CellRox

Por otro lado, nos interesa detectar el estrés oxidativo de las células al someterse al flujo para lo que utilizamos la tinción CellRox™ Deep Red de ThermoFisher. Se trata de una tinción que aplicamos sobre las células vivas una vez se ha añadido el estímulo para el cual queremos comprobar si se produce estrés oxidativo, en este caso el flujo.

El colorante cuando penetra en las células no presenta fluorescencia ya que se encuentra reducido mientras que, en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) se oxida y produce la fluorescencia.

Su nivel de emisión máximo se produce a 665nm y se puede detectar con las imágenes fluorescentes, pero también mediante citometría de flujo.

El reactivo debe añadirse a una composición final de 5 μ M e incubarse con las células durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se elimina el medio de cultivo y se lava con PBS.

Todavía no se ha logrado obtener imágenes representativas con esta tinción.

❖ DAPI

También nos interesa ver los núcleos de las células para visualizar mejor la morfología celular al microscopio. Para la visualización de núcleos utilizamos una tinción con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) que emite fluorescencia de color azul cuando se une a regiones AT del DNA (ver *Figura 13*).

Para realizar la tinción se parte de células fijadas con PFA 4% y permeabilizadas con Tritón X-100. Se añade el DAPI a una concentración de 300 nM sobre las células y se incuba 5 minutos protegido de la luz. Se retira el reactivo y se lava tres veces con PBS antes de la visualización al microscopio.

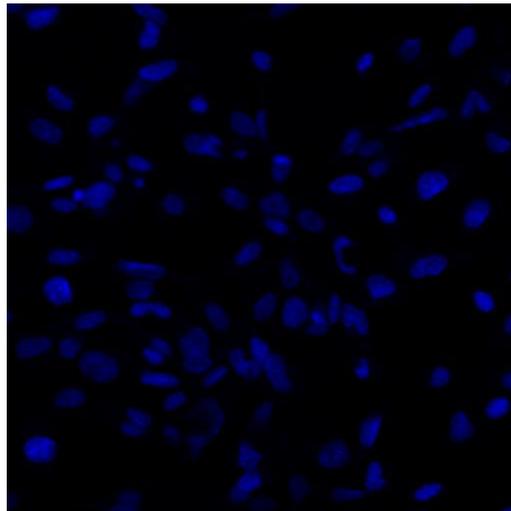


Figura 13. Tinción de núcleos de células fijadas con DAPI 300nM. Imagen obtenida a 40 aumentos.

En muchas ocasiones la tinción con DAPI, se encuentra combinada con otras tinciones ya que sirve de orientación para detectar las células (ver *Figura 14*).

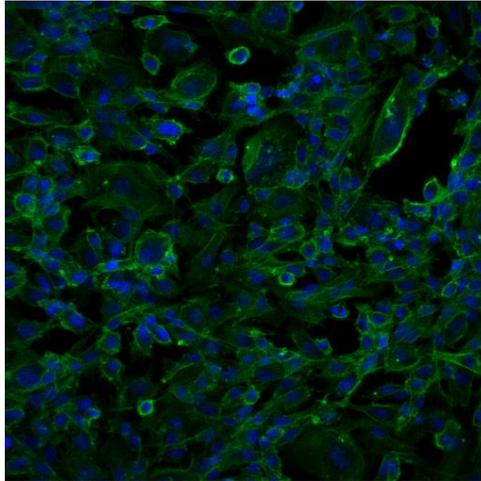


Figura 14. Tinción combinada de actina y DAPI. El DAPI tiñe de azul los núcleos celulares y la actina de verde los filamentos celulares. La imagen está obtenida a 20 aumentos.

❖ Cadherina

Se utiliza un primer anticuerpo de tipo monoclonal de ratón (tipo IgG2) que reconoce y une la parte extracelular de la VE-cadherina. Esta proteína se encuentra altamente expresada en las interacciones intercelulares de las células endoteliales como las HUVEC.

El anticuerpo secundario está dirigido contra la IgG de ratón obtenido en cabra. Se trata de un anticuerpo policlonal unido a AlexaFluor 555 ® por lo que produce fluorescencia en el rojo (ver **Figura 15**).

Partiendo de células fijadas con PFA 4%, se lavan con Tween 0,05% durante 5 minutos. Se permeabilizan con 0,1% de Tritón 100x durante 15 minutos. Trascorrido ese tiempo, se lava 3 veces con Tween 0,05%. Se bloquean las uniones inespecíficas con un 3% de BSA durante 30 minutos. Se añade el anticuerpo primario a una concentración de 3µg/ml y se incuba una hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, se incuba el anticuerpo secundario en dilución 1:1000 durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.

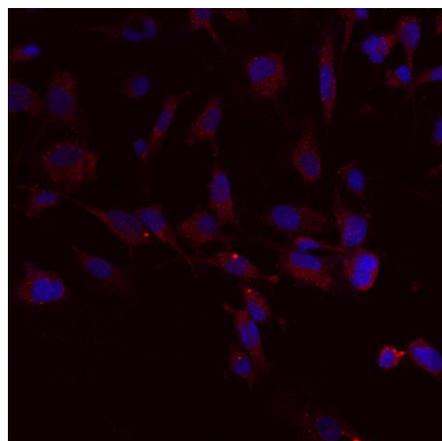
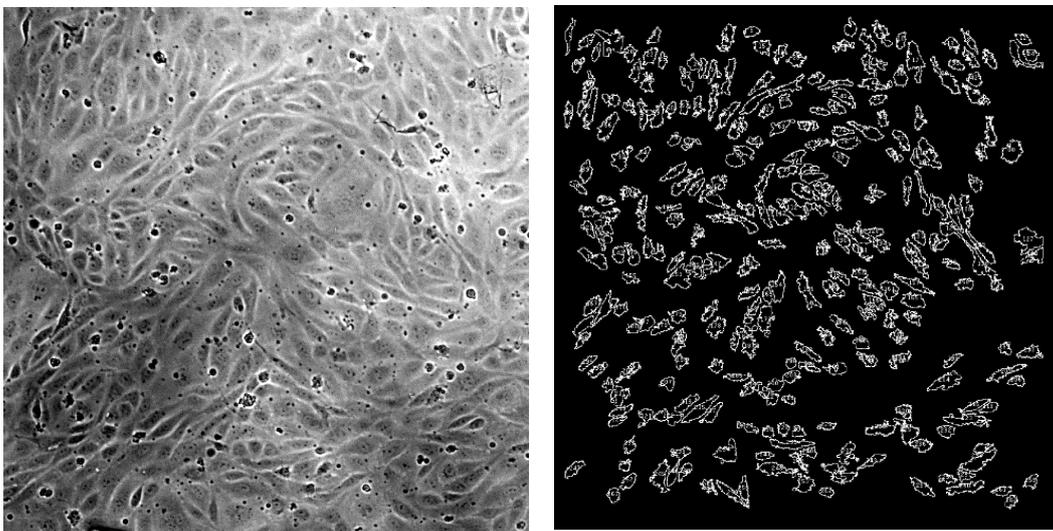


Figura 15. Tinción de DAPI y cadherina. Imagen obtenida a 40 aumentos. En rojo la tinción de cadherina y en azul el DAPI.

3. Resultados: Análisis de imagen y procesamiento

Las imágenes obtenidas tras finalizar los ensayos experimentales deben ser procesadas con un programa propio desarrollado en Mat lab para poder detectar las células en Fiji. Este último permite realizar operaciones y obtener información más extensa de las imágenes. En este caso, identifica las células dentro de la imagen y señala su contorno para realizar los cálculos (ver **Figuras 16 y 17**). A través de Fiji, se obtiene información sobre el índice de forma (Roundness) y la orientación (Angle) de las células.



Figuras 16 y 17. A la izquierda, imagen de las células HUVEC obtenida por microscopía. A la derecha, contornos de las células de la misma imagen detectados por Fiji.

El parámetro Roundness indica la circularidad de las células y se puede determinar con los datos de área y eje mayor (ver **Ecuación 3**). El eje mayor es la mayor distancia entre dos puntos opuestos en la célula. Los valores entre los que oscila son 0 y 1, siendo el valor 1 un círculo perfecto y próximos a cero células más alargadas.

$$\text{Roundness} = \frac{4 * \text{área}}{(\pi * \text{eje mayor})^2} \quad (\text{Ecuación 3})$$

El parámetro Angle indica el ángulo entre el eje principal y una línea paralela al eje X de la imagen aportando información sobre la orientación de las células. En estos ensayos, el eje X coincide con la dirección en la que se desplaza el flujo.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el ensayo estático, ensayo de flujo bajo (2.5 ml/min) y flujo alto (3.5 ml/min).

3.1 Ensayo estático

En el ensayo estático las células no están sometidas a ningún flujo por lo que no se espera ningún cambio de forma ni orientación. El estado de las células en las dos partes de cada canal debería ser similar ya que se encuentran en las mismas condiciones. Se toman imágenes a las mismas horas que en los ensayos con flujo y se analizan los resultados.

La circularidad de las células a lo largo del ensayo es similar entre las dos zonas del canal y va disminuyendo con el paso del tiempo probablemente porque las células van muriendo al no estar en las condiciones ideales adquiriendo un fenotipo más redondeado (ver **Figura 18**).

A tiempo cero se observan valores de circularidad media no muy elevados (sobre 0.520) lo que indica que las células tienen una morfología bastante alargada. Estos valores sirven como control para comparar con los datos obtenidos en los ensayos de flujo.

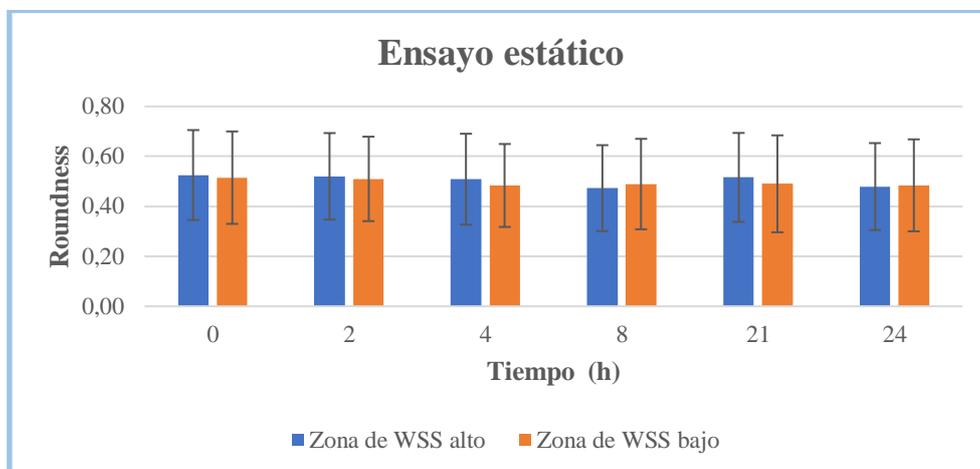


Figura 18. Circularidad de las células durante el ensayo estático. El gráfico se ha elaborado considerando los datos obtenidos en los tres canales del dispositivo microfluídico por lo que $n=3$.

En cuanto a la orientación celular, los valores oscilan entre -90° y 90° . En el ensayo estático no debería observarse una direccionalidad preferente ya que no se encuentran sometidas a ningún flujo. Esto es lo que se visualiza en las imágenes obtenidas a las 0h y 24h (ver **Figura 19**).

En este caso determinar la media no es relevante ya que, tanto si hay una orientación completamente aleatoria, como si están totalmente orientadas, supone un valor de 0° . Por otro

lado, el histograma permite analizar la distribución de las orientaciones celulares y visualizar si hay alguna dominante.

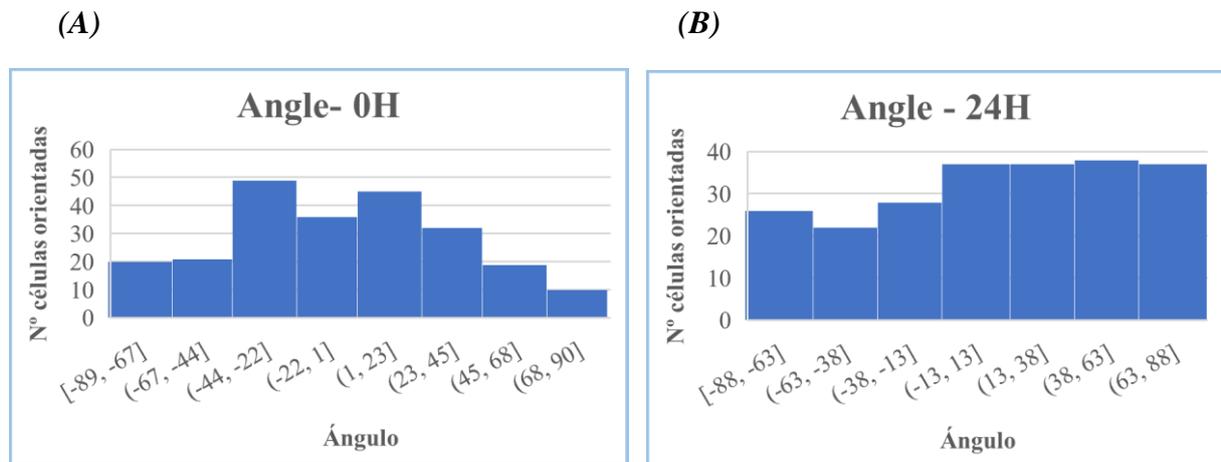


Figura 19. Representación en histograma de las orientaciones celulares en el ensayo estático a las 0h (figura izquierda, A) y 24h (figura derecha, B).

Se puede ver una distribución bastante homogénea en los dos diagramas como era esperado, por lo que no hay una orientación preferente de las células.

3.2 Ensayo de flujo bajo

Como respuesta al flujo, lo esperado es que las células se orienten en la dirección del mismo y adquieran una morfología más alargada. En este caso, el flujo al que se someten es de 2.5 ml/min.

Con este flujo los valores de WSS al que están sometidas las células es de 0.55 y 0.16 Pa (ver **Tabla 2**) por lo que se encuentran dentro del rango de valores en los que las células HUVEC se orientan en condiciones fisiológicas.

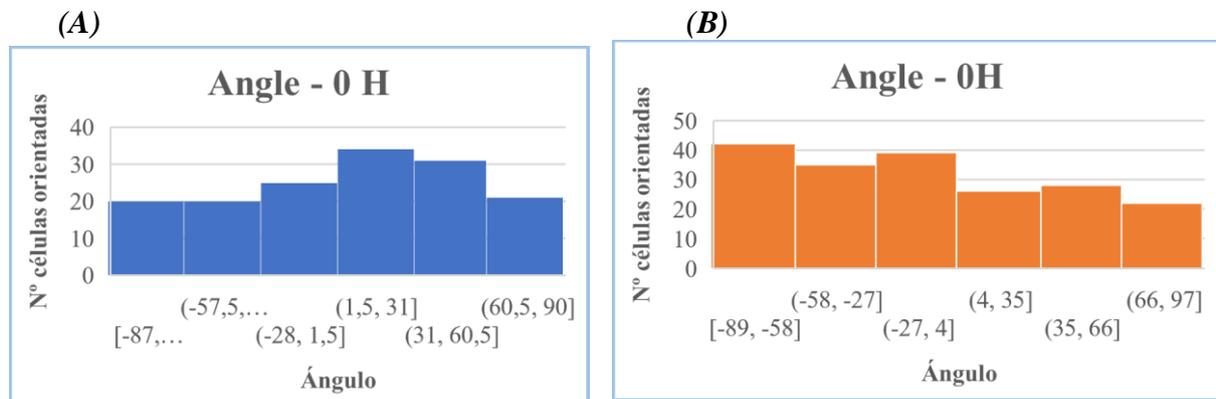
Se observa una ligera disminución en el índice de forma de las células a las 2h y 4h del inicio del tratamiento de flujo (ver **Tabla 3**).

WSS	Roundness 0h	Roundness 2h	Roundness 4h
0,16	0,567	0,539	0,532
0,55	0,571	0,560	0,551

Tabla 3. Valores de Roundness para las células a las 0h, 2h y 4h del inicio del tratamiento de flujo a 2.5 ml/min.

A tiempo cero, los índices de forma son superiores a los determinados en el ensayo estático y a las 4h, continúan por encima de los valores considerados como control por lo que no podemos afirmar que haya un alargamiento debido al flujo.

En cuanto a la orientación, un alineamiento celular en la dirección del flujo se traduce en un aumento de células con ángulos más próximos a cero. Si analizamos los ángulos al inicio del ensayo, mediante el histograma, para las dos zonas de diferente WSS observamos la distribución homogénea igual que en el ensayo estático ya que todavía no se ha aplicado el flujo (ver **Figura 20**).



Figuras 20. Representación en histograma de los ángulos de orientación al inicio del ensayo. En la figura A, para la zona de WSS alto (0.55 Pa) en azul. En la figura B, la zona de WSS bajo en naranja (0.16 Pa).

A las 24h para la zona de WSS más alto no se observa orientación, ya que no aumenta el número de células con ángulos próximos a cero, sin embargo, para la zona de WSS bajo sí que se observa un aumento de células en los dos intervalos más próximos a cero (ver **Figura 21**).

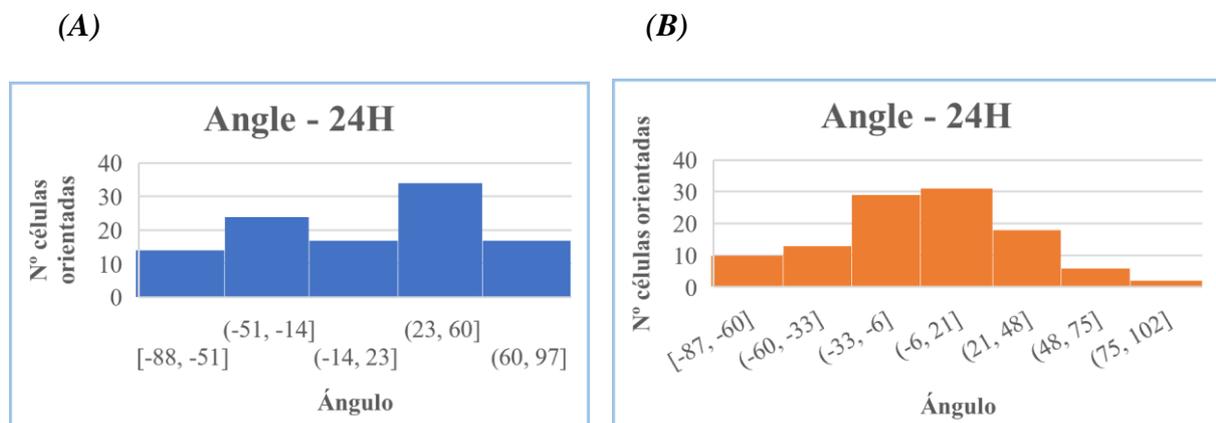


Figura 21. Representación en histograma de los ángulos de orientación a las 24h de ensayo. En la figura A, para la zona de WSS alto en azul (0.55 Pa) y en la figura B, la zona de WSS bajo en naranja (0.16 Pa).

3.3 Ensayo de flujo alto

El flujo utilizado para este ensayo es de 3.5 ml/ min, por lo que las células están sometidas a unos valores de WSS de 0.23 Pa en la zona más alta y 0.77 Pa en la zona más baja del canal.

Un WSS de 0.77 está por encima del valor máximo para el que se observa orientación y alargamiento en las condiciones fisiológicas.

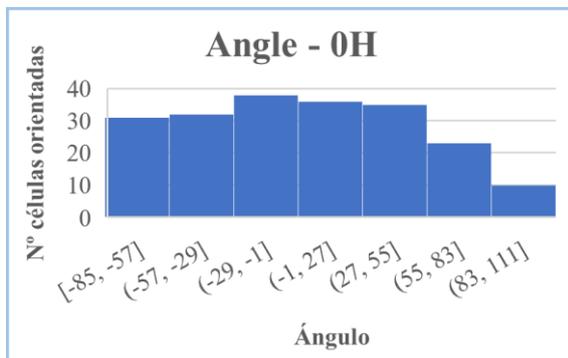
Para la zona de WSS de 0.23 Pa se observa una ligera reducción en la circularidad con el paso del tiempo, pero no tiene significancia estadística ya que la variación es mínima. En la zona más baja del canal no se observa reducción de la circularidad, sino que se produce un ligero aumento también sin significancia estadística (ver **Tabla 4**).

WSS	Roundness 0h	Roundness 2h	Roundness 4h
0,23	0,570	0,562	0,563
0,77	0,540	0,560	0,556

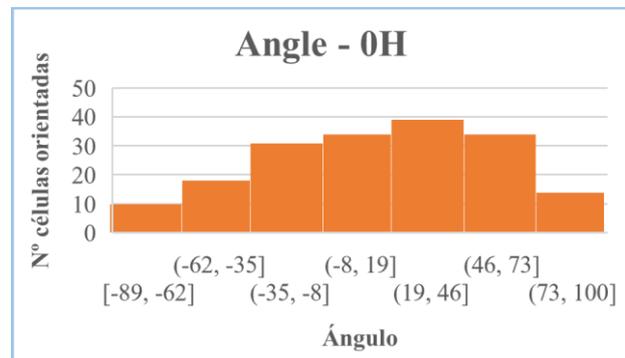
Tabla 4. Valores de Roundness para las células a las 0h, 2h y 4h del inicio del tratamiento de flujo a 3.5 ml/min.

Para este flujo, los resultados obtenidos en los histogramas indican que no ha habido orientación de las células en la dirección del flujo en ninguna de las dos zonas definidas en los canales. Las células se encuentran orientadas de manera aleatoria tanto al inicio como al final del ensayo (ver **Figura 22**).

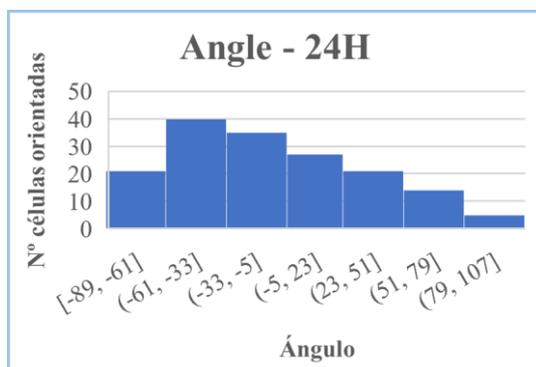
(A)



(B)



(C)



(D)

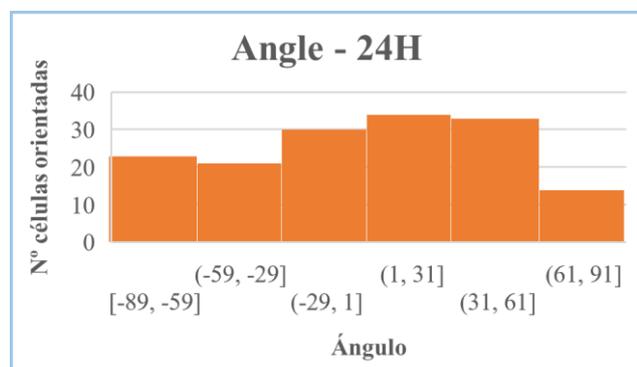


Figura 22. Representación en histogramas de los ángulos de orientación a las 0h y 24h. En la figura A, histograma de orientación al inicio del ensayo para valor de WSS 0.77 Pa. En la figura B, histograma de orientación al inicio del ensayo para valor de WSS de 0.23 Pa. En la figura C, histograma de orientación a las 24h de ensayo para valor de WSS de 0.77 Pa. En la figura D, histograma de orientación a las 24h de ensayo para valor de WSS de 0.23 Pa.

4. *Discusión*

Caracterizar el comportamiento de las células endoteliales que componen los vasos sanguíneos tiene mucha importancia para poder comprender diversas patologías, entre las que destaca la aterosclerosis. A pesar de que esta enfermedad tiene un componente genético y se asocia con algunos factores de riesgo, hay aspectos a nivel molecular que se desconocen y parecen desempeñar un papel relevante en la aterosclerosis.

Entre esos factores que se encuentran alterados en las zonas donde se suelen producir placas de ateroma, destaca el WSS por su relación directa con la permeabilidad vascular. Se ha demostrado que las células endoteliales se orientan y alinean en dirección del flujo, pero no todas se comportan de la misma forma, por ello es importante realizar estudios de caracterización de distintos tipos dentro de este grupo celular. En este trabajo, se busca relacionar los niveles de WSS con el comportamiento celular de las HUVEC.

Los resultados obtenidos indican que las células no se orientan en los dispositivos microfluídicos para los valores de flujo ensayados (2.5 y 3.5 ml/min), es decir, no se ha observado respuesta celular para valores de WSS entre 0.16- 0.77 Pa.

Las HUVEC son células fusiformes como se ve a simple vista y se confirma con los datos cuantificados, ya que tienen valores de Roundness en torno a 0.52. En el ensayo de flujo bajo, se observa una ligera reducción (ver **Tabla 3**) que no tiene significancia estadística ya que puede deberse a variaciones en la toma de imágenes o en el procesamiento. Por otro lado, en el ensayo de flujo medio ocurre lo mismo para el WSS de 0.23 Pa, pero aumenta para el WSS de 0.77 Pa (ver **Tabla 4**).

La mayoría de los estudios que cuantifican el alargamiento comienzan con un índice de forma muy alto, es decir, con células casi redondas o poligonales y se estiran hasta valores de índice de forma de 0.50-0.40. Esta diferencia en las condiciones iniciales es la responsable de que en otros estudios se observe alargamiento celular y en estos no se haya observado.

Algo similar ocurre con la orientación, no se observa una dominancia clara de células orientadas en la dirección del flujo, es decir, con un ángulo de 0°. En la mayoría de los casos, se visualiza una distribución ligeramente homogénea u orientadas de manera aleatoria. El único caso en el que parece haber algo de orientación es en el ensayo de flujo bajo, en la zona de WSS bajo (ver **Figura 21**).

Estas células fisiológicamente se orientan entre 0.1 y 0.6 Pa de WSS, por ello, la mayoría de los estudios que se realizan in vitro se centran en el rango de 0.1- 0.3 Pa (8). Zhang et al. estudiaron el comportamiento celular en un intervalo de WSS entre 0.18 y 0.88 Pa y observaron

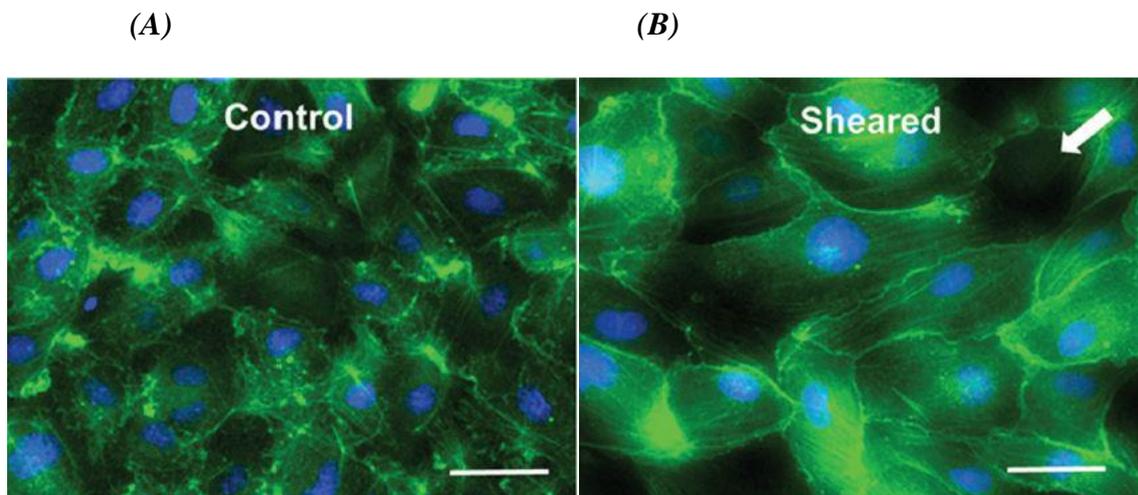
alineamiento en ambos casos, pero a diferentes tiempos. A las 4h para el WSS de 0.88 Pa y a las 12h para el de 0.18. Sus células se encontraban en un dispositivo microfluídico en forma de diamante con varios compartimentos paralelos.

Para caracterizar el comportamiento de las células HUVEC se requieren más ensayos, ya que no se ha obtenido una respuesta significativa al flujo aplicado. En primer lugar, sería necesario realizar ensayos con flujos superiores para identificar a que WSS se observa orientación y alargamiento celular. También, se podría trabajar más en profundidad en el WSS de 0.16 Pa y próximos, que es el único valor al que parecen haber respondido las células.

Por otro lado, una de las principales dificultades en el desarrollo de los ensayos es que las células se despegaban de los dispositivos microfluídicos y en muchas ocasiones esto impedía concluir los ensayos. Por esta razón, también sería interesante probar otras moléculas de adhesión como la gelatina o lamininas para que las células permanezcan más tiempo adheridas al dispositivo.

El objetivo final de este proyecto es poder comparar el comportamiento de las células HUVEC con respecto a las HCAECs y centrarse más en estas últimas debido a la importancia de la formación de placas de aterosclerosis en las arterias coronarias. También, se han realizado otros estudios que se centran en otras células endoteliales, las BAECs en los que en algunos casos se observa alargamiento celular como respuesta al flujo (12) mientras que en otros no se observa una respuesta significativa (13).

En la literatura, Meza et al. realizaron un tratamiento de flujo con un valor de WSS de 1 Pa a células HCAECs durante 30 minutos se observó orientación celular en la dirección del flujo (ver **Figura 23**). Además, se identificó una reducción en el índice de forma del 19% y un histograma de orientación centrado entre los ángulos -45° y 45° . (14)



Figuras 23. Tinción de células HCAECs en el control (Figura A) y tras el tratamiento de WSS de 1 Pa durante 30 minutos (Figura B). La flecha blanca indica la dirección del flujo.

5. Conclusiones

El objetivo del estudio era determinar el comportamiento y la respuesta de las células HUVEC frente a tratamientos de flujo y, por lo tanto, a diferentes valores de WSS. Los resultados obtenidos no han sido los esperados ya que cabría esperar orientación y alargamiento celular para valores de WSS entre 0.1 y 0.6 Pa y no se ha producido.

Para ninguno de los valores de WSS estudiados se ha observado respuesta celular ni en cuanto a la orientación ni al alargamiento. Por ello, sería necesario testar más valores de WSS para identificar el límite a partir del cual se observa respuesta por parte de las células en las condiciones de trabajo *in vitro*.

A pesar de que los cambios morfológicos relevantes se producen en las primeras 8h de ensayo, habría que mejorar la adherencia celular al dispositivo para evitar que se despeguen ya que en muchas ocasiones no se podrían concluir los ensayos por esta razón. La falta de adhesión probablemente se vea favorecida por una acción insuficiente de la máquina de plasma de oxígeno y de la fibronectina. Además, el uso de la bomba peristáltica de flujo genera un pulso agresivo para las células cultivadas en el dispositivo y también favorece que se despeguen.

Por otro lado, las tinciones realizadas en las células fijadas no han permitido visualizar comparativamente la situación control con las células orientadas para analizar los cambios en el citoesqueleto, estrés oxidativo y uniones intercelulares como respuesta al flujo. Sería interesante profundizar más en este aspecto porque permitiría obtener una representación visual de los cambios celulares como respuesta al WSS.

Estos estudios, junto con los que se realizarán en el futuro, permitirán desarrollar un modelo computacional que prediga la formación y el desarrollo de las placas de aterosclerosis. La respuesta celular observada frente al WSS se podrá correlacionar directamente con la permeabilidad del endotelio y, por lo tanto, se incluirá en las ecuaciones que predicen el comportamiento del flujo en el interior de los vasos sanguíneos.

Conclusions

The aim of this study was to determine the behavior and response of HUVEC to flow conditions and, therefore, to different WSS values. The results obtained have not been as expected since cell orientation and elongation were expected for WSS values between 0.1-0.6 Pa and it has not occurred.

No cellular response has been observed for any of the WSS values studied. Therefore, it would be necessary to test more WSS values to identify the threshold from which cellular response is observed under *in vitro* working conditions.

Even though the relevant morphological changes occur in the first 8 hours of the test, it would be necessary to improve the cellular adherence to the device to prevent them from detaching since on many occasions the tests could not be concluded for this reason. The lack of adhesion is probably favored by insufficient action of the oxygen plasma machine and fibronectin. In

addition, the use of the peristaltic flow pump generates an aggressive pulse for the cells in the device and favors their detachment.

On the other hand, the immunostaining carried out on the fixed cells has not made it possible to compare the control situation with the oriented cells to analyze the changes in the cytoskeleton, oxidative stress, and intercellular junctions in response to flow. It would be interesting to go deeper into this aspect because it would allow obtaining a visual representation of cellular changes in response to WSS.

These studies, together with those to be carried out in the future, will allow the development of a computational model that predicts the formation and development of atheroma plaques. The observed cellular response against WSS can be directly correlated with the permeability of the endothelium and, therefore, will be included in the equations that predict the behavior of the flow inside the blood vessels.

6. *Bibliografía*

1. Mongrain R, Rodés-Cabau J. Papel de la tensión de cizallamiento en la enfermedad aterosclerótica y la reestenosis tras implantación de stent coronario [Internet]. Vol. 59, Revista Española de Cardiología. Ediciones Doyma, S.L.; 2006 [cited 2021 Jun 22]. p. 1–4. Available from: <http://www.revespcardiol.org/es-papel-tension-cizallamiento-enfermedad-aterosclerotica-articulo-13083641>
2. Coronary Artery Disease Atherosclerosis - Cardiology - Highland Hospital - University of Rochester Medical Center [Internet]. [cited 2021 May 13]. Available from: <https://www.urmc.rochester.edu/highland/departments-centers/cardiology/conditions/coronary-artery-disease.aspx>
3. Co-culture Methods Used to Model Atherosclerosis In Vitro Using Endothelial, Smooth Muscle and Monocyte Cells [Internet]. [cited 2021 May 13]. Available from: <https://smjournals.com/biomedical-engineering/fulltext/smjbe-v2-1008.php>
4. Atherosclerosis | American Heart Association [Internet]. [cited 2021 May 13]. Available from: <https://www.heart.org/en/health-topics/cholesterol/about-cholesterol/atherosclerosis>
5. Rozman C. Medicina interna [Internet]. 4ª ed. Elsevier; 2009 [cited 2021 May 13].
6. Mongrain R, Rodés-Cabau J. Papel de la tensión de cizallamiento en la enfermedad aterosclerótica y la reestenosis tras implantación de stent coronario [Internet]. Vol. 59, Revista Española de Cardiología. Ediciones Doyma, S.L.; 2006 [cited 2021 Jun 22]. p. 1–4. Available from: <http://www.revespcardiol.org/es-papel-tension-cizallamiento-enfermedad-aterosclerotica-articulo-13083641>

7. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling. *Molecular, Cellular, and Vascular Behavior*. Vol. 49, *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier; 2007. p. 2379–93.
8. Van Der Meer AD, Poot AA, Duits MHG, Feijen J, Vermes I. *Microfluidic Technology in Vascular Research*. *J Biomed Biotechnol*. 2009;
9. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: Pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011;91(1):327–87.
10. Zhang X, Huk DJ, Wang Q, Lincoln J, Zhao Y. A microfluidic shear device that accommodates parallel high and low stress zones within the same culturing chamber. *Biomicrofluidics*. 2014;8(5):054106.
11. Huo Y, Choy JS, Svendsen M, Kumar Sinha A, Kassab GS. Effects of Vessel Compliance on Flow Pattern in Porcine Epicardial Right Coronary Arterial Tree.
12. G. Helmlinger, R. V. Geiger, S. Schreck, and R. M. Nerem. Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. *Journal of Biomechanical Engineering*, 113(2):123{131, 1991.
13. G. A. Truskey, K. M. Barber, T. C. Robey, L. A. Olivier, and M. P. Combs. Characterization of a sudden expansion flow chamber to study the response of endothelium to flow recirculation. *Journal of Biomechanical Engineering*, 117(2):203-210, 1995.
14. D. Meza, L. Abejar, D. A. Rubenstein, and W. Yin. A shearing-stretching device that can apply physiological fluid shear stress and cyclic stretch concurrently to endothelial cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 138(3):031007-0310078, 2016.