



Universidad
Zaragoza



Trabajo de Fin de Máster

Máster en Biología Molecular y Celular

**Desarrollo de un modelo biomimético in vitro
de metástasis de cáncer de mama
basado en tecnología Organ-on-Chip**

*Development of a biomimetic in vitro model
for breast cancer metastasis
based on Organ-on-Chip technology*

Autor:

Ismael Perisé Badía

Directores:

Ignacio Ochoa Garrido
Estela Solanas Villacampa

Facultad de Ciencias,
Universidad de Zaragoza

2021 - 2022

Prólogo

A continuación, se presenta el Trabajo de Fin de Máster de Ismael Perisé Badía, perteneciente al Máster en Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

En el año 2020, cuando todavía estaba cursando 3º de Biotecnología, decidí realizar prácticas extracurriculares durante el verano. Busqué entre los distintos grupos de investigación de mi universidad, y encontré el TME Lab dirigido por Ignacio Ochoa. La idea de trabajar con la tecnología Organ-on-Chip me atraía especialmente, y contacté con él para comenzar los trámites necesarios para poder entrar en su laboratorio tras terminar el curso. Sin embargo, en marzo de ese año, pocas semanas después de haber concretado los detalles de mis prácticas, estalló la pandemia de COVID-19, lo cual desembocó en la cancelación de las prácticas no imprescindibles en la universidad, y por tanto no pude incorporarme al laboratorio ese verano.

Ignacio me propuso que, como el curso siguiente iba a tener que realizar el Trabajo de Fin de Grado, podría realizarlo con ellos, sin embargo, conseguí una plaza para ir de Erasmus a Lovaina, Bélgica y preparar allí mi TFG, por lo que tampoco pude comenzar a trabajar *on-chip* en aquel momento.

Finalmente, en verano de 2021, sabiendo que en octubre empezaba el máster que ahora estoy terminando, volví a contactar con él, y por fin comencé a trabajar con ellos, en este caso para preparar este trabajo.

El tema me pareció especialmente interesante desde el principio, por dos razones principalmente: el uso de chips microfluídicos para establecer modelos celulares, y la potencial aplicación en cáncer, y en concreto en la metástasis, que es el principal factor de muerte en esta enfermedad.

Siempre me ha gustado la investigación relacionada con patologías humanas, y combinarlo con una técnica de vanguardia como es “organ-on-chip” convertía el proyecto en una oportunidad única de desarrollarme como investigador.

La realización del trabajo de laboratorio necesario para redactar este trabajo me ha servido para perfeccionar mis habilidades relacionadas con el cultivo celular, la microscopía, tanto de fluorescencia como confocal, y el manejo de dispositivos microfluídicos, siendo esto último algo nuevo para mí.

Me gustaría dedicar un párrafo de este epígrafe a agradecer, en primer lugar, a mis tutores Ignacio Ochoa y Estela Solanas, por ofrecerme la oportunidad de incorporarme a su laboratorio, y por la ayuda que me han brindado a lo largo de todo este proceso. También me gustaría destacar la labor de Vira Sharko, que me guió al inicio del proyecto y ha seguido siempre con interés y útiles consejos mis progresos. Por supuesto, gracias también al resto de compañeros de laboratorio por hacer aún más entretenidos los días de trabajo; y en especial a mi pareja Clara Torres, a la que poco a poco he ido atrayendo hacia las ciencias biológicas y con la que este año he podido trabajar por primera vez en el mismo laboratorio. Por último, querría finalizar este prólogo dando las gracias a mi familia y amigos, que tantas veces me han escuchado atentamente a lo largo de este año mientras les explicaba mis experimentos.

Índice

0. Resumen	4
1. Lista de abreviaturas	5
2. Introducción.....	6
2.1 Cáncer de mama.....	6
2.2 Modelos de cáncer de mama.....	8
2.3 Líneas celulares de cáncer de mama más utilizadas	12
2.4 Fibroblastos asociados al cáncer.....	14
3. Objetivos.....	15
4. Materiales y métodos.....	16
4.1 Cultivo de células.....	16
4.2 Preparación de esferoides	16
4.3 Paso de los esferoides a chip.....	20
4.4 Observación de los esferoides (Microscopía).....	21
4.5 Combinación de esferoides de células MDA con fibroblastos	22
4.6 Análisis estadístico de los datos.....	23
5. Resultados.....	24
5.1 Preparación de esferoides	24
5.2 Cuantificación de la migración celular desde el esferoide.....	27
6. Discusión	32
7. Conclusiones.....	36
8. Referencias	37

0. Resumen

Una de las principales dificultades a la hora de estudiar el cáncer de mama, y especialmente el proceso de metástasis, es la ausencia de modelos que representen fielmente las características del tumor.

La tecnología microfluidica, u “on-chip” se presenta como una alternativa prometedora, ya que permite generar estructuras tridimensionales de células, que pueden combinarse con un fluido o incluso con células no tumorales, de forma que se emula de una forma más completa el entorno del tumor, que es un factor crucial en el desarrollo del mismo.

En este proyecto se optimizarán los procedimientos de generación de esferoides con dos líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231, un tipo de células cancerosas agresivas y con gran capacidad para generar metástasis; y MCF-7, sin capacidad de migración.

Tras su obtención, se evaluará el crecimiento de los mismos, y se observará su comportamiento tras ser transferidos a una matriz de colágeno. Además, en el caso de las células MDA-MB-231, se estudiará su migración tanto en placa de pocillos como en chip.

Summary

One of the main difficulties for studying breast cancer, and specially the metastasis process is the lack of reliable models that represent the features of the tumor.

Microfluidic, or “on-chip” technology arises as a promising alternative, as it allows to generate tridimensional structures made from cells, which can be combined with fluid or even with non-tumoral cells, so the environment of the tumor, being this a crucial factor for its development, is emulated in a more complete way.

In this project it will be optimized the procedure for generating spheroids from two breast cancer cell lines: MDA-MB-231, an aggressive cell type with great capacity for generating metastasis; and MCF-7, with no capacity of migration.

After their obtention, the growing of the spheroids will be evaluated, and their behavior after being transferred to a collagen matrix will be observed. Furthermore, MDA-MB-231 cells migration will be studied, both in well-plate and on chip.

1. Lista de abreviaturas

- **CAF(s):** Fibroblasto(s) asociado(s) al cáncer
- **CTC(s):** Célula(s) tumoral(es) circulante(s)
- **DG10:** DMEM Glucose-High 10% FBS
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **ECM:** Matriz extracelular
- **ER:** Receptor de estrógenos
- **GFP:** Proteína fluorescente verde
- **H-D:** Hanging drop
- **HER2:** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
- **L-O:** Liquid overlay
- **MCF:** Michigan Cancer Foundation
- **MDA-MB:** M.D. Anderson – Metastasis Breast Cancer
- **TME:** Microambiente tumoral
- **O/N:** Overnight (toda la noche)
- **PBS:** Phosphate-buffered saline (Tampón fosfato salino)
- **PR:** Receptor de progesterona
- **rpm:** Revoluciones por minuto

2. Introducción

2.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo. En 2020, 2,3 millones de mujeres fueron diagnosticadas con esta enfermedad, que causó 685.000 muertes⁽¹⁾; además, es el tipo de cáncer con mayor prevalencia globalmente.

En los últimos años, la mortalidad debida a esta dolencia se ha reducido drásticamente, especialmente en los países desarrollados, en los que se ha conseguido, gracias a la prevención y al tratamiento, que alrededor del 90% de las pacientes diagnosticadas superen el cáncer⁽²⁾. Sin embargo, estas cifras son muy distintas si se estudian solamente aquellos casos en los que se desarrolla metástasis, mucho más complicados de tratar, y, por tanto, mucho más mortales. Es por ello, que la investigación en subtipos de cáncer de mama más agresivos cobra especial relevancia.

2.1.1 Tipos de cáncer de mama

Como ocurre con la mayoría de las enfermedades, el cáncer de mama no es igual en un paciente que en otro, existen subtipos, que se diferencian en la expresión génica de sus células tumorales, en el carácter metastásico de las mismas, o en la localización inicial del tumor; así como en el desarrollo de la patología y sus síntomas.

Según su localización inicial, a nivel histológico el cáncer de mama puede clasificarse en lobulillar, si las células tumorales provienen de los acinos glandulares (lobulillos), o ductal, si se inicia en un conducto mamario (Fig. 1). Además, en función de si el tumor produce metástasis o no, se consideran los siguientes subtipos: carcinoma lobular *in situ* (LCIS), carcinoma ductal *in situ* (DCIS), carcinoma lobular infiltrante o invasivo (ILC), y carcinoma ductal infiltrante o invasivo (IDC), el más prevalente, responsable del 80% de los casos de cáncer de mama.⁽³⁾

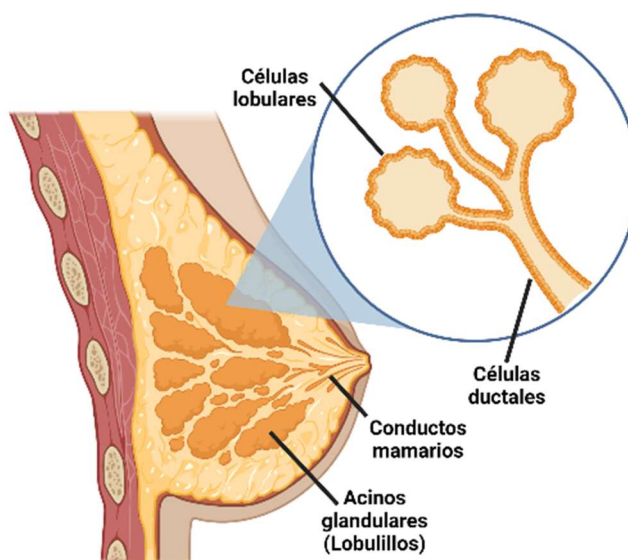


Figura 1. Partes de la mama
Creado con Biorender; adaptado de ⁽³⁾

Otra forma de clasificar las distintas variantes del cáncer de mama es según la expresión de genes que codifican receptores hormonales.⁽⁴⁾ Se trata de una clasificación a nivel molecular que se centra en la expresión de diferentes genes: el gen del receptor de estrógenos (ER), el gen del receptor de progesterona (PR), y el gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Para llevar a cabo esta distinción, se estudia si dichos genes se expresan en mayor o menor proporción en las células tumorales, consiguiendo distinguir entre cuatro subtipos principales de cáncer: luminal A (ER+, PR+, HER2-), luminal B (ER+, PR- o HER2+), HER2-OE (ER-, PR-, HER2+), y basal o triple negativo (ER-, PR-, HER2-). Además, es muy común medir la expresión del gen Ki67⁽⁵⁾, relacionado con la proliferación celular, y característico del subtipo luminal B.

Actualmente existen kits comerciales⁽⁶⁾ que analizan la expresión de conjuntos de genes (“*signatures*”) para tratar de precisar mejor el pronóstico de la enfermedad. Oncotype DX Assay⁽⁷⁾ es uno de los más comunes, y consiste en un array que permite estudiar la expresión de 21 genes pudiendo predecir la efectividad de la quimioterapia, así como la posible recurrencia de un cáncer ya tratado. Mammaprint Assay⁽⁸⁾ es un test similar, en el que se estudian 70 genes con el objetivo de predecir la recurrencia del cáncer en regiones distantes del cuerpo, es decir, la probabilidad de metástasis tras el tratamiento.

2.1.2 Metástasis en el cáncer de mama

La metástasis es el proceso por el cual se propaga un foco canceroso a un tejido u órgano distinto al de origen⁽⁹⁾.

Las células que migran desde el tumor primario a otras regiones del cuerpo del paciente se denominan células tumorales circulantes (CTCs), y según la zona en la que se encuentran en cada momento, se distinguen cinco etapas (Fig. 2)⁽¹⁰⁾:

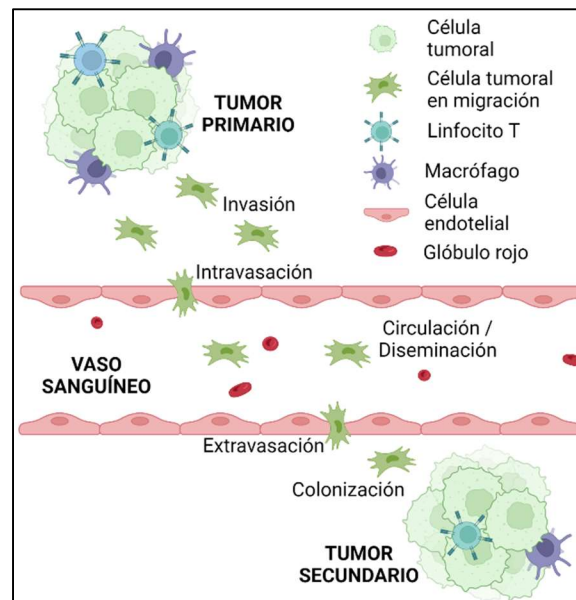


Figura 2. Etapas de la metástasis:
Invasión, intravasación, circulación o diseminación, extravasación y colonización
Creado con Biorender; adaptado de ⁽¹⁰⁾

El proceso comienza con la invasión del tejido circundante cuando una o varias células tumorales migran a través de la matriz extracelular (ECM), generalmente hacia una zona más rica en nutrientes u oxígeno. Cuando estas células alcanzan un vaso sanguíneo, puede producirse la intravasación, que consiste en la entrada de estas células en el torrente sanguíneo. Aquellas CTCs que sobreviven al trayecto por la sangre (llamado circulación

o diseminación), pueden ser atrapadas en una región distinta a la original, y producirse una extravasación, es decir, una salida del torrente sanguíneo, que puede dar lugar posteriormente a una colonización, por la cual se formará un tumor secundario en el sitio de metástasis. En el caso concreto del cáncer de mama, los tejidos más afectados por la metástasis son el hueso (48% de los casos de metástasis), el hígado (30%), y los pulmones (26%)⁽¹¹⁾ (los porcentajes suman más de 100%, ya que en algunos casos aparece metástasis en más de un tejido), con una creciente aparición de metástasis a cerebro, debido al uso de quimioterápicos que no pueden cruzar la barrera hematoencefálica⁽¹²⁾.

Afortunadamente, no todos los casos de cáncer de mama (o de cáncer en general) generan metástasis. Actualmente, sólo un 6% de los casos de cáncer de mama en el momento del diagnóstico se encuentran en estadio IV (o metastático); sin embargo, se considera que una de cada tres pacientes con cáncer de mama desarrollarán en algún momento metástasis.⁽¹³⁾

Aquellos casos en los que sí hay metástasis son mucho más agresivos, a la par que complicados de tratar. De hecho, la supervivencia a 5 años en estos casos desciende hasta el 27 %, y a los 10 años se encuentra en tan solo un 13 % (en países desarrollados).⁽¹⁴⁾

La metástasis es un proceso difícil de estudiar, debido a su complejidad para ser simulada *in vitro*, ya que para ello se deben recrear distintos órganos o tejidos del cuerpo humano. Es por ello, que han surgido distintos modelos para tratar de representar lo más fielmente posible las características de este proceso.

2.2 Modelos de cáncer de mama

Como sucede en todos los tipos de cáncer, y en la mayoría de las patologías en general, no existe un único modelo que permita estudiar el cáncer de mama, sino que su estudio se basa en una combinación de diferentes modelos (Fig. 3)⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, con sus ventajas y limitaciones (Fig. 4), que tratan de emular lo más fielmente posible el comportamiento de las células tumorales, así como el microentorno que las rodea.

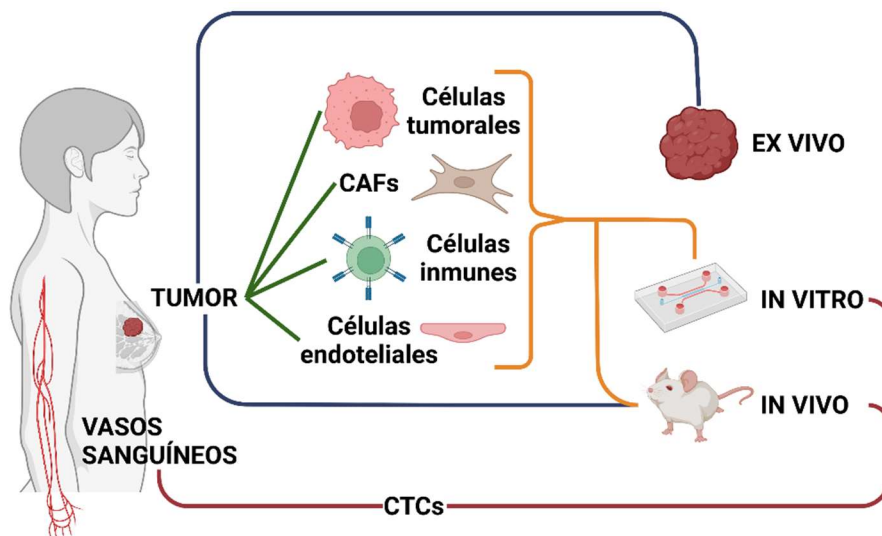


Figura 3. La mayoría de los modelos se desarrollan a partir de células extraídas de pacientes
Creado con Biorender. Adaptado de ⁽¹⁶⁾

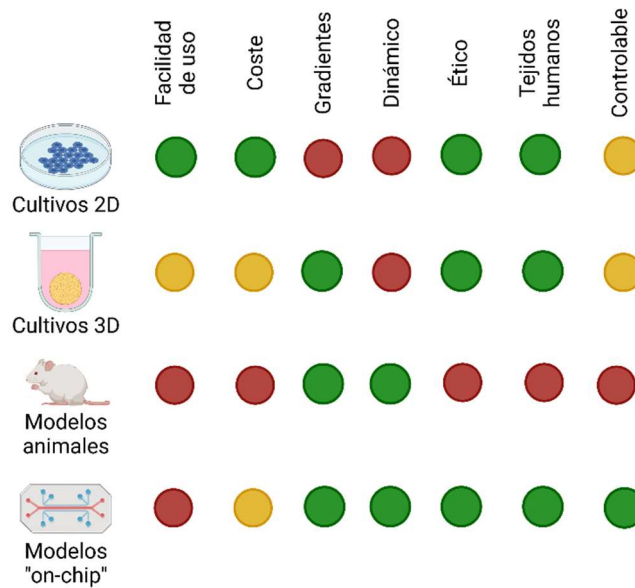


Figura 4. Resumen de los principales modelos existentes para tumores con sus ventajas e inconvenientes. Los puntos verdes indican ventajas; los puntos amarillos aspectos neutrales; y los puntos rojos desventajas. Creado con Biorender; adaptado de ⁽¹⁷⁾

2.2.1 Modelos *in vitro* bidimensionales (2D)

Los modelos *in vitro* en dos dimensiones son los más simples, y es ahí donde radica su principal ventaja: requieren menos trabajo que el resto, y resultan más baratos, a la par que sencillos de analizar. Se basan en el cultivo de la línea celular tumoral correspondiente, generalmente en monocapa, en placas de Petri, flasks o placas multipocillo. ⁽¹⁸⁾

Aunque ampliamente utilizados en la literatura, por su sencillez y alta reproducibilidad, esta forma de estudiar las células no refleja la situación real de los tumores en los pacientes, dado que no incluye ningún elemento del microambiente tumoral (TME), y las células se disponen de una forma distinta a la del tumor, ya que estos no son bidimensionales.

2.2.2 Modelos *ex vivo*

Los modelos *ex vivo* son un tipo de modelo *in vitro* en el que el material utilizado son explantes provenientes de biopsias realizadas a pacientes de la enfermedad que se está estudiando. En el caso de la investigación en cáncer, estos explantes son fragmentos de tumores, o tumores completos extraídos por cirugía, y cultivados posteriormente para utilizarlos como modelo. Esta técnica permite trabajar con la mayoría de los tipos celulares del tumor, e incluso mantener su estructura y entorno. Potencialmente pueden representar las características individuales de la persona de la que se ha extraído, lo cual puede llegar a ser un punto fuerte en cuanto a su aplicación en medicina personalizada, pero por otro lado puede provocar un sesgo en los resultados de la experimentación, ya que podría generarse un modelo que no represente la situación general del cáncer que se está investigando. ⁽¹⁶⁾

Estos explantes suelen ser más difíciles de mantener en un laboratorio que las líneas celulares, y en la mayoría de los casos se requiere un suministro constante de los mismos para proseguir con los experimentos, provocando una variabilidad que no favorece el análisis de los resultados. ⁽¹⁹⁾

2.2.3 Modelos animales

Los animales más utilizados para investigar el cáncer de mama son el ratón (Fig. 5) y el cerdo, así como sistemas animales más simples como *Drosophila melanogaster* o el pez cebra.

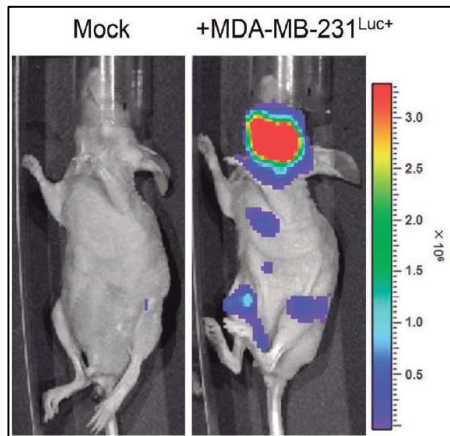


Figura 5. El ratón de la derecha fue inoculado con células MDA-MB-231 en el ventrículo izquierdo para observar la metástasis (en este caso predominante en la región mandibular) ⁽²¹⁾

Estos modelos permiten iniciar un tumor en el cuerpo del animal⁽²⁰⁾, para poder observarlo en una situación similar a la que existe en los pacientes humanos. Pese a ser uno de los modelos más usados y que ha permitido mayores avances en el tratamiento frente al cáncer, presentan desventajas importantes, como: el cuidado, mantenimiento y manejo de los animales en sí, que es mucho más costoso y complejo que el que se requiere para los modelos *in vitro*; los tiempos tanto de progresión del tumor como de vida del animal difieren mucho de los de los humanos, y también son distintas algunas características fisiológicas relevantes para el desarrollo del tumor, como el coeficiente respiratorio, y algunas características del propio cáncer, como los tejidos más susceptibles de generar metástasis⁽²¹⁾; y los cada vez más crecientes problemas éticos que surgen en torno a su manejo y en relación a la generación de patologías en seres vivos. Estos inconvenientes hacen necesario el desarrollo de nuevos modelos alternativos frente al uso de animales en el estudio de la enfermedad.

2.2.4 Modelos *in silico*

La bioinformática es uno de los campos que más ha avanzado en los últimos años. Hasta el punto de que ya es posible generar modelos de tumores completamente por ordenador, facilitando los cálculos estadísticos. De hecho, en los últimos años, modelos de distintos tipos de cáncer, incluido el de mama, se han desarrollado para diversos estudios^(22,23).

A pesar de los innegables logros recientes en este campo, las simulaciones *in silico* tienen tres principales problemas: los resultados son predicciones en lugar de observaciones; es muy difícil incluir todas las variables que influyen en la progresión del tumor; y se requiere una formación adicional a la necesaria para trabajar en un laboratorio. ⁽²²⁾

2.2.5 Modelos *in vitro* tridimensionales (3D)

Para apreciar algunas características de las células como la morfología, la polaridad, o las interacciones con el entorno, los modelos 2D no aportan la suficiente información, y se requiere aumentar la complejidad del modelo. Por ello a lo largo de las últimas décadas se han desarrollado modelos *in vitro* 3D, que recrean en mayor grado la heterogeneidad celular y complejidad estructural del tumor. Existen diferentes modelos en este sentido

que han mostrado importantes ventajas frente a los modelos anteriores en monocapa o 2D como son los esferoides, los organoides, o el cultivo microfluídico.

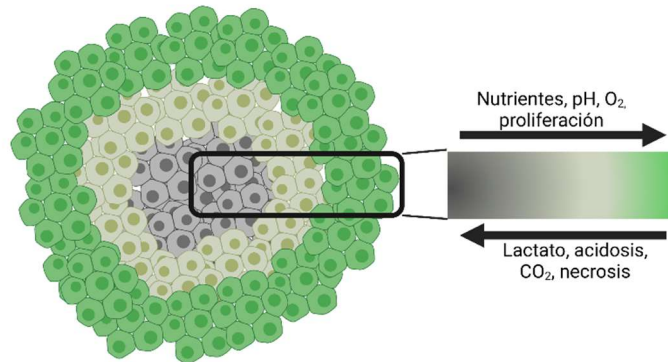


Figura 6: Representación esquemática de un esferoide y sus gradientes
Creado con Biorender; adaptado de ⁽²⁴⁾

Uno de los modelos *in vitro* tridimensionales más utilizados en la actualidad son los esferoides⁽²⁴⁾ (Fig. 6), basados en agrupaciones de miles de células agregadas formando una estructura más o menos esférica, en la que aparecen interacciones más similares a las propias de un tumor que en los cultivos en monocapa, como por ejemplo la presencia de gradientes de nutrientes y oxígeno, que pueden causar un “core” necrótico. En muchas ocasiones estos esferoides se encuentran embebidos en un armazón o “scaffold” que simula la ECM y que permite mantener la estructura agregada del esferoide, así como poder observar una posible migración celular en el caso de las líneas más metastásicas.

Por su parte, los organoides son estructuras multicelulares tridimensionales generadas *in vitro* a partir de un fragmento de órgano de un paciente, o a partir de células madre pluripotentes,⁽²⁵⁾ y que presenta comportamientos o función equivalentes a las del tejido u órgano al que emulan. Su obtención resulta compleja, aunque potencialmente podrían ser muy útiles en algunas líneas de investigación como las pruebas de fármacos ya que recrean la heterogeneidad tumoral y al derivarse del paciente pueden tener un papel esencial en el avance de la medicina de precisión o personalizada en cáncer.

Otra forma de estudiar tumores en 3D son los pocillos “transwell”, en los que las células se cultivan en monocapa o en forma de esferoide, en contacto con un fluido u otro tipo de células situados debajo del pocillo.⁽²⁶⁾

Todos estos modelos, son más avanzados y aportan más información que los modelos 2D; sin embargo, siguen teniendo algunas limitaciones como son la ausencia de vascularización y perfusión, que son elementos importantes en el comportamiento de los tumores en pacientes, especialmente a la hora de investigar metástasis.

2.2.5.1 Modelos microfluídicos (on-chip)

En los últimos años se ha popularizado la utilización de chips microfluídicos (Fig. 7) en la investigación con células. Estos dispositivos permiten un cultivo celular en un entorno controlado, pudiendo combinar distintas líneas celulares, conectadas por membranas semipermeables, o canales que pueden ser recorridos por fluido estático o con flujo.⁽²⁷⁻³⁰⁾

2.2.5.1.1 Tumor-on-chip

Este nuevo tipo de modelos es especialmente útil en la investigación del cáncer, gracias, principalmente, a la posibilidad de cultivar células tumorales formando estructuras 3D (más similares a la situación presente en el cuerpo de los pacientes que los cultivos 2D), en contacto con un fluido (estático o en flujo), de forma que se pueden estudiar distintas características propias de los tumores, como los gradientes de nutrientes y oxígeno, la distinta supervivencia de las células según su posición, o los cambios de tamaño frente a distintos estímulos.⁽³¹⁾ Otra ventaja que aporta la tecnología *on-chip* es la posibilidad de estudiar la interacción de las células tumorales con otro tipo de células, por ejemplo, células del sistema inmune.⁽³²⁾ Además, estos modelos permiten estudiar de forma más sencilla la migración de células desde el tumor⁽¹⁵⁾ hacia otros tejidos.

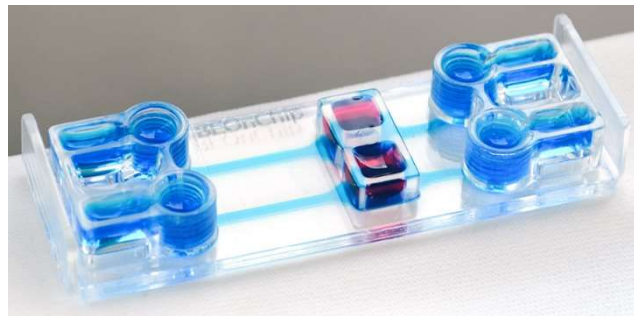


Figura 7. Chip BE-Transflow⁽³⁰⁾

2.2.5.1.2 Metástasis-on-Chip

Esta tecnología puede suponer un antes y un después en el estudio del proceso de metástasis en los tumores. Su principal ventaja radica en que permite cultivar de forma conjunta células tumorales junto a células de otros tejidos, como pueden ser órganos que típicamente son diana de metástasis, o células endoteliales que permitan formar vasos lo más fisiológicos posible, de forma que se pueda observar los procesos de intravasación y extravasación vascular.

Actualmente, la mayoría de modelos de metástasis desarrollados con la tecnología *on-chip* representan solo una de las fases de la metástasis, descritas previamente (invasión, intravasación, circulación, extravasación, colonización).^(15,33) Sin embargo, gracias a la posibilidad de conectar distintos dispositivos y al creciente interés de muchos grupos de investigación por esta técnica, la perspectiva de futuro incluye modelos en los que se pueda estudiar el proceso de la metástasis en conjunto, incluyendo las diferentes fases del mismo.

2.3 Líneas celulares de cáncer de mama más utilizadas

El desarrollo de modelos *in vitro*, y en concreto de modelos 3D microfluídicos, pasa por el uso de líneas celulares que se asemejen en comportamiento y en fenotipo a las células tumorales de los pacientes. Teniendo en cuenta la diversidad de cánceres de mama existente y ya descritos anteriormente, se hacen necesarios distintos tipos celulares para el estudio de uno u otro tipo de tumor, de forma que muestren la diferente expresión de ER, PR y HER2, así como la diferente capacidad metastásica. Existen tres líneas celulares provenientes de tumores mamarios que copan dos tercios de todos los trabajos de investigación publicados en el mundo sobre el cáncer de mama⁽³⁴⁾:

2.3.1 MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 (MDA) es una línea de células epiteliales obtenidas a partir de adenocarcinoma de mama que se estableció en 1973, en el hospital MD Anderson de Houston⁽³⁵⁾.

Se trata de un tipo celular triple negativo⁽³⁶⁾, lo cual indica que posee un alto poder metastático. Además, expresa algunos marcadores propios de células de tipo mesenquimal mientras que carece de algunos marcadores epiteliales⁽³⁴⁾; de hecho, al ser cultivadas en monocapa, presentan una morfología fibroblastoide (Fig. 8).

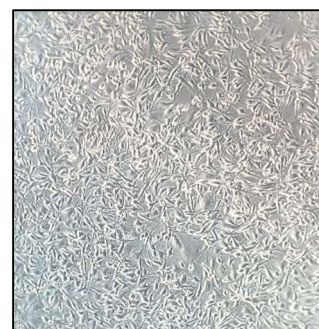


Figura 8: Células MDA en cultivo monocapa

2.3.2 MCF-7

Esta línea celular se constituyó también en 1973 (la mayoría de las líneas tumorales utilizadas actualmente provienen de la década de 1970), por Herbert D. Soule y al igual que las MDA, a partir de un adenocarcinoma de mama, en este caso, de una mujer de 69 años en la Fundación contra el Cáncer de Michigan (de ahí las siglas MCF), ahora llamada Instituto de Cáncer Barbara Ann Karmanos. Se trata de la línea celular de cáncer de mama más utilizada por los investigadores globalmente.⁽³⁷⁾

Las células MCF-7 se utilizarán a modo de control negativo para los distintos experimentos, ya que son células triple positivas⁽³⁸⁾, no metastásicas, con protocolos optimizados tanto para su cultivo como para la formación de esferoides.

2.3.3 T-47-D

La línea celular T-47-D tiene como principal característica una alta sensibilidad a progesterona, y es por esa razón que se suele utilizar en investigaciones relacionadas con procesos hormonales. Al igual que las MCF-7, se consideran poco invasivas, y presentan un fenotipo epitelial luminal.⁽³⁴⁾

Se aisló de una paciente de 54 años con carcinoma ductal en 1978 en Israel⁽³⁹⁾.

2.3.4 Otras líneas celulares de cáncer de mama

Las tres líneas celulares previamente explicadas son las más utilizadas en el mundo en investigación relativa al cáncer de mama. Sin embargo, no son las únicas.

BT-474 y SK-BR-3 son líneas celulares poco invasivas, similares a las MCF-7 y a las T-47-D en cuanto a sus características fenotípicas, pero sin mostrar tan claramente la morfología y fisiología propias de las células epiteliales luminarias.⁽³⁴⁾

Hs578T, por otro lado, se parece más en cuanto a su fenotipo a las células MDA, dado que tienen una mayor capacidad invasiva, así como algunos marcadores propios de las células mesenquimales y ausencia de otros marcadores de células epiteliales.⁽³⁴⁾

2.4 Fibroblastos asociados al cáncer

Un elemento importante del entorno tumoral son los fibroblastos. Estas células del tejido conectivo tienen como función principal, en condiciones fisiológicas, construir y modificar la ECM, así como participar en el cierre de heridas y en procesos de regulación de la inflamación⁽⁴⁰⁾.

Estos fibroblastos pueden ser atraídos y activados por las células tumorales, de forma que aumentan su concentración a su alrededor, y modifican su comportamiento habitual, denominándose a partir de ese momento fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). Según recientes estudios^(41,42), en las etapas iniciales los fibroblastos tratan de combatir el avance del tumor sintetizando moléculas que aumentan la densidad y rigidez de la matriz, limitando así el crecimiento del tumor y la potencial migración de las células que lo forman. Sin embargo, factores liberados por las propias células tumorales causan que los CAFs comiencen a colaborar con el tumor (*Fig. 9*), degradando la ECM, y facilitando así el avance de las células cancerosas. Esta no es la única manera que presentan los CAFs para favorecer el proceso metastático; se ha observado que estas células son capaces de reclutar células progenitoras endoteliales, que dan lugar a nuevos vasos sanguíneos⁽⁴³⁾.

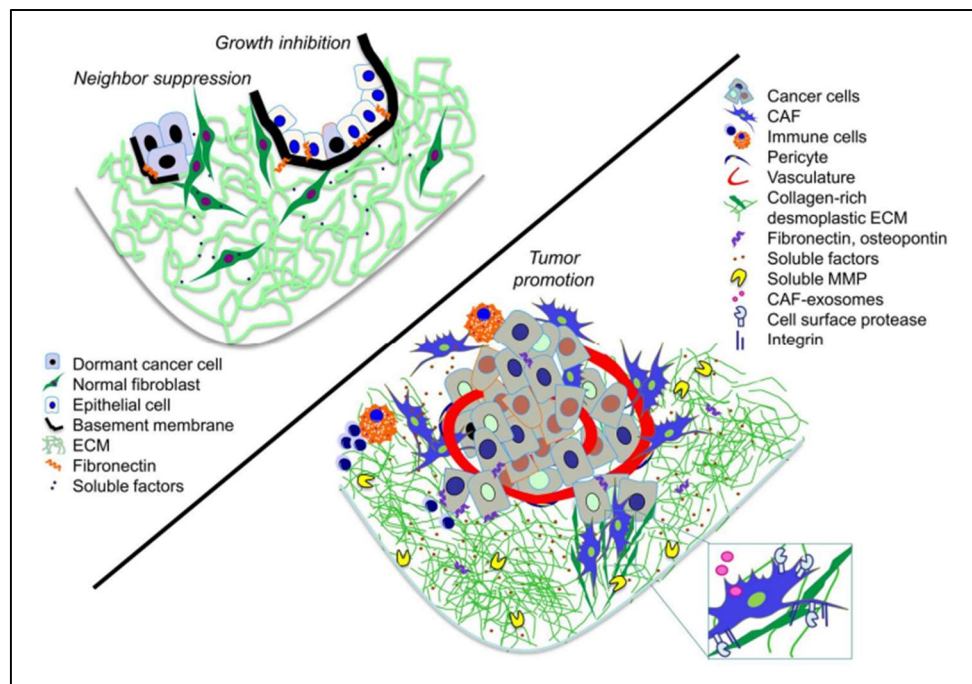


Figura 9: Comparación entre fibroblastos en condiciones fisiológicas (arriba) y CAFs (abajo)⁽⁴⁴⁾

Es tal la importancia de estas células en el desarrollo del cáncer, que en los últimos años han aparecido líneas de investigación con el objetivo de convertir los CAFs en una nueva diana terapéutica en la lucha contra el cáncer⁽⁴⁵⁾. El principal obstáculo que superar para conseguir una terapia efectiva basada en fibroblastos es la gran heterogeneidad que presentan, dificultando un tratamiento estándar que sea efectivo en la mayoría de los pacientes; es por este motivo que actualmente se están buscando biomarcadores que identifiquen a los CAFs de forma uniforme, y a la vez diferencial frente a los fibroblastos fisiológicos⁽⁴⁶⁾.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un modelo biomimético *in vitro* de metástasis de cáncer de mama mediante el uso de tecnología microfluídica de organ-on-chip que permita evaluar la migración de las células tumorales hacia los vasos sanguíneos y estudiar las condiciones de las que depende esta migración, así como los mecanismos que la producen.

Dentro del objetivo principal se incluyen los siguientes objetivos específicos (Fig. 10):

- Generar esferoides de líneas tumorales de mama que representen lo más fielmente posible el tumor y su capacidad migratoria. Se llevarán a cabo distintas técnicas para conseguir esferoides estables de la línea celular de estudio, MDA-MB-231 y la línea celular control, MCF-7. Además, se testearán distintos parámetros para optimizar el procedimiento de obtención de los esferoides.
- Estudiar la capacidad metastásica de las células que forman dichos esferoides comparando la velocidad de migración de las células de ambas líneas.
- Optimizar la transferencia de los esferoides a matriz de colágeno en el pocillo de los chips microfluídicos de forma que se mantenga la viabilidad celular, y el esferoide pueda ser observado correctamente a través de microscopía confocal.
- Estudiar la capacidad de migración de las células en los chips y compararla con la observada en placa.
- Mantener fibroblastos en los pocillos con esferoides y estudiar las variaciones en la migración de las células tumorales causadas por la presencia de los fibroblastos

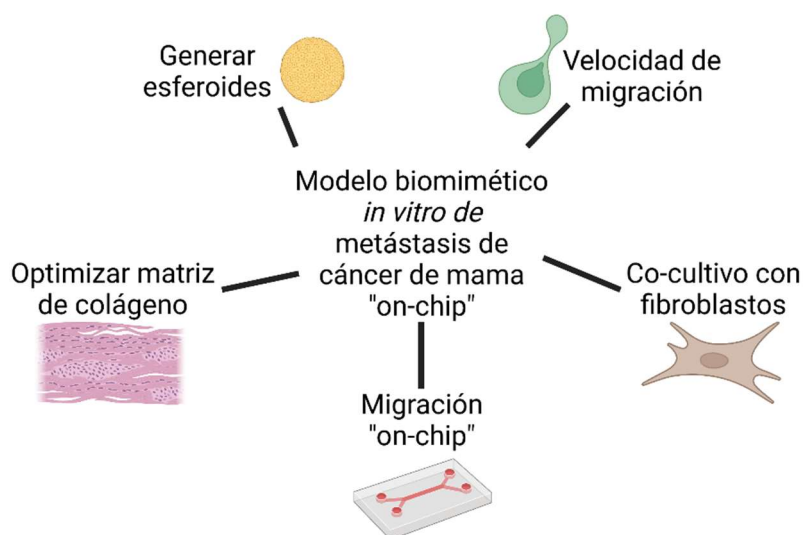


Figura 10: Esquema de los objetivos de este trabajo. Creado con Biorender

4. Materiales y métodos

Todos los procedimientos descritos en este epígrafe requieren de trabajo bajo condiciones de esterilidad por lo que se realizan dentro de cabina de seguridad biológica de nivel 2 Telstar® Bio II Advance Plus.

4.1 Cultivo de células

En este estudio se van a utilizar dos líneas celulares distintas: MDA-MB-231 (MDA) y MCF-7, que se conservan congeladas en un tanque de nitrógeno líquido Arpege 110 (a -175 °C).

Para descongelar las células, se va diluyendo el contenido del vial a temperatura ambiente con tampón fosfato salino (PBS) para neutralizar el efecto del anticongelante, dimetilsulfóxido (DMSO), y posteriormente se centrifuga para eliminar ambos compuestos y obtener un pellet de células que se resuspende en medio de cultivo y se inocula en un flask (Corning® de 25 cm²). Estos se mantienen a 37°C y 5% de CO₂ en un incubador Thermo Scientific™ HeraCell™ 150i.

El medio utilizado para su cultivo (salvo en los casos en los que se especifique lo contrario) se denomina DG10, y se produce a partir de medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) con 1g/L de glucosa, al que se le añade 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomina, y 1% de L-Glutamina. Este medio se renovará cada 48-72 horas desde el pase; y cuando las células hayan llegado a un 85-90 % de confluencia en la superficie del flask (normalmente al cabo de una semana) se realizará un nuevo pase, resemebrando un 5% de las células MDA, y un 20% en el caso de las células MCF-7 en un nuevo flask.

4.2 Preparación de esferoides

Debido a la necesidad de obtener estructuras lo más similares posible a tumores sólidos, la producción de esferoides con las líneas celulares descritas previamente es el método elegido.

Para obtenerlos se han llevado a cabo dos técnicas diferentes:

4.2.1 Preparación de esferoides mediante la técnica “liquid overlay”

La técnica “liquid overlay” (L-O) (*Fig. 11*) se basa en la generación de esferoides por agregación de las células que lo formarán, al ser dispuestas sobre una superficie anti-adherente (que favorece la adhesión de las células entre ellas) y la adición de un agente agregante.⁽⁴⁷⁾

Inicialmente se realizará en placa de 96 pocillos de fondo curvo, para posteriormente trasladar estos esferoides ya formados y estabilizados a una matriz de colágeno contenida en placas de 96 pocillos de fondo plano o en chips microfluídicos, para poder estudiar la migración celular.

Este protocolo se llevó a cabo para la obtención de esferoides tanto con las células MDA como MCF-7, para comparar la producción de esferoides entre ambas.

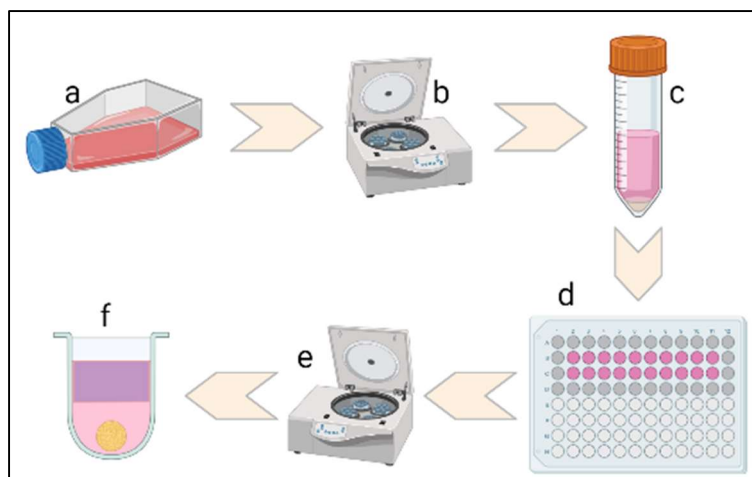


Figura 11: Esquema de la técnica "liquid overlay"

a) Las células al 80 - 90% de confluencia se tripsinizan. b) Centrifugación (5 min, 1.200 rpm) c) Se obtiene un pellet de células con un sobrenadante de tripsina y medio d) Placa de 96 pocillos con células sembradas y PBS alrededor para evitar desecación e) Centrifugación de la placa (10 min, 1.200 rpm) f) 24 horas después se añade Matrigel
Creación propia (Biorender)

4.2.1.1 Preparación de la suspensión celular

Antes de comenzar, se debe precalentar tanto el medio que se va a utilizar (en este caso DG10) como la tripsina, a una temperatura de 37°C, para perturbar lo mínimo posible las condiciones a las que se encuentran las células.

A continuación, se introduce en la campana el flask de células que estaba en el incubador, y se aspira el medio. Como las células son adherentes, la punta del aspirador se debe colocar en uno de los lados sin células del flask, para no dañarlas o aspirarlas.

Después, se lava el interior del flask con PBS, para tratar de retirar los posibles restos de medio todavía presentes. Tras el lavado, se añaden 2 mL de tripsina, que será la encargada de separar las células del plástico para poder extraerlas del flask.

Se incuba durante 7 minutos a 37°C, y pasado ese tiempo se comprueba que las células se encuentran ya separadas de la superficie, usando un microscopio óptico convencional.

El siguiente paso es la neutralización de la tripsina, mediante la adición de 8 mL de medio DG10. En caso de estar utilizando un flask más grande, y por tanto mayor cantidad de tripsina, el volumen necesario de medio será siempre 4 veces el volumen utilizado de tripsina. Tras añadir el medio, se vierte todo el contenido del flask (tripsina, medio y células) en un Falcon de 15 mL y se centrifuga durante 5 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm).

Al terminar la centrifugación debería aparecer un pellet blanquecino de células en el fondo del Falcon. Se aspira todo el sobrenadante, y se resuspende dicho pellet en 1 mL de medio.

Dado que los esferoides deben tener una cantidad determinada de células, se debe realizar un conteo de las presentes en esta suspensión, para ello se mezclan en un tubo Eppendorf 90 µL de PBS junto a 10 µL de la suspensión celular, y se introducen 10 µL de esa mezcla en una cámara de Neubauer, procediendo al conteo en el microscopio.

Se necesitan 5.000 células por cada pocillo (ya que se quiere obtener un esferoide por pocillo), por lo que se realizará el cálculo del volumen total que se requiere de la suspensión celular, y se le añadirá la cantidad adecuada de medio para tener 100 µL totales por pocillo.

4.2.1.2 Preparación de la placa

La preparación de la placa consiste en la aplicación de una solución antiadherente (Stemcell™ Anti-Adherence Rinsing Solution). Para ello, se añaden 100 µL en cada pocillo que vaya a contener esferoide. Se incuba a temperatura ambiente entre 10 y 15 minutos, después se aspira la solución, y por último se lavan los pocillos con PBS.

A continuación, se llenan los pocillos que rodean a los que vayan a tener esferoides con 100 – 200 µL de PBS, para evitar la evaporación excesiva de medio.

4.2.1.3 Siembra de esferoides

El siguiente paso es la adición de las células en los pocillos correspondientes. Para ello, y resuspendiendo continuamente el Falcon que las contiene, se distribuyen 100 µL de la suspensión celular en cada pocillo.

Fuera de campana, se prepara una placa “copia”, que contenga los mismos volúmenes que la placa con los esferoides, pero de agua, para compensar el peso en la centrifuga, donde se introducirán ambas durante 10 minutos a 1200 rpm. Al terminar la centrifugación, se comprueba a simple vista la aparición de unos puntos blanquecinos en el fondo de los pocillos, que indican que las células efectivamente se han agrupado, y se incuba la placa durante 24 horas a 37 °C. También se puede utilizar el microscopio óptico para cerciorarse de que los esferoides tienen una forma redondeada compacta.

4.2.1.4 Adición de Matrigel

Pasado ese tiempo, se procede a la adición de matrigel (Corning® Matrigel Matrix), un compuesto agregante que favorecerá la formación de los esferoides.

Para ello, se descongela previamente en hielo, 2 horas antes de comenzar el proceso.

Se calcula la cantidad necesaria para obtener la concentración deseada en cada pocillo (en nuestros experimentos se utilizará 2,5%, ya que es la concentración que ya se ha optimizado previamente en el laboratorio), y la cantidad necesaria de medio para que haya 100 µL totales en cada pocillo.

Para diluir el matrigel en el medio se deben utilizar puntas de pipeta de boca ancha, ya que a la concentración stock, la solución es bastante viscosa. Tras diluir, se pipetea 100 µL sobre la pared de cada pocillo con esferoides.

Después se introduce en el incubador a 37 °C, donde permanecerá 8 días antes de transferir los esferoides ya formados a una matriz de colágeno.

4.2.1.5 Paso de los esferoides a matriz de colágeno

Pasados ocho días, en los que se produce la estabilización de los esferoides, estos son trasladados a una matriz de colágeno (también denominada “hidrogel”).

Para ello, se prepara una mezcla que contendrá colágeno (Corning® Collagen I de cola de rata) a una concentración de 6 mg/mL a partir de una disolución Stock de 10,57 mg/mL. La concentración final deseada es de 3 mg/mL, pero como se explicará posteriormente, el último paso del protocolo consiste en realizar una dilución 1:2, y por ello se prepara inicialmente la mezcla al doble de concentración.

Hay que tener en cuenta que el colágeno es un polímero con una alta tendencia a polimerizar a temperatura ambiente, por lo que todo el protocolo se llevará a cabo dentro de un recipiente con hielo, donde tendremos todos los reactivos, para asegurar una

temperatura fría constante. Además, la mezcla se debe resuspender muy bien cada vez que se vaya a pipetear para asegurar la máxima homogeneidad. Se van a utilizar 50 μL de la mezcla por pocillo (es decir, por esferoide), así que habrá que calcular el volumen correspondiente. A continuación, se describen los cálculos a realizar para obtener las cantidades de cada reactivo:

$$\text{Vol. Colágeno} = \frac{6 \text{ mg/mL}}{10,57 \text{ mg/mL}} \times \text{Vol. Total}$$

$$\text{Vol. NaOH} = \frac{1}{40} \times \text{Vol. Colágeno}$$

$$\text{Vol. DMEM5x} = \frac{1}{10} \times \text{Vol. Total}$$

$$\text{Vol. H}_2\text{O} = \text{Vol. Total} - (\text{Vol. Colágeno} + \text{Vol. DMEM5x} + \text{Vol. NaOH})$$

Los reactivos se añaden a un tubo Eppendorf en el orden inverso al que aparecen en los cálculos, ya que se debe añadir el colágeno cuando el resto de los reactivos están ya mezclados.

En la placa de fondo curvo que contiene los esferoides se retirarán 150 μL por pocillo, con cuidado de no pipetear el esferoide, para dejarlo embebido en los 50 μL de medio restantes. A continuación, se pipetea 50 μL de la mezcla de colágeno en el pocillo que contiene el esferoide, se resuspende bien, y se pipetea 50 μL junto con el esferoide, que serán depositados en una nueva placa de 96 pocillos, esta vez de fondo plano. Se realiza este paso para todos los esferoides que se quieran pasar a matriz de colágeno, y a continuación se añaden 100 – 200 μL de PBS en los pocillos situados alrededor de los que contienen los esferoides, para reducir la evaporación de su contenido.

Se incuba esta placa durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, y después se añaden 50 μL de medio DG10 en cada pocillo. La placa se mantendrá a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 durante los días que dure el seguimiento por microscopía.

4.2.2 Preparación de esferoides mediante "hanging drop" (H-D)

Según la literatura, el método más eficaz para producir esferoides de células MCF-7, es el método de la gota colgante (o "hanging drop")^(48,49) (Fig. 12).

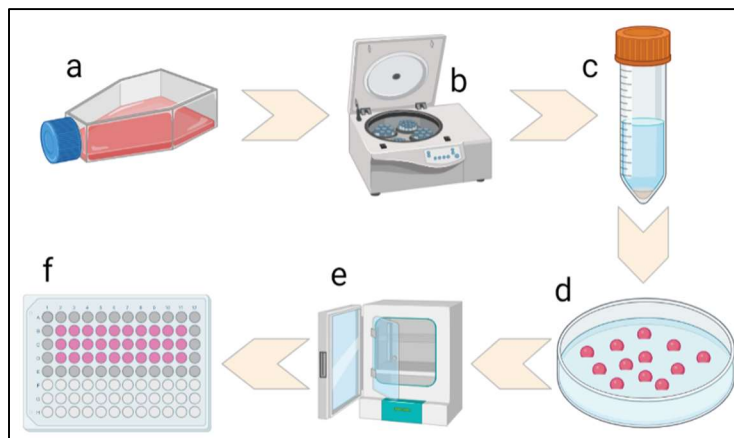


Figura 12: Esquema de la técnica "hanging drop"

a) Las células al 80 - 90% de confluencia se tripsinizan. b) Centrifugación (5 min, 1.200 rpm) c) Se obtiene un pellet de células con un sobrenadante de tripsina y medio d) Placa Petri con gotas colgantes sobre la tapa (5.000 células por gota, 20% Methocel) e) Incubación de la placa (48 h, 37 $^{\circ}\text{C}$) f) Transferencia a placa de 96 pocillos
Creación propia (Biorender)

4.2.2.1 Preparación de la suspensión celular

El primer paso de esta técnica coincide con el explicado en el epígrafe 4.2.1.1., con la salvedad de que en este caso las células irán suspendidas en un volumen equivalente a 20 μL de medio por esferoide. A este volumen se le añadirá el volumen necesario de Methocel para obtener 5 μL por esferoide. Además, se realizarán también experimentos sin Methocel, y usando Matrigel en su lugar.

4.2.2.2 Siembra de los esferoides

Se utilizará una placa Petri Corning® de 10 cm de diámetro. Dentro de campana, se abrirá la placa, colocando la tapa boca arriba, para ir colocando sobre su superficie gotas de 25 μL de la suspensión que hemos preparado. La placa deberá rellenarse con 30 mL de agua destilada estéril o PBS para reducir la desecación de las gotas durante la incubación. A continuación, se cerrará la placa y se introducirá en el incubador durante 48 horas.

4.2.2.3 Paso de los esferoides a placa

Transcurridas las 48 horas los esferoides contenidos en las gotas son transferidos a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, donde se realizará su seguimiento al microscopio. Primero se deben lavar los esferoides para eliminar restos de Methocel o medio. Para ello en una placa de 96 pocillos de fondo redondo se añaden 200 μL de PBS a un número de pocillos igual al número de gotas de las que se dispone. A continuación, con una micropipeta de 25 μL y punta de boca ancha, se pipeta el contenido de cada gota a cada uno de esos pocillos. En la misma placa (o en una nueva si es necesario), se realiza un tratamiento con solución antiadherente a un número de pocillos igual al número de gotas. Este tratamiento consiste en añadir 100 μL de disolución antiadherente a cada pocillo, aspirar pasados 10-15 minutos, y lavar con PBS. Posteriormente se añadirán 100 μL de medio en dichos pocillos.

El último paso es la transferencia de los esferoides a los pocillos con medio. Para ello, con la misma pipeta y punta de antes, se atrapa cada esferoide y se deja caer por gravedad en los pocillos con medio.

4.3 Paso de los esferoides a chip

Para alcanzar los objetivos planteados, se utilizarán chips microfluídicos. El uso de estos dispositivos se debe a que, como se ha explicado anteriormente, el estudio de los tumores implica la generación de masas celulares tridimensionales, que no pueden ser cultivadas de forma tradicional en placa; y en concreto el estudio de la metástasis conlleva la utilización de soportes en los que haya presentes canales con fluido (estático o en flujo), de forma que pueda estudiarse cómo las células se desprenden del tumor, migran a través de la ECM, y alcanzan los vasos sanguíneos penetrando en ellos, pudiendo potencialmente viajar a otros órganos o tejidos del individuo, extendiendo de esta manera el cáncer.

El chip utilizado será el BE-Transflow (*Fig. 7*), comercializado por la empresa BEOnChip. Este dispositivo consta de dos pocillos en los que se pueden añadir células (en nuestro caso formando esferoides), separados por membranas semipermeables de 8 μm de poro de los canales que discurren por la parte inferior, en los que se incluirá medio rico en nutrientes, para favorecer una migración diferencial de las células hacia ellos.

4.4 Observación de los esferoides (Microscopía)

A lo largo de este trabajo se va a necesitar observar las células en distintos momentos, para asegurar que el proceso completo está sucediendo correctamente. Dependiendo de la fase en la que estén, se utilizará un microscopio u otro.

4.4.1 Microscopio de fluorescencia Thunder

Cuando los esferoides estén en la placa de 96 pocillos se observarán con microscopio de fluorescencia (Leica Thunder Imager) y se guardarán las imágenes del progreso cada 48 horas (e incluso cada 24 horas en algunos casos).

En el caso de las células MDA, dichas imágenes se obtienen con un aumento de 5x, detectando la emisión a 505 nm, ya que estas células sintetizan la proteína fluorescente verde (GFP), que permite su visualización.

En el caso de los esferoides de MCF-7, se observará en contraste de fases, al no poseer el gen de la GFP, con el mismo microscopio y aumento.

4.4.1.1 Estudio de viabilidad

Para observar el progreso de las células contenidas en los esferoides se lleva a cabo un protocolo de tinción con marcadores de viabilidad. Se trata de una combinación de tres compuestos que se unen a las células de forma diferencial:

- Hoechst⁽⁵⁰⁾: Se une a regiones ricas en adenina y timina del surco menor del DNA, y gracias a su capacidad de atravesar las membranas celular y nuclear logra teñir células vivas y muertas. Emite a 461 nm, es decir, en la región de luz visible azul.
- Yoduro de propidio (PI)⁽⁵¹⁾: También se une a cadenas de DNA, pero no es permeable a membranas, por lo que sólo es capaz de teñir células muertas (que tienen las membranas dañadas) y tiene su máximo de emisión a 615 nm (región visible naranja – roja).
- Calceína⁽⁵²⁾: De los tres compuestos, es el que tiñe exclusivamente células vivas, ya que su aplicación consiste en una transformación enzimática de calceína AM no fluorescente a calceína fluorescente verde, que sólo sucede en células viables. Emite a una longitud de onda de 515 nm (región verde).

La preparación contiene un 1,6% de Hoechst, un 1,2% de PI y un 0,4% de calceína (porcentajes en volumen), diluidos en el mismo medio en el que se encuentren los esferoides.

El primer paso es retirar medio de los pocillos con esferoides, hasta dejar solo 100 μ L; y posteriormente se añaden otros 100 μ L (por pocillo) de la preparación de marcadores celulares. Después, se incuba durante 30 minutos a 37 °C, y se observa en microscopio de fluorescencia.

Los esferoides en los que se lleve a cabo el ensayo de viabilidad quedarán inutilizados a partir de ese momento, ya que la preparación de marcadores es tóxica, por lo que en aquellos experimentos que requieran realizar este ensayo a lo largo de varios días, habrá que preparar suficientes esferoides para poder utilizar al menos uno distinto cada vez.

4.4.2 Microscopio confocal

La microscopía confocal servirá para cuantificar la migración de las células desde el esferoide hacia los canales del chip, ya que permite diferenciar entre planos, así como construir imágenes como si el objetivo estuviese situado en un lateral, pudiendo observar la disposición del esferoide sobre la membrana del chip.

Para que este procedimiento sea posible, los elementos a observar deben emitir fluorescencia, y por eso se utilizan células MDA con expresión de proteína GFP.

Este microscopio va equipado con una cámara donde se introduce la muestra, de temperatura regulable que se fijará a 37 °C para reducir las alteraciones que sufren las células por pasar tanto tiempo fuera del incubador.

4.5 Combinación de esferoides de células MDA con fibroblastos

Uno de los experimentos que se llevará a cabo consistirá en introducir en el mismo pocillo un esferoide de células MDA junto a fibroblastos primarios, obtenidos de tumores de mama extraídos a pacientes.

4.5.1 Preparación de la suspensión celular de fibroblastos

El primer paso de este experimento es obtener los fibroblastos primarios, que provienen directamente de un tumor mamario de paciente. Estas células son cultivadas en un flask T25, con medio DG10 y a una temperatura de 37 °C, con una concentración de CO₂ del 5%. Al alcanzar un 90% de confluencia son tripsinizadas y contadas siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado 4.2.1.1 de este documento, con la salvedad de que en este caso se necesita una suspensión de 5x10⁵ células diluidas en un volumen total de 1 mL de medio DG0, que es equivalente al DG10, pero no contiene FBS, con lo que se facilita la tinción celular. A esta dilución se le añadirán 2,5 µL de Cell Tracker Orange, un marcador celular. La preparación se incubará durante 30 minutos a 37 °C y 5% de CO₂.

4.5.2 Preparación de la matriz de hidrogel de colágeno

Para preparar esta matriz, se seguirán las indicaciones del apartado 4.2.1.5, con la excepción de que parte del agua destilada presente en la mezcla será sustituida por la suspensión celular de fibroblastos (*Fig. 13*).

Se requiere una concentración final de 1.500 fibroblastos por pocillo, lo que supone añadir el equivalente a 3.000 fibroblastos por pocillo en la mezcla del hidrogel, ya que, como se explicaba en el apartado 4.2.1.5, esta mezcla queda diluida 1:2 al ser combinada con el esferoide.

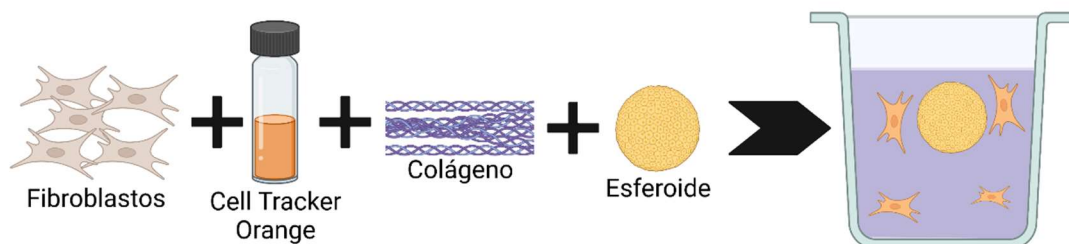


Figura 13: Esquema de la inclusión de fibroblastos en la matriz de colágeno
Creación propia (Biorender)

4.6 Análisis estadístico de los datos

A lo largo de los distintos experimentos, como se indicará en el apartado de Resultados, se han recopilado datos relacionados con el tamaño de los esferoides y la velocidad de migración de las células.

Para ello, utilizando el software del propio microscopio Thunder, tras capturar cada imagen se midió el diámetro del esferoide, y en los casos en los que se quería cuantificar migración, se midió la distancia entre el límite del esferoide y el frente de migración (formado por las células más alejadas del esferoide).

Estos datos fueron incluidos en una hoja de datos Excel, con la que se calculó el promedio y la desviación estándar, procediendo posteriormente a la generación de las gráficas correspondientes.

Además, en el caso de la [Fig. 22](#) se llevó a cabo un ajuste de los puntos, también con Excel.

Los casos en los que el esferoide no se había formado correctamente, y por tanto no se podía cuantificar el crecimiento o migración, fueron eliminados del análisis estadístico.

5. Resultados

5.1 Preparación de esferoides

Como se ha explicado en el apartado de “Métodos”, se han llevado a cabo dos técnicas diferentes para la producción de esferoides, arrojando resultados distintos en cada caso.

5.1.1 Técnica “liquid overlay”

5.1.1.1 Células MDA

Gracias a la experiencia previa del laboratorio con respecto a estas células, las condiciones óptimas para la formación de esferoides mediante la técnica “liquid overlay” eran conocidas, y los resultados han sido los deseados utilizando células MDA.

Dichas condiciones son de 5.000 células por esferoide, y 2,5% de Matrigel en el pocillo.

Los esferoides se observaron durante los siete días posteriores a su formación, estudiando las variaciones de tamaños (Fig. 14, 15) y la viabilidad (Fig. 16) de las células que los forman:

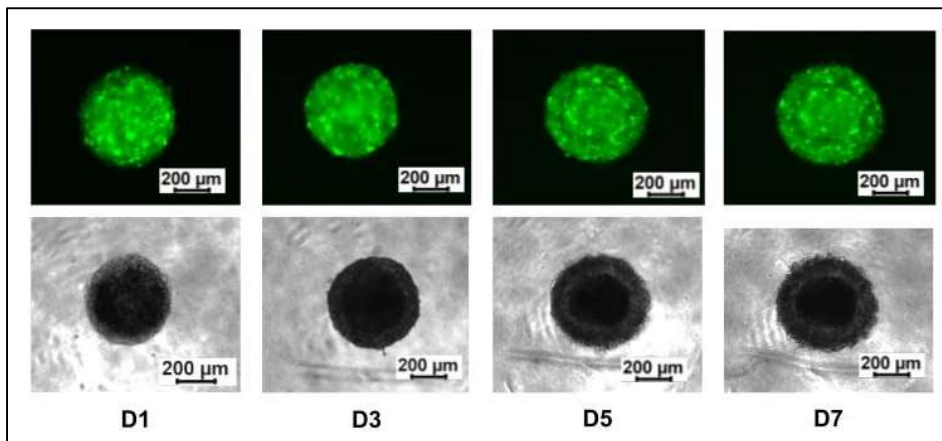


Figura 14: Seguimiento de un mismo esferoide de MDA generado por L-O (5.000 células, 2,5% Matrigel) La fila superior son imágenes obtenidas mediante fluorescencia y la fila inferior mediante contraste de fases. Se considera día 1 (D1) 24 horas después de la adición de Matrigel

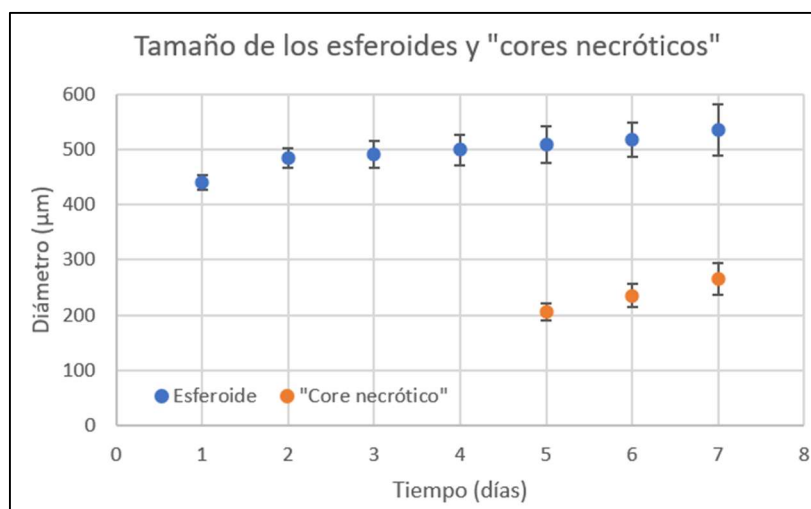


Figura 15: Tamaño de los esferoides y “cores necróticos”

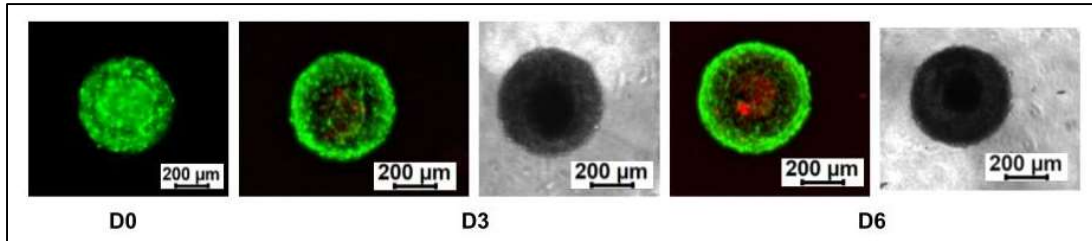


Figura 16: Ensayos de viabilidad en esferoides de MDA generados por L-O (5.000 células, 2,5% Matrigel)
 Se considera día 1 (D1) 24 horas después de la adición de Matrigel
 En las imágenes de fluorescencia las células teñidas de verde son células vivas y las teñidas de rojo son no viables.

En el caso de los tamaños, se observa tanto cualitativa (Fig. 14) como cuantitativamente (Fig. 15) el incremento del diámetro de los esferoides a lo largo del tiempo, así como la aparición y posterior crecimiento del “core necrótico”. En la Fig. 16 se aprecia un aumento de células no viables en la región central del esferoide, correspondiente a ese “core”.

5.1.1.2 Células MCF-7

En el caso de las células MCF-7, la técnica “liquid overlay” no fue tan exitosa como se ha explicado para las células MDA.

Utilizando los mismos parámetros que los descritos en el apartado anterior (5.000 células por esferoide y 2,5 % de Matrigel), se obtuvieron esferoides menos esféricos y compactos, dos características muy importantes a la hora de valorar la calidad de estas formaciones (Fig. 17).

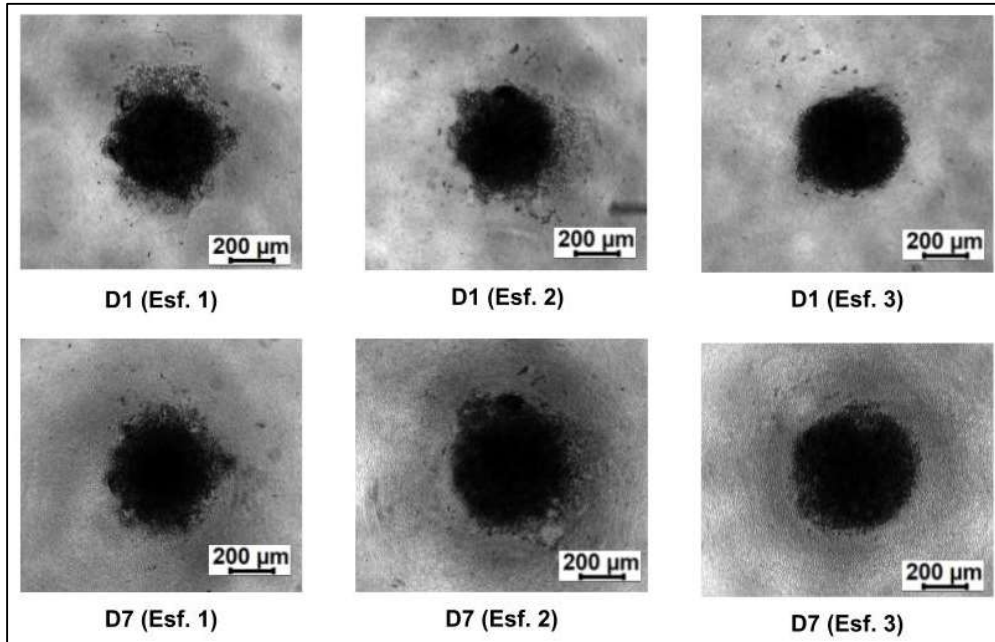


Figura 17: Esferoides de MCF-7 generados por L-O (5.000 células, 2,5% Matrigel)
 Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases.
 Se considera día 1 (D1) 24 horas después de la adición de Matrigel

5.1.2 Técnica “hanging drop” o gota colgante

5.1.2.1 Células MCF-7

Con el objetivo de tratar de conseguir esferoides de células MCF-7 con una forma y un nivel de agregación adecuados, y de acuerdo a estudios previamente publicados^(48,49), se llevó a cabo un procedimiento de “hanging drop” (H-D) o gota colgante con dichas células (Fig. 18).

Se testearon diversas combinaciones de parámetros, modificando el número de células añadidas por gota o la cantidad y tipo de agente agregante:

En las gotas que no contenían agente agregante (0 % de Methocel) no se produjo ningún tipo de estructura compacta. Esto podría ser un resultado esperado, pero en algunas líneas celulares es posible conseguir agregación de células sin necesidad de un reactivo⁽⁵³⁾.

Con 5 % de Matrigel, el resultado fue el mismo. Este compuesto no se suele utilizar en H-D, pero sí que funciona en L-O, por eso se probó con esta técnica. Las células se disponían desperdigadas o más o menos agrupadas en el centro de la gota, pero sin agregar.

Sin embargo, siguiendo el protocolo original, en el que cada gota incluye un 20 % de Methocel, sí que se obtuvieron esferoides. Con este parámetro se probaron dos concentraciones distintas de células. Los esferoides formados por 5.000 células presentaban una esfericidad más regular, además de un tamaño más adecuado para los ensayos posteriores. También se consiguieron esferoides de 1.000 células, pero su forma era más dispar entre las distintas gotas, y su tamaño mucho más pequeño.

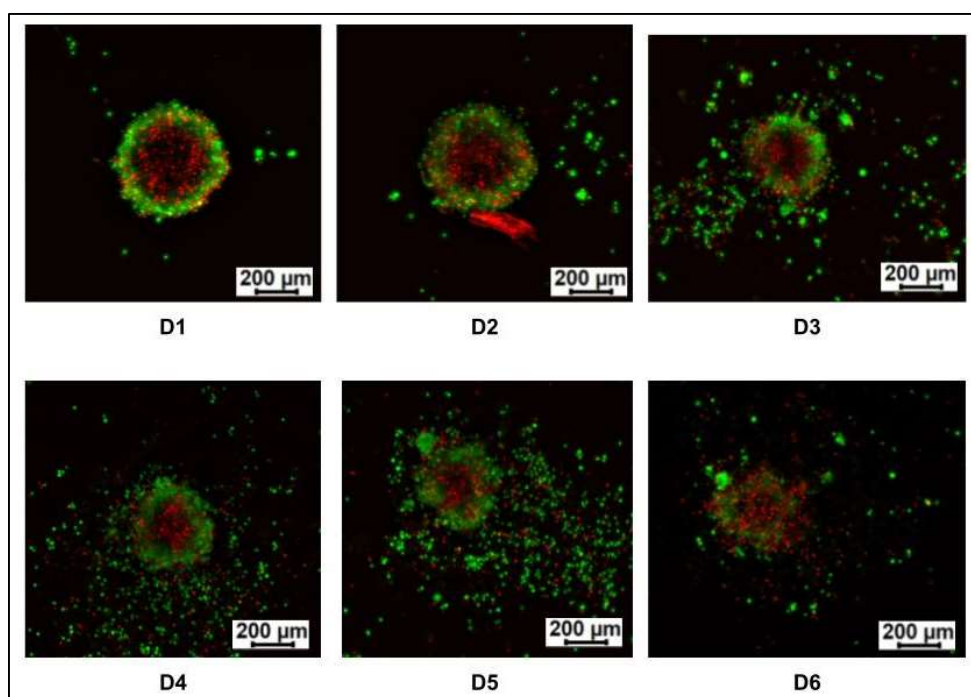


Figura 18: Ensayos de viabilidad en esferoides de MCF-7 generados por H-D (5.000 células, 20% Methocel)
Día 1 (D1): 24 horas después de pasar los esferoides a placa (72 horas después de preparar las gotas colgantes)
Las células teñidas de verde son células vivas y las teñidas de rojo son no viables.

Cabe destacar que el conteo de los días difiere ligeramente del usado en L-O, por lo que realmente habría que sumarles dos días a estos esferoides para poder compararlos con los anteriores, lo cual podría explicar la baja viabilidad celular al sexto día.

5.1.2.2 Células MDA

También se trató de producir esferoides de células MDA mediante H-D, pero las estructuras formadas correspondían a grupos de células sin una forma regular, y mucho menos esférica (Fig. 19).

En este caso se utilizó sólo la combinación de parámetros que mejores resultados había arrojado con las MCF-7: 5.000 células por gota con un 20 % de Methocel, para poder comparar con los esferoides de MCF-7, y también para tener un número de células igual al utilizado con la otra técnica.

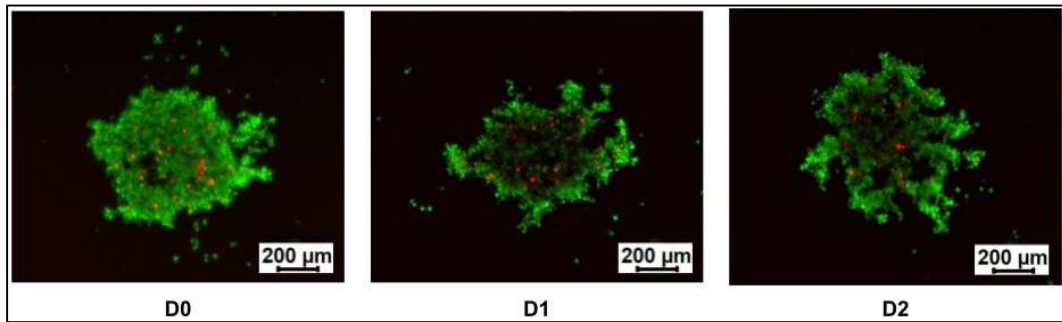


Figura 19: Ensayos de viabilidad en esferoides de MDA generados por H-D (5.000 células, 20% Methocel)
Día 0 (D0): Día en el que se pasan los esferoides a placa (48 horas después de preparar las gotas colgantes)
Las células teñidas de verde son células vivas y las teñidas de rojo son no viables.

5.2 Cuantificación de la migración celular desde el esferoide

5.2.1 Estudios en placa

5.2.1.1 Células MDA

En cuanto a la inclusión de los esferoides a una matriz de hidrogel de colágeno, se utilizó en todos los casos una concentración final de 3 mg/mL de este agente, ya que dicho parámetro también había sido optimizado previamente.

Los esferoides utilizados para esta fase del proyecto fueron los producidos con células MDA mediante L-O.

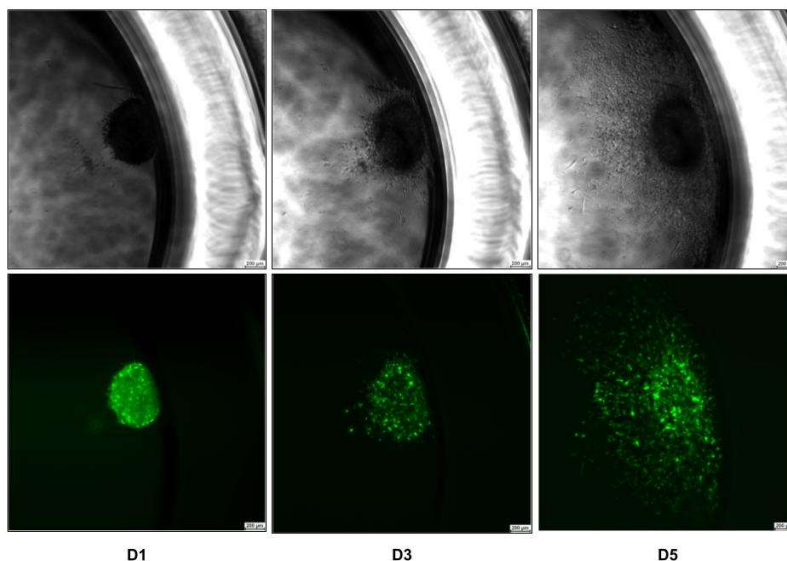


Figura 20: Evolución de un esferoide de MDA generado por L-O (5.000 células, 2,5% Matrigel)
D1 corresponde a 24 horas después de transferir el esferoide a la matriz de colágeno
La fila superior son imágenes obtenidas mediante contraste de fases y la fila inferior mediante fluorescencia

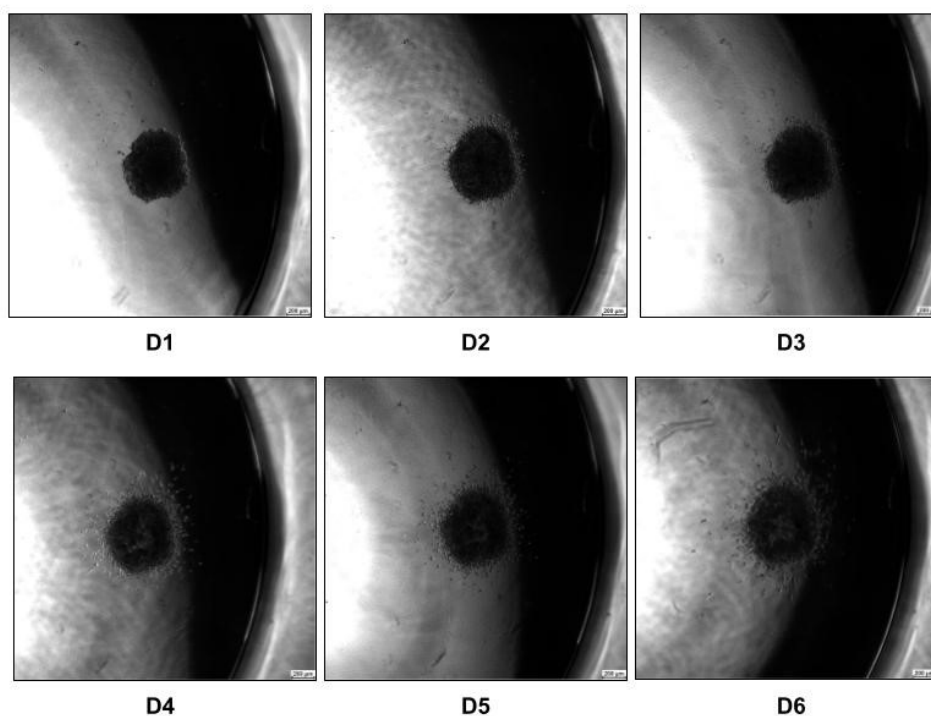


Figura 21: Evolución de un esferoide de MDA generado por L-O (5.000 células, 2,5% Matrigel)
D0 es el día en el que se transfiere el esferoide a la matriz de colágeno

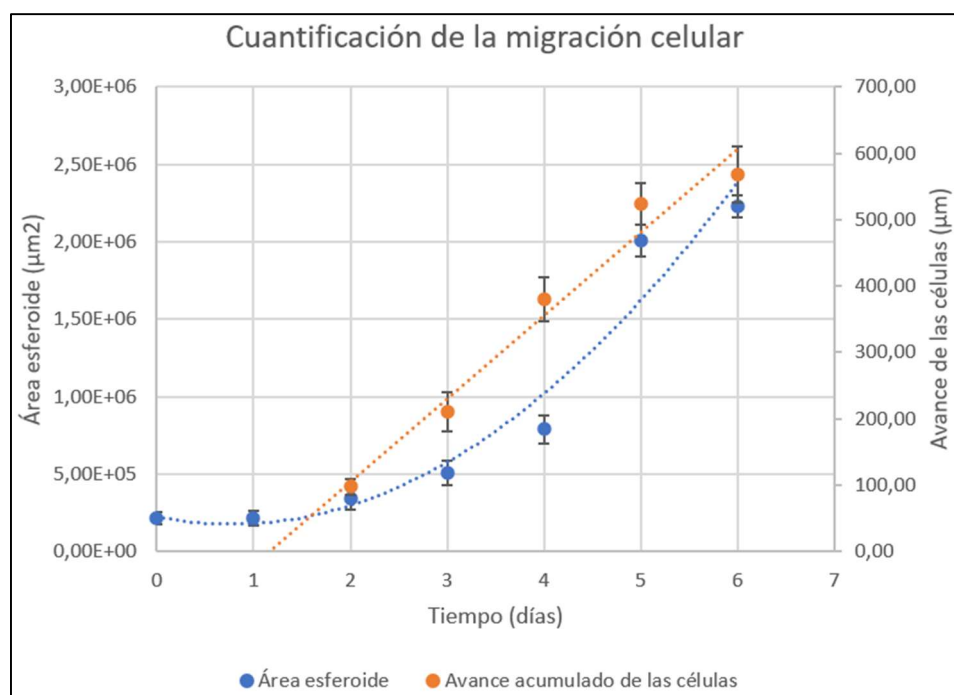
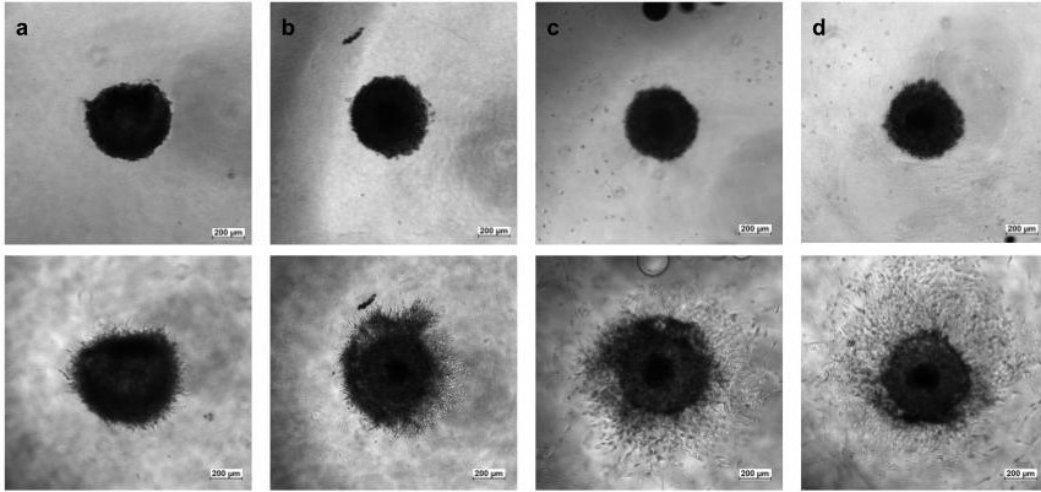


Figura 22: Cuantificación de la migración celular en esferoides de MDA generados por L-O
El área del esferoide se calcula trazando una circunferencia a partir del frente de avance de las células tumorales
Avance acumulado: Distancia de las células más alejadas del esferoide a la superficie del mismo

En este estudio se pudo comprobar tanto cualitativa (Fig. 20, 21) como cuantitativamente (Fig. 22) la invasión de las células MDA hacia la ECM, que en ausencia de gradientes, migran en todas las direcciones desde el esferoide formando un halo de células a su alrededor.

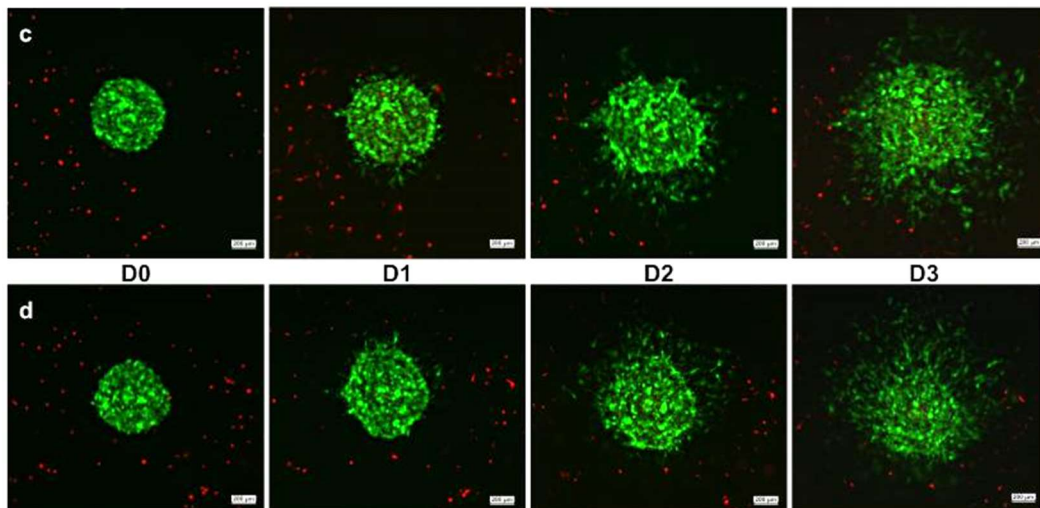
5.2.1.2 Células MDA en combinación con fibroblastos

Se realizó un seguimiento de los esferoides embebidos en matriz de colágeno con y sin fibroblastos durante los tres días siguientes a la transferencia a placa.



*Figura 23: Evolución de cuatro esferoides de MDA generados por L-O
Fila superior: D0 (Día en el que se transfiere el esferoide a la matriz de colágeno)
Fila inferior: D3 (72 horas después de la transferencia a matriz)
Los esferoides a y b no tuvieron contacto con fibroblastos
Los esferoides c y d estaban embebidos en una matriz con 1.500 fibroblastos por pocillo*

En la *Fig. 23* se puede observar que los esferoides en contacto con fibroblastos (*Fig. 23 c, d*) presentan una migración mucho mayor que aquellos sin fibroblastos (*Fig. 23 a, b*).



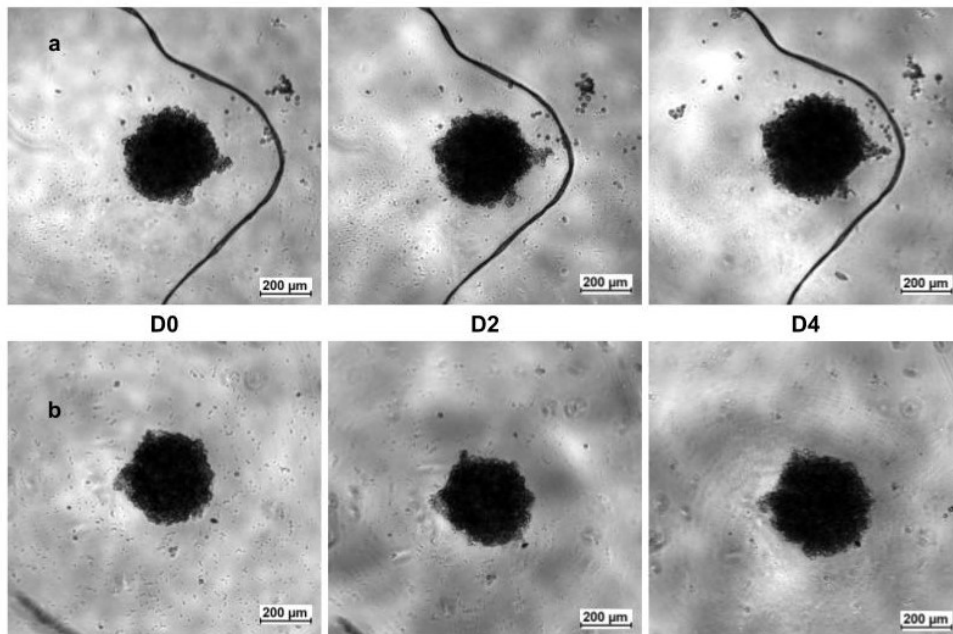
*Figura 24: Evolución diaria de los esferoides c y d de la Fig. 20
Las células tumorales se ven en verde y los fibroblastos en rojo
D0 es el día en el que se transfiere el esferoide a la matriz de colágeno junto a los fibroblastos*

Al comparar la *Fig. 24* con la *Fig. 20* puede apreciarse cómo la migración de las células MDA desde el esferoide cuando se encuentran en presencia de fibroblastos es más rápida.

5.2.1.3 Células MCF-7

Debido a que los esferoides formados por L-O no presentaban un tamaño y un grado de compactación adecuados, no fue posible transferirlos a una matriz de hidrogel de colágeno. De hecho, se intentó en aquellos casos en los que se asemejaban más a los obtenidos con las células MDA, pero en el momento de la transferencia se disgregaban, demostrando que no se trataba de esferoides compactos, sino de agrupaciones de células.

En cuanto a los esferoides de MCF-7 formados por H-D, estos sí fueron satisfactoriamente transferidos a matriz de colágeno, donde se observó que las células no migraban, de acuerdo con lo esperado (*Fig. 25*).



*Figura 24: Evolución de dos esferoides de MCF-7 generados por H-D (5.000 células, 20% Methocel)
D0 es el día en el que se transfiere el esferoide a la matriz de colágeno*

La *Fig. 25* muestra cómo los esferoides de MCF-7 muestran un aspecto igual conforme pasan los días (sólo aumenta ligeramente el tamaño debido a la proliferación celular), sin que aparezca el halo de células migratorias que sí existe en los esferoides de MDA.

5.2.2 Estudios *on-chip*

Sólo esferoides de MDA formados mediante L-O fueron transferidos a chip, y se pudo observar la migración de las células, de forma similar a la que sucedía en placa, pero en este caso con una clara tendencia a desplazarse hacia los canales, que contenían medio rico en nutrientes (Fig. 26).

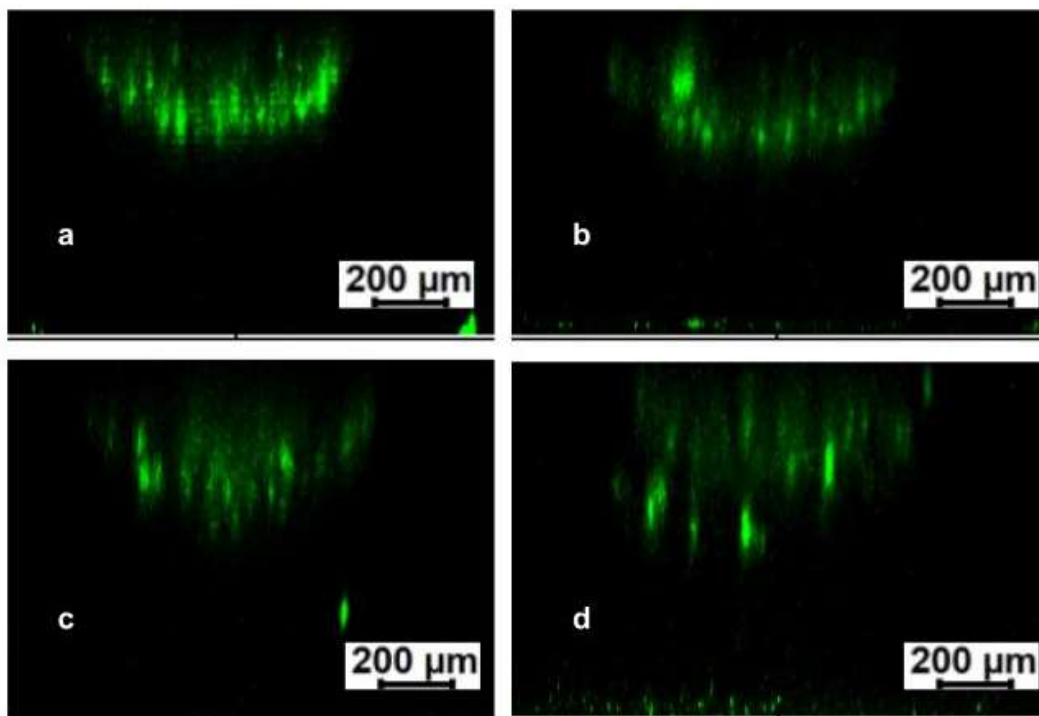


Figura 26: Vistas laterales de dos esferoides obtenidas con el microscopio confocal. El borde superior de cada imagen corresponde al “ecuador” del esferoide, y el borde inferior a la membrana del chip
a) Esferoide 1 en D0 (día de transferencia a chip) b) Esf. 1 en D5 c) Esf. 2 en D0 d) Esf. 2 en D5

El borde inferior de las imágenes de la Fig. 26 corresponde a la membrana porosa que separa los canales con medio rico en nutrientes de los pocillos que contienen a los esferoides. Se puede apreciar cómo algunas células han migrado hacia esta región, quedando retenidas en dicha membrana.

6. Discusión

La primera diferencia entre las dos líneas celulares que se han utilizado en este trabajo se encuentra en el cultivo celular. En el caso de las células MDA, una siembra del 5% de las células presentes en un flask T25 en confluencia (lo cual equivale a alrededor de 10^5 células) era suficiente para que la proliferación fuese viable. Sin embargo, las MCF-7 presentaban problemas para repoblar la superficie del flask cuando la cantidad inicial de células era menor de 4×10^5 células, por lo que en el momento de dar pase se sembraba un 20% de las células en confluencia. Se asume que esto se debe a que las células MCF-7, por su carácter más epitelial, requieren de un mayor contacto intercelular para favorecer su crecimiento, mientras que las células MDA, epiteliales también, pero con un carácter más mesenquimal, pueden proliferar sin necesidad de tener otras células cerca⁽³⁴⁾.

Los estudios de seguimiento y viabilidad de esferoides formados por células MDA mediante la técnica L-O han permitido observar esferoides compactos y esféricos, con un aumento de tamaño a lo largo del tiempo, causado por la proliferación celular, así como la generación de un “core necrótico”, que es una región central con menor disponibilidad de nutrientes y oxígeno, y, por tanto, como se aprecia en la *Fig. 16*, menor proporción de células vivas.

Este “core necrótico” es una formación que se ha observado *in vivo*⁽⁴⁸⁾ en los tumores de pacientes, y el hecho de demostrar su presencia en esferoides generados *in vitro* es uno de los argumentos a favor de este modelo, ya que, para poder reproducir las características de los tumores, uno de los parámetros que se debe incluir es el gradiente de nutrientes y oxígeno que se genera en el interior del tumor como consecuencia inevitable del tamaño de la propia estructura. Esta formación se puede apreciar en las imágenes obtenidas por contraste de fases como una región más oscura alrededor del centro del esferoide; y en las imágenes obtenidas por fluorescencia tras teñir con marcadores de viabilidad, aparece como una región con una gran concentración de células muertas.

Como se indica en la *Fig. 15*, el diámetro de los esferoides ha aumentado a lo largo del tiempo de duración del experimento, así como el tamaño del “core necrótico”, que empieza a poder apreciarse de forma clara a partir del quinto día, o incluso cuarto en algunos casos desde el día de siembra de los esferoides.

En el caso de los esferoides de células MCF generados por L-O, distintas características aparecen en cada esferoide, debido a la débil agregación de estas células, considerándose esta una técnica poco reproducible y repetible. En la *Fig. 17* se puede ver como en algunos casos, representados por el *Esf. 1*, los esferoides inicialmente no estaban agregados, y presentaban un halo de células no agregadas, y con el paso de los días el esferoide se ha ido compactando, aunque no se ha logrado la forma esférica deseada. Las imágenes del *Esf. 2* representan aquellos esferoides en los que sí se aprecia un crecimiento, que en otros casos no aparecía, pero sin mantener una forma definida. Por último, la tercera pareja de imágenes (*Esf. 3*) muestran un esferoide más o menos esférico, con un aumento de tamaño esperado; pero que, en el momento de transferir a una matriz de colágeno, se disgrega con un simple pipeteo, hecho causado por la ausencia de una agregación intercelular real. Por estos motivos la técnica L-O no se considera adecuada para generar esferoides con esta línea celular, y se prueba otra técnica.

Tratando de obtener esferoides de MCF-7 con un comportamiento regular se testeó la técnica “hanging drop” (H-D) o gota colgante, que aparece en estudios anteriores como una buena opción para obtener esferoides con estas células⁽⁴⁹⁾.

Aunque existen líneas celulares que no requieren de agente agregante para formar esferoides con esta técnica⁽⁵³⁾, en el caso de las células MCF-7 quedó patente que sí era necesario, ya que las gotas en las que no se añadió Methocel no contenían estructuras tridimensionales de células agregadas, sino células sueltas y dispersas alrededor del centro de la gota.

En cuanto a los esferoides que se obtuvieron (aquellos generados en gotas con Methocel), se estudió su comportamiento a lo largo de los días (*Fig. 18*), para determinar su durabilidad, y se observó que alrededor de 72 horas después de la transferencia de las gotas a placa de pocillos (lo que supone 120 horas después de su preparación, ya que las gotas se incuban durante 48 horas) la progresiva muerte de las células causaba un proceso de disgregación que finalmente provocaba la desaparición del esferoide. Por este motivo se considera que estos esferoides no deberían mantenerse más de dos días en placa, y en caso de querer transferirse a matriz de colágeno, este sería el momento idóneo.

Al contrario que ocurría con la anterior técnica, al utilizar H-D son las células MDA las que producen resultados dispares, apareciendo en algunos casos formas nada cercanas a esferoides (*Fig. 19*). Este hecho era esperado, a tenor de experimentos previos del laboratorio con esta línea celular, en los que se había concluido que este tipo de células no sufrían agregación con esta técnica.

Es por estos motivos que se decidió transferir a matriz de colágeno exclusivamente los esferoides de MDA formados mediante L-O, para poder estudiar la migración celular desde el esferoide, que corresponde al comienzo de la metástasis, una fase conocida como invasión. Además, también se transfirieron esferoides de MCF-7 formados mediante H-D para comprobar que no ocurre migración en dichas células, como se describe en la literatura⁽³⁴⁾.

En los experimentos llevados a cabo en placa se aprecia un desplazamiento de células MDA prácticamente desde el primer momento, que va aumentando conforme avanza el tiempo. Esta migración no tiene una direccionalidad marcada, ya que todo el entorno del esferoide tiene las mismas características con relación a la concentración de nutrientes y oxígeno. Sin embargo, la migración observada en chip sí es direccional, como ocurre *in vivo*⁽¹⁵⁾ ya que por la parte inferior del dispositivo hay medio de cultivo rico en nutrientes, mientras que las células se encuentran en un ambiente pobre, lo que favorece que la mayoría de la migración suceda hacia la región más favorable para su supervivencia (*Fig. 26*). Estas observaciones coinciden con la situación real de un tumor, en el que las células que migran lo hacen hacia los vasos sanguíneos para conseguir más nutrientes (de hecho, se ha observado en anteriores investigaciones de este laboratorio⁽⁵⁴⁾ una migración masiva de células tumorales desde una zona sin acceso a nutrientes hacia un canal por el que discurría medio rico).

Para observar la migración celular en placa, se capturaron imágenes en distintos momentos del día, y se realizaron “time lapses” durante la noche (O/N). Esto permitió observar que las células en migración detenían su avance y perdían su forma típica, pasando a ser más redondeadas, cuando la placa se mantenía durante horas fuera del incubador (lo cual era imprescindible para realizar los “time lapses”). Por eso, se asume que esta migración es dependiente de la temperatura, o del pH, los dos parámetros fisicoquímicos que se encuentran controlados en el incubador. Cabe destacar que las células sobreviven a este cambio de condiciones, y de hecho al ser reintroducidas en el incubador retoman la migración. En la *Fig. 22* se representa el incremento en el área que

abarca el esferoide (contando el halo de células en migración) y el ritmo de avance de estas células. El ajuste es lineal en el caso del ritmo de avance, ya que según los resultados obtenidos estas células migran a una velocidad más o menos constante; mientras que el área cubierta por el esferoide se ajusta a una función cuadrática ya que en la fórmula del área el radio, que se ve incrementado de forma lineal con el avance de las células, aparece elevado al cuadrado.

El ritmo medio de avance de las células en placa, asumiendo que en chip podría ser incluso mayor, dado que los esferoides se encuentran embebidos en una matriz con las mismas propiedades, pero con gradiente de nutrientes, sugiere que se debería preparar más cantidad de dicha matriz para situar el esferoide a una altura mayor respecto de la base del pocillo del chip, para poder observar el camino recorrido por las células que migran hacia el canal. Sin embargo, esta modificación no ha podido probarse a lo largo de este estudio ya que requiere de un nuevo diseño de chips, así como de un nuevo objetivo para el microscopio que permita abarcar una altura mayor, y del que no se dispone actualmente; por tanto, se sugiere esta línea de experimentación para futuras investigaciones relacionadas. En los experimentos realizados en chip (*Fig. 26*) se ve cómo las células de los esferoides se han desprendido de los mismos y han migrado hacia los canales del dispositivo, quedando retenidas en la membrana porosa que separa el pocillo del canal. Los esferoides se sitúan muy próximos a la membrana, lo que impide observar el proceso completo de migración de las células hacia los canales. Hay que tener en cuenta que al llegar a la membrana y no poder atravesarla, las células quedan atrapadas, y, por tanto, el recorrido en el que se pueden observar migrando es muy corto. Una posible optimización de este ensayo sería la implementación de una captura por vídeo que permita grabar las células realizando la migración desde el esferoide hasta la membrana; sin embargo, asumiendo que se cumple lo observado en placa, las células requieren de condiciones de incubador para migrar, y por tanto esa grabación debería realizarse en dichas condiciones, lo que no es posible en nuestro laboratorio.

En el caso de los esferoides de células MCF-7, se ha comprobado la nula migración de las células tras la transferencia de los esferoides a una matriz de colágeno (*Fig. 25*), comparando los mismos tiempos que en los esferoides de MDA. Este resultado era el esperado, ya que la línea celular MCF-7 no tiene carácter metastático⁽³⁴⁾.

La forma de polimerizar la matriz de colágeno (tanto en placa como en chip) sí que ha podido modificarse para acercarnos al objetivo de observar la migración celular. A este respecto el avance más relevante ha sido la polimerización “inversa”, que consiste en colocar el dispositivo del revés dentro del incubador para provocar que el esferoide “suba” a la superficie de la matriz, consiguiendo así una distancia a la membrana igual en todos los pocillos, que además será la mayor distancia que se puede conseguir en dichos chips. Este cambio en el método se llevó a cabo tras observar en los primeros experimentos que los esferoides se situaban a distintas alturas en cada pocillo, y en muchos casos prácticamente pegados a la membrana del chip.

El último tipo de experimento descrito en este trabajo se basa en cultivar esferoides de MDA en una matriz de colágeno junto a fibroblastos, para poder observar si estas células, típicas de la ECM que rodea los tumores en los pacientes⁽⁴⁴⁾, son capaces de modificar el ritmo de migración de las células. Al segundo día ya se pudo observar de forma cualitativa una migración de más células y a mayor ritmo en aquellos esferoides que estaban embebidos en matriz con fibroblastos, mientras que los controles de dicho experimento,

que no estaban en contacto con fibroblastos, presentaron el mismo ritmo de invasión que se había observado en los experimentos previos sin estas células (*Fig. 23*). Estas observaciones encajan con los resultados esperados considerando que, según las últimas investigaciones, los CAFs son capaces de remodelar la ECM aumentando la movilidad de las células tumorales en migración⁽⁴²⁾. En este caso, además, se utilizaron fibroblastos obtenidos a partir de una muestra de tumor mamario de un paciente, por lo que era más probable que presentasen este comportamiento que si se hubiese utilizado una línea celular de fibroblastos no asociados a tumor; este hecho, unido a que el cultivo de los CAFs se llevó a cabo tratando de alterar lo menos posible sus características, ha podido causar los resultados que se han obtenido.

El siguiente paso sería replicar estos resultados en un chip microfluídico, con medio rico en nutrientes en los canales, para estudiar si también en dichas condiciones los fibroblastos aceleran el ritmo de migración de las células tumorales. Aún así, los resultados obtenidos en la primera fase de este experimento refuerzan la idea de que los modelos tridimensionales son una opción más adecuada que los cultivos bidimensionales para poder incluir la mayor cantidad posible de propiedades del tumor en el modelo⁽⁵⁵⁾.

Respecto al uso de chips microfluídicos para desarrollar modelos de metástasis de cáncer de mama, este trabajo se ha centrado en la primera fase de dicho proceso, la invasión. Estudios posteriores deberían centrarse en el resto de las etapas, aprovechando el potencial que poseen este tipo de dispositivos. Siguiendo esta línea, ensayos en los que se añada una capa de células endoteliales sobre la superficie de los canales del chip y se sustituya la membrana para permitir el paso de las células, podrían permitir estudiar la intravasación, observando cómo las células que han escapado del esferoide atraviesan los poros de la nueva membrana y la monocapa endotelial para acceder al canal sin frenar su recorrido al quedar atrapadas en la membrana. También sería posible usar esa misma disposición para estudiar la circulación, desarrollando un protocolo de captura de células tumorales circulantes (CTC) a la salida de los canales. Por otro lado, si en lugar de disponer las células formando un esferoide dentro del pocillo se liberasen al inicio del canal, podría también estudiarse la extravasación, y si además en el pocillo se añadiese una matriz (con o sin células) podría seguirse la última etapa de la metástasis que es la colonización. Todas estas son propuestas para futuras investigaciones en metástasis de cáncer de mama o de otro tipo.

7. Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado la capacidad de los chips microfluídicos para desarrollar modelos de cáncer de mama, incluyendo la primera etapa de la metástasis, la invasión, un proceso difícil de emular de otra manera.

- La técnica de “liquid overlay” (L-O) permite la formación de esferoides de MDA-MB-231 (MDA), no resultando efectiva para células MCF-7. Para estas células, la única manera de formar esferoides resultó ser la técnica de “hanging drop” (H-D) usando un 20% de Methocel.
- Los esferoides de MDA permiten reproducir el proceso de migración celular en la matriz extracelular de los tumores de mama metastásicos, proceso que no sucede en esferoides de MCF-7, que representarían tumores no metastásicos.
- La técnica de polimerización “inversa” permite conseguir una altura uniforme de los esferoides en la matriz de colágeno, que facilita su visualización a nivel microscópico.
- La siembra de los esferoides de MDA en los chips microfluídicos a estudio permite mantener su capacidad migratoria. La migración en estos dispositivos muestra direccionalidad hacia los canales con medio rico en nutrientes, simulando la migración celular del tumor hacia los vasos sanguíneos. No obstante, investigaciones posteriores deberían centrarse en diseñar nuevos dispositivos en los que las células dispongan de más recorrido para poder observar su desplazamiento completo.
- La presencia de fibroblastos en la matriz de colágeno en la que se embeben los esferoides acelera la migración de las células, y por tanto el ritmo de invasión de las células tumorales, tal y como sucede *in vivo*.

Conclusions

In this work it has been demonstrated the capacity of the microfluidic chips to develop breast cancer models, including the first stage of the metastasis, the invasion, which is a process difficult to emulate in other way.

- The “liquid overlay” (L-O) technique allows the formation of spheroids from MDA-MB-231 (MDA) cells, not being effective for MCF-7 cells. For these cells, the only way of generating spheroids was the “hanging drop” (H-D) technique, using 20% Methocel.
- MDA spheroids enable to reproduce the process of cellular migration in the extracellular matrix of metastatic breast cancer tumors, this process not happening on spheroids from MCF-7 cells, that would represent non-metastatic tumors.
- The “reverse” polymerization technique allows to obtain a uniform height of the spheroids inside the collagen matrix, which eases their visualization at a microscopic level.
- The seeding of the MDA spheroids in the studied microfluidic chips enables to keep their capacity of migration. Migration in these devices shows directionality towards the channels with nutrients rich medium, simulating the cell migration from the tumor to the blood vessels. However, further research should focus on the design of new devices in which the cells enjoy a longer pathway to be able to observe the complete track.
- The presence of fibroblasts in the collagen matrix in which the spheroids are embedded accelerates the migration of the cells, and therefore the pace of invasion of the tumoral cells, just like it happens *in vivo*.

8. Referencias

1. OMS. Cáncer de mama. Datos y cifras [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 24]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
2. American Cancer Society. Survival Rates for Breast Cancer [Internet]. 2022 [cited 2022 Apr 24]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>
3. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. VARIOUS TYPES AND MANAGEMENT OF BREAST CANCER: AN OVERVIEW. *J Adv Pharm Technol Res* [Internet]. 2010 Apr [cited 2022 Apr 24];1(2):109. Available from: </pmc/articles/PMC3255438/>
4. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020;27(1):27–35.
5. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10074):1134–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
6. Kittaneh M, Montero AJ, Glück S. Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark Cancer*. 2013;5:BIC.S9455.
7. Qué es el test | Oncotype DX Breast Recurrence Score® | Oncotype IQ® Spain [Internet]. [cited 2022 Apr 27]. Available from: <https://www.oncotypeiq.com/es-ES/cancer-de-mama/profesional-sanitario/oncotype-dx-breast-recurrence-score/que-es-el-test>
8. American Cancer Society. Pruebas para la expresión genética del cáncer de seno [Internet]. 2019 [cited 2022 Apr 28]. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/pruebas-para-la-expresion-genetica-del-cancer-de-seno.html>
9. metástasis | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://dle.rae.es/metástasis>
10. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
11. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, et al. Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*. 2006;106(7):1624–33.
12. Lu X, Kang Y. Organotropism of breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2007;12(2–3):153–62.
13. Eng LG, Dawood S, Sopik V, Haaland B, Tan PS, Bhoo-Pathy N, et al. Ten-year survival in women with primary stage IV breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;160(1):145–52.
14. Westphal T, Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Greil R. Cure in metastatic breast cancer. *Memo - Mag Eur Med Oncol*. 2018;11(3):172–9.
15. Caballero D, Kaushik S, Correlo VM, Oliveira JM, Reis RL, Kundu SC. Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: From chip to the patient. *Biomaterials* [Internet]. 2017;149:98–115. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.005>
16. Powley IR, Patel M, Miles G, Pringle H, Howells L, Thomas A, et al. Patient-derived explants (PDEs) as a powerful preclinical platform for anti-cancer drug and biomarker

- discovery. *Br J Cancer* [Internet]. 2020;122(6):735–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-019-0672-6>
17. Trujillo-De Santiago G, Flores-Garza BG, Tavares-Negrete JA, Lara-Mayorga IM, González-Gamboa I, Zhang YS, et al. The Tumor-on-Chip: Recent Advances in the Development of Microfluidic Systems to Recapitulate the Physiology of Solid Tumors. *Materials (Basel)* [Internet]. 2019; Available from: www.mdpi.com/journal/materials
 18. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4):910–9.
 19. van der Kuip H, Mürdter TE, Sonnenberg M, McCellan M, Gutzeit S, Gerteis A, et al. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer.* 2006;6:1–11.
 20. Hwang YS, Han SS, Kim KR, Lee YJ, Lee SK, Park KK, et al. Validating of the pre-clinical mouse model for metastatic breast cancer to the mandible. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(1):3–8.
 21. Kim JB, O'Hare MJ, Stein R. Models of breast cancer: Is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res.* 2004;6(1):22–30.
 22. Edelman LB, Eddy JA, Price ND. In silico models of cancer. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(4):438–59.
 23. Wang H, Milberg O, Bartelink IH, Vicini P, Wang B, Narwal R, et al. In silico simulation of a clinical trial with anti-CTLA-4 and anti-PD-L1 immunotherapies in metastatic breast cancer using a systems pharmacology model. *R Soc Open Sci.* 2019;6(5).
 24. Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Tesei A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):1–15.
 25. Takebe T, Wells JM. Organoids by design. *Science (80-).* 2019;364(6444):956–9.
 26. Corning. Permeable Supports [Internet]. [cited 2022 May 23]. Available from: <https://www.corning.com/cala/es/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-snapwell-netwell-falcon-permeable-supports.html>
 27. Skardal A, Devarasetty M, Forsythe S, Atala A, Soker S. A reductionist metastasis-on-a-chip platform for in vitro tumor progression modeling and drug screening. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113(9):2020–32.
 28. Xu Z, Li E, Guo Z, Yu R, Hao H, Xu Y, et al. Design and Construction of a Multi-Organ Microfluidic Chip Mimicking the in vivo Microenvironment of Lung Cancer Metastasis. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(39):25840–7.
 29. Wikswo JP, Block FE, Cliffel DE, Goodwin CR, Marasco CC, Markov DA, et al. Engineering challenges for instrumenting and controlling integrated organ-on-chip systems. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2013;60(3):682–90.
 30. BEOnChip. BE-TRANSFLOW STANDARD [Internet]. [cited 2022 May 23]. Available from: <https://beonchip.com/product/be-transflow-standard/>
 31. Sleeboom JFF, Amirabadi HE, Nair P, Sahlgren CM, Den Toonder JMJ. Metastasis in context: Modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. *DMM Dis Model Mech.* 2018;11(3).
 32. Del Piccolo N, Shirure VS, Bi Y, Goedegebuure SP, Gholami S, Hughes CCW, et al. Tumor-on-chip modeling of organ-specific cancer and metastasis. *Adv Drug Deliv Rev.*

- 2021;175.
33. Lee E, Song HHG, Chen CS. Biomimetic on-a-chip platforms for studying cancer metastasis. *Curr Opin Chem Eng* [Internet]. 2016;11:20–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coche.2015.12.001>
 34. Lacroix M, Leclercq G, Vi M-. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours : an update Uncorrected proof ! Pdf output. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;5254521(5254521):1–41.
 35. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53(3):661–74.
 36. Irvin WJ, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* [Internet]. 2008;44(18):2799–805. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.09.034>
 37. Lee A V., Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(7):1–4.
 38. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3147–54.
 39. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*. 1979 May 1;15(5):659–70.
 40. Aboussekhra A. Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7–9):719–29.
 41. Buchsbaum RJ, Oh SY. Breast cancer-associated fibroblasts: Where we are and where we need to go. *Cancers (Basel)*. 2016;8(2):1–19.
 42. Ping Q, Yan R, Cheng X, Wang W, Zhong Y, Hou Z, et al. Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2021;28(9):984–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41417-021-00318-4>
 43. Joshi RS, Kanugula SS, Sudhir S, Pereira MP, Jain S, Aghi MK. The role of cancer-associated fibroblasts in tumor progression. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1–27.
 44. Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M, Lehti K. Fibroblasts in the tumor microenvironment: Shield or spear? *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1–21.
 45. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1–15.
 46. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(12):792–804.
 47. Metzger W, Sossong D, Bächle A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, et al. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy*. 2011;13(8):1000–12.
 48. Froehlich K, Haeger JD, Heger J, Pastuschek J, Photini SM, Yan Y, et al. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* [Internet]. 2016;21(3–4):89–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>
 49. Zhang W, Li C, Baguley BC, Zhou F, Zhou W, Shaw JP, et al. Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. *Anal Biochem* [Internet]. 2016;515:47–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.004>

50. Bucevičius J, Lukinavičius G, Gerasimaite R. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. *Chemosensors*. 2018;6(2).
51. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1458–61.
52. Bratosin D, Mitrofan L, Pali C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytom Part A*. 2005;66(1):78–84.
53. Gheyntanchi E, Naseri M, Karimi-Busheri F, Atyabi F, Mirsharif ES, Bozorgmehr M, et al. Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell Int [Internet]*. 2021;21(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01898-9>
54. Ayuso JM, Monge R, Martínez-González A, Virumbrales-Muñoz M, Llamazares GA, Berganzo J, et al. Glioblastoma on a microfluidic chip: Generating pseudopalisades and enhancing aggressiveness through blood vessel obstruction events. *Neuro Oncol*. 2017;19(4):503–13.
55. Subia B, Dahiya UR, Mishra S, Ayache J, Casquillas GV, Caballero D, et al. Breast tumor-on-chip models: From disease modeling to personalized drug screening. *J Control Release [Internet]*. 2021;331(December 2020):103–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.057>