



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,
Unidad Monterrey**

Microsistemas para el análisis de biomarcadores: Desde
esferoides hasta células individuales.

Tesis que presenta

Diana Fabiola Cedillo Alcántar

para obtener el grado de Doctora en Ciencias en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nuevo León

Agosto de 2021

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. José Luis García Cordero por brindarme la confianza y la guía para desarrollar este proyecto, además por todas sus enseñanzas, su apoyo y motivación durante todos estos años.

Al Dr. Alexander Revzin y a los miembros de su laboratorio por todo lo que me enseñaron durante mi estancia.

Al Dr. Daniel Sánchez, Dr. Gabriel Caballero, Dr. Jesús Santana y al Dr. Arturo Hernández por aceptar formar parte de mi comité y por sus valiosos comentarios o sugerencias.

A mis actuales y antiguos compañeros de laboratorio por todo lo que aprendí de ellos y por su amistad.

A Roberto Rodríguez por todo su amor, su motivación y apoyo incondicional.

A mi papás y hermanos por todo su cariño y apoyo que me han dado a lo largo de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado y al CINVESTAV por la oportunidad de cursar este doctorado.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
TABLA DE CONTENIDO	3
ABSTRACT	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 El Hígado.....	8
1.1.1 Estructura del hígado humano	8
1.1.2 Células del hígado.....	11
1.1.3 Funciones del hígado	13
1.1.4 Zonación hepática y heterogeneidad en los hepatocitos.....	14
1.2 Modelos <i>in vitro</i> para el estudio del hígado	16
1.2.1 Cultivos en monocapa o planares (2D).....	17
1.2.2 Cultivos tridimensionales (3D).....	19
1.2.3 Hígado-en-chip.....	20
1.3 Sistemas microfluídicos para análisis de biomarcadores.....	23
1.3.1 Análisis de cultivos microfluídicos 3D.....	25
1.3.2 Análisis de células individuales	27
1.4 Justificación.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo General	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIALES Y METODOS.....	32
3.1 Sistema microfluídico para el cultivo y análisis de esferoides.....	32
3.1.2 Fabricación	32
3.1.2.1 Fabricación de moldes	32
3.1.2.2 Fabricación de dispositivos de PDMS.....	41
3.1.3 Operación de los sistemas microfluídicos.....	43
3.1.3.1 Módulos de cultivo de esferoides y de detección de analitos	45
3.1.3.2 Dispositivo integrado para cultivo y análisis de esferoides	47

3.1.4 Preparación de los dispositivos.	49
3.1.4.1 Módulo para cultivo de esferoides.	49
3.1.4.2 Módulo de detección de analitos basado en gotas	50
3.1.4.3 Dispositivo integrado para cultivo y análisis de esferoides	51
3.1.5 Cultivo y formación de esferoides de hepatocitos	52
3.1.6 Preparación de las soluciones para los ensayos	54
3.1.7 Curvas de calibración	54
3.1.8 Monitoreo del daño hepático en esferoides	55
3.1.9 Experimento de estimulación con insulina/glucagón.	57
3.1.9 Análisis de imágenes	59
3.2 Sistema microfluídico para el análisis de células individuales	61
3.2.2 Fabricación	61
3.2.2.1 Fabricación de moldes	61
3.2.2.2 Fabricación de dispositivos de PDMS.	67
3.2.3 Operación.	67
3.2.3.1 Dispositivo de células individuales	67
3.2.4 Preparación de los dispositivos.	68
3.2.5 Cultivo de líneas celulares y aislamiento de monocitos	69
3.2.6 Preparación de las microperlas	70
3.2.7 Curvas de calibración	71
3.2.8 Detección de citocinas secretadas por células individuales	71
3.2.9 Análisis de imágenes.	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
4.1 Sistemas microfluídico para el cultivo y análisis de esferoides.	74
4.1.1 Módulos de cultivo de esferoides y de detección de analitos	74
4.1.1.1 Diseño de los módulos.	75
4.1.1.2 Módulo para cultivo de esferoides.	79
4.1.1.3 Módulo de detección de biomarcadores basado en gotas.	84
4.1.1.4 Monitoreo del daño hepático en esferoides.	99
4.1.2 Dispositivo integrado para cultivo y análisis de esferoides.	104
4.1.2.1 Diseño del dispositivo.	105
4.1.2.2 Comparación de pozos con diferente profundidad.	107
4.1.2.3 Caracterización del dispositivo integrado	113

4.1.2.4 Estimulación dinámica con insulina/glucagón	116
4.2 Sistema microfluídico para el análisis de células individuales	119
4.2.1 Características del dispositivo.....	119
4.2.2 Diseño del dispositivo.....	121
4.2.3 Caracterización de la ocupación de las trampas.....	123
4.2.4 Curva de calibración contra IL-8 usando las perlas	126
4.2.5 Detección de citocinas secretadas por células individuales	129
5. CONCLUSIONES	133
6. PERSPECTIVAS.....	135
7. REFERENCIAS	137

ABSTRACT

The liver is an essential organ in the human body that performs various functions such as detoxification, storage or release of glucose, bile secretion, protein synthesis, among others. The use of in vitro models such as three-dimensional hepatocyte cultures are a reliable alternative to study how liver functions are altered under injurious conditions. This work presents the development and characterization of microfluidic systems for formation, culture, and analysis of hepatocyte spheroids. The system consists of two modules, one for spheroid culture and other module for analysis, which is a droplet-based microfluidic device. The analysis module allows automated generation of microdroplets for mixing the culture medium with the assay reagents to measure bile acids, lactate dehydrogenase and glucose. The concentration changes of metabolites produced by primary rat hepatocyte spheroids were monitored for 96 hours. A microfluidic device integrated with a microchamber to form and culture the spheroids and with a droplet formation area within the same device was also developed. Dynamic stimuli with insulin or glucagon were performed on hepatocyte spheroids. In the analysis area, microdroplets were generated with the conditioned medium and assay reagents to measure glucose consumption and release after stimuli. This work also presents the development and characterization of a microfluidic device for single cell analysis for future hepatocyte spheroid heterogeneity studies. The platform allows the controlled capture and isolation of single cells and microbeads for protein secretion analysis. In this device, we characterized the trap occupancy and solution exchange in isolated microchambers, additionally a calibration curve and IL-8 secretion assays in peripheral blood monocytes were performed to test the performance of the device.

RESUMEN

El hígado es un órgano esencial en el cuerpo humano que realiza diversas funciones de desintoxicación, almacenamiento o liberación de glucosa, secreción de bilis, síntesis de proteínas, entre otras. El uso de modelos *in vitro* como los cultivos tridimensionales de hepatocitos son una alternativa fiable para estudiar cómo se alteran las funciones hepáticas bajo condiciones nocivas. En este trabajo se presenta el desarrollo y caracterización de sistemas microfluídicos para la formación, cultivo y análisis de esferoides de hepatocitos. El primer sistema consta de dos módulos, uno para el cultivo de los esferoides y otro módulo es un dispositivo microfluídico basado en gotas para análisis. El módulo de análisis permite de forma automatizada generar microgotas para mezclar el medio de cultivo con los reactivos del ensayo para medir ácidos biliares, lactato deshidrogenasa y glucosa. Con este sistema se monitoreó por 96 horas los cambios de concentración de los metabolitos producidos por los esferoides de hepatocitos de rata primarios. También se desarrolló un dispositivo microfluídico integrado con una microcámara para formar y cultivar los esferoides y con un área de formación de gotas dentro del mismo dispositivo. Con el dispositivo integrado se realizaron estímulos dinámicos con insulina o glucagón a los esferoides de hepatocitos. En el área de análisis se generaron microgotas con el medio condicionado y los reactivos del ensayo para medir el consumo y liberación de glucosa después de los estímulos. En este trabajo también se presenta el desarrollo y caracterización de un dispositivo microfluídico para el análisis de la secreción de células individuales para futuros análisis de heterogeneidad de esferoides de hepatocitos. La plataforma permite capturar y aislar de forma controlada células individuales y microperlas para el análisis de secreción de proteínas. En este dispositivo se caracterizó la ocupación de la trampa y el intercambio de soluciones en microcámaras aisladas y para probar el funcionamiento del dispositivo se realizó una curva de calibración y ensayos de secreción de IL-8 en monocitos de sangre periférica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Hígado

El hígado es uno de los órganos más grande del cuerpo humano, se encuentra situado en la zona abdominal, debajo del diafragma y tiene un peso aproximado de entre 1400 a 1600 g [1]. El hígado es un órgano con diversas funciones metabólicas necesarias para mantener la homeostasis en el cuerpo humano. Participa en la producción de ácidos grasos, proteínas plasmáticas, factores de coagulación y ácidos biliares. También, intervienen en la eliminación de toxinas y fármacos, además almacena sustancias como glucógeno, hierro y vitaminas [2].

1.1.1 Estructura del hígado humano

Anatómicamente el hígado humano está dividido en cuatro grandes lóbulos: el derecho, el izquierdo, el cuadrado y el caudado (Figura 1.1a) [1]. El hígado recibe el 75% de la sangre a través de la vena porta, siendo sangre desoxigenada y rica en nutrientes proveniente del tracto gastrointestinal, el páncreas y el bazo [3]. El hígado también está conectado a la arteria hepática que suministra el 25% de sangre restante, la cual está oxigenada y viene de la aorta [3]. Los canalículos biliares recogen la bilis secretada en el hígado y la transportan hacia los conductos biliares que desembocan en el conducto biliar común para después almacenarla en la vesícula biliar o enviarla al intestino (Figura 1.1b) [4]. El hígado está formado por el parénquima, que son placas de hepatocitos; el estroma, que es tejido conjuntivo; los sinusoides, que son los vasos que transportan la sangre

y el espacio de Disse (perisinusoidal), que está entre los hepatocitos y las células endoteliales de los sinusoides [1].

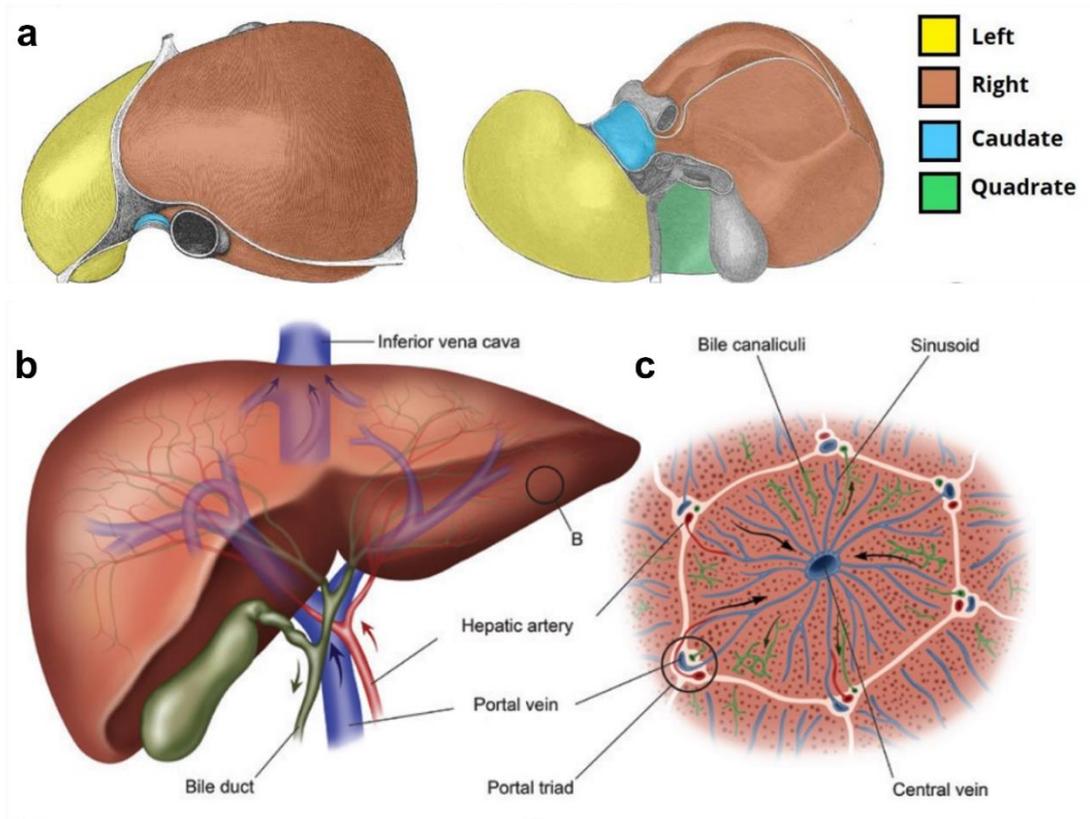


Figura 1.1. (a) Imagen mostrando los cuatro lóbulos anatómicos en la superficie superior (izquierda) y en la inferior (derecha) del hígado. (b) Ilustración del hígado con el ducto biliar, la vena porta y la arteria hepática. (c) Un lobulillo hepático con la triada portal y la vena central, tomada de [5].

Las estructuras microscópicas del hígado se pueden ver de dos formas o unidades funcionales: como lobulillos hepáticos o como acinos hepáticos (Figura 1.2) [6]. Los lobulillos hepáticos son tridimensionales y tienen una forma hexagonal en cuyo centro está la vena central y en las orillas la triada portal, la cual incluye una rama de la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar (Figura 1.1c) [1,7]. Estos lobulillos tienen sinusoides hepáticos y placas con

células del hígado. Los sinusoides hepáticos son capilares por donde fluye sangre desde la vena porta y la arteria hepática hacia la vena central y están organizados en forma radial entre esas estructuras. El acino hepático es una microestructura anatómica considerada como la unidad funcional en términos del flujo sanguíneo, también formada con sinusoides hepáticos. Tiene forma de diamante con dos triadas portales y dos venas centrales adyacentes, además se caracteriza por tener tres zonas: la zona 1 o periportal, la zona 2 o intermedia y la zona 3 o pericentral (Figura 1.2) [7,8].

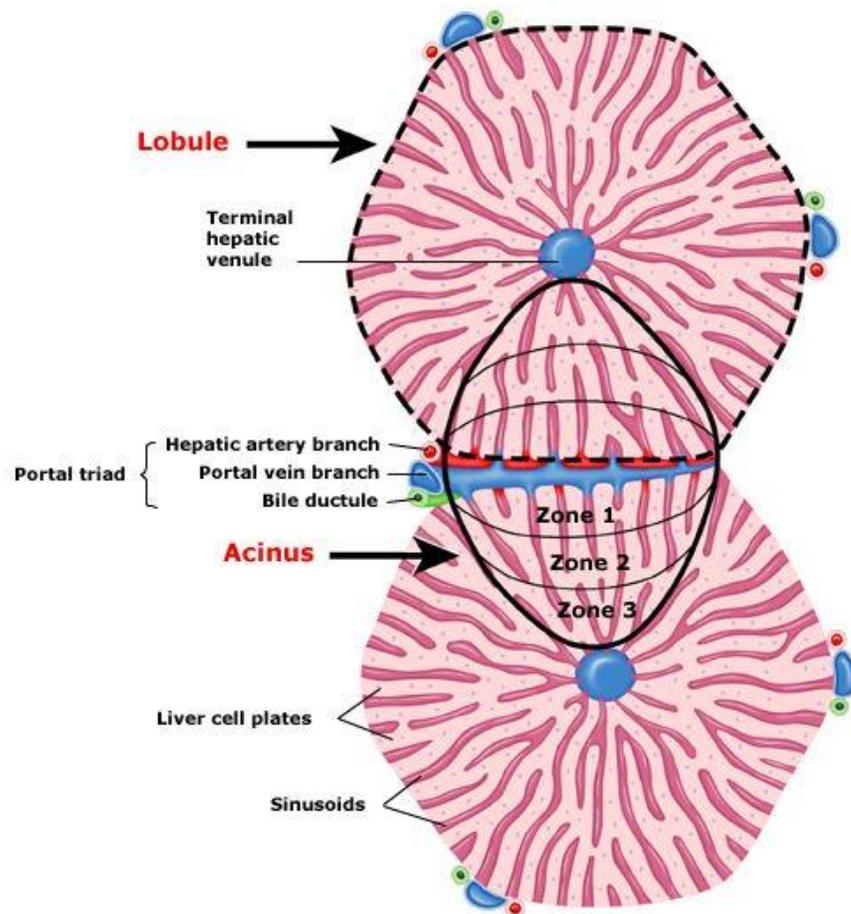


Figura 1.2. Representación de un lobulillo y un acino hepático, formados por los sinusoides, la vena central, la triada portal y la placa con células del hígado, tomada de [9].

1.1.2 Células del hígado

A lo largo de los lobulillos hay placas que contienen hepatocitos, los cuales son el principal tipo de célula funcional del hígado y son los más abundantes, ocupando el 60% del total de células en el hígado. Los hepatocitos son células epiteliales poliédricas con tamaños aproximados de 30 μm [1]. Son células altamente polarizadas, su membrana basolateral (sinusoidal) tiene una gran superficie debido a la presencia de microvellosidades (Figura 1.3). La membrana basolateral está en contacto con el espacio de Disse (Figura 1.4), que permite la captación o liberación de moléculas secretadas por las células hacia el lumen de los sinusoides. Por la membrana apical o canalicular, los hepatocitos son conectados entre sí por uniones estrechas y forman los canálculos biliares, por donde secretan la bilis, los cuales están perpendiculares a los capilares [1].

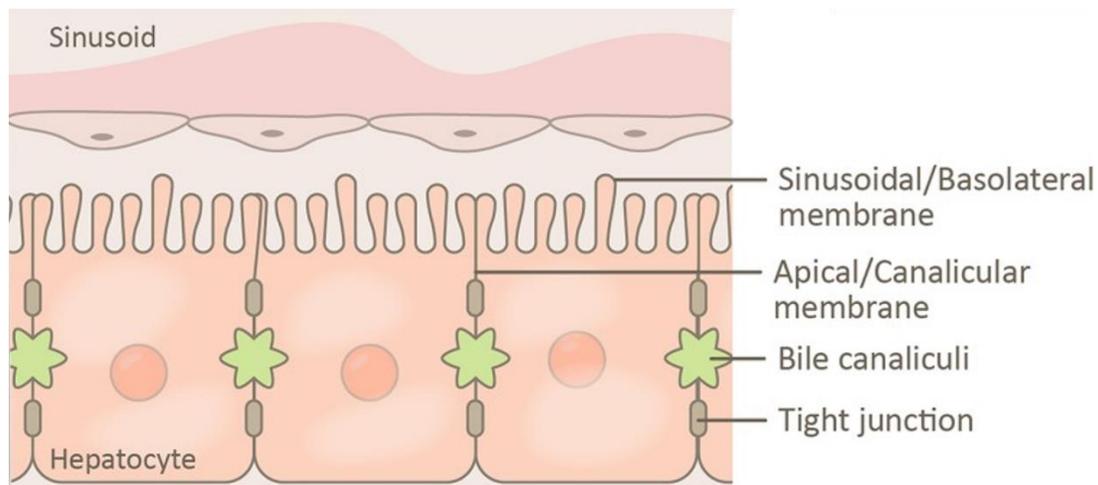


Figura 1.3 Representación de hepatocitos polarizados, se muestran sus membranas apicales y basolaterales, tomada de [10].

Los sinusoides están revestidos por las células endoteliales sinusoidales del hígado, las cuales están fenestradas para permitir el paso de moléculas como nutrientes, proteínas, hormonas y toxinas desde el lumen hacia al espacio de Disse (Figura 1.4) [1,7]. Éstas células constituyen el 19 % de las células del hígado y regulan el tono vascular hepático o la tensión en las paredes de los

vasos ayudando a mantener una baja presión en la vena porta, tienen una gran capacidad de endocitosis de las células humanas, además participan en la regeneración del hígado tras una lesión hepática aguda [11]. Las células de Kupffer comprenden el 15% de las células del hígado y son macrófagos residentes que se encuentran en la parte luminal de los sinusoides, siendo la primera línea de defensa, fagocitando patógenos que entran desde la circulación [12]. Éstas células secretan citocinas proinflamatorias cuando existe un daño hepático y también reclutan otras células como monocitos, neutrófilos y células NK [13,14].

Finalmente, en el espacio de Disse se encuentran las células estrelladas o células de Ito, las cuales almacenan vitamina A en gotas lipídicas y están involucradas en la remodelación de la matriz extracelular tras la recuperación de alguna lesión [15]. En el hígado sano, estas células están quiescentes y se activan por las citocinas secretadas por las células de Kupffer, además pueden detectar patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) [15,16].

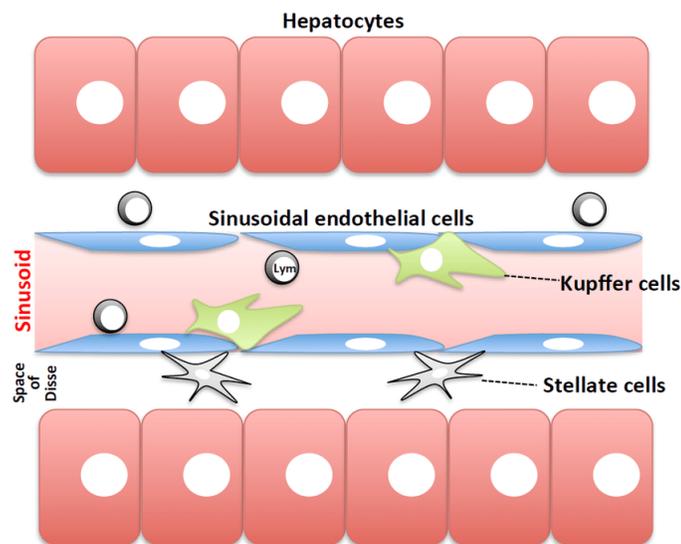


Figura 1.4 Ilustración mostrando las células del hígado: hepatocitos, células de Ito o estrelladas, células de Kupffer y células endoteliales. También se muestra un sinusoides y el espacio de Disse, tomada de [17].

1.1.3 Funciones del hígado

Las principales funciones del hígado se pueden agrupar en secreción de bilis, metabolismo de la bilirrubina, metabolismo de nutrientes y desintoxicación metabólica [18]. El hígado secreta de 700 a 1200 mL de bilis en un día, el cual es producido por los hepatocitos y ayuda a la digestión de los lípidos. La bilis está compuesta por sales biliares que son ácidos biliares conjugados por colesterol, bilirrubina, fosfolípidos, electrolitos y agua [18–21]. Las sales biliares son necesarias para la emulsión y absorción de las grasas en el intestino. El hígado participa en la hemólisis recibiendo bilirrubina no conjugada desde la circulación, la cual es un subproducto de la destrucción de los glóbulos rojos envejecidos. En los hepatocitos se forma la bilirrubina conjugada, la cual es soluble en agua y puede ser excretada en la bilis [18,20]. Entre las funciones del hígado en el metabolismo de los lípidos está la lipogénesis, que es la generación de ácidos grasos a partir de acetil coenzima A (Acetil-CoA) [18,22]. También sintetiza triglicéridos, fosfolípidos y se lleva a cabo la β -oxidación, en donde se metabolizan ácidos grasos para degradarlos a Acetil-CoA, el cual entra al ciclo del ácido cítrico para producir energía en forma de ATP [22]. El hígado tiene un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos, ya que libera glucosa en condiciones de hipoglucemia mediante la glucogenólisis (el glucógeno se descompone para producir glucosa) o la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de ácidos grasos y aminoácidos) [23,24]. Los hepatocitos consumen glucosa y la almacenan en forma de glucógeno hepático (glucogenogénesis) o transforman la glucosa en dos moléculas de piruvato que a su vez producen Acetil-CoA para obtener energía cuando entra al ciclo del ácido cítrico [23,24]. El hígado sintetiza proteínas plasmáticas como la albúmina y globulinas (excepto gammaglobulina), proteínas de transporte, así como fibrinógeno, protrombina y factores de la coagulación [18,25]. También sintetiza enzimas como lactato deshidrogenasa (LDH), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) [18]. El hígado metaboliza sustancias endógenas o exógenas (xenobióticos) para evitar su acumulación excesiva que genere efectos

adversos [18,20]. Por ejemplo, el hígado transforma los xenobióticos lipofílicos a solutos hidrofílicos mediante la familia de las enzimas del citocromo P450 [20].

1.1.4 Zonación hepática y heterogeneidad de los hepatocitos

Estructuralmente el hígado es un órgano homogéneo con una estructura uniforme; sin embargo, las funciones que realizan los hepatocitos son heterogéneas [8,23,26]. En los acinos hepáticos, se destaca la forma del suministro de sangre, ya que existe un gradiente de oxígeno [8]. Los hepatocitos que se encuentran más cerca de la zona periportal (zona 1) están expuestos a una mayor concentración de oxígeno y los que están en la zona pericentral o perivenosa (zona 3) les llega menos oxígeno, mientras que en la zona 2 la concentración de oxígeno es intermedia (Figura 1.5). [7,8,23]. Debido a este gradiente, las funciones de los hepatocitos a lo largo del sinusoides son diferentes dependiendo de su ubicación y a esto se le llama zonación hepática. Por ejemplo, los hepatocitos más cercanos a la zona periportal tiene mayor actividad de liberación de glucosa mediante gluconeogénesis y la degradación de glucógeno (glucogenólisis) [8,23,27]. Además, en la zona 1 hay mayor oxidación de los ácidos grasos así como síntesis de proteínas como albúmina [23,27,28]. Por otra parte, en la zona pericentral, existe mayor consumo de glucosa, se incrementa la glucólisis y la síntesis de glucógeno, además aumenta el metabolismo de los xenobióticos y la síntesis de ácidos biliares [8,23,27].

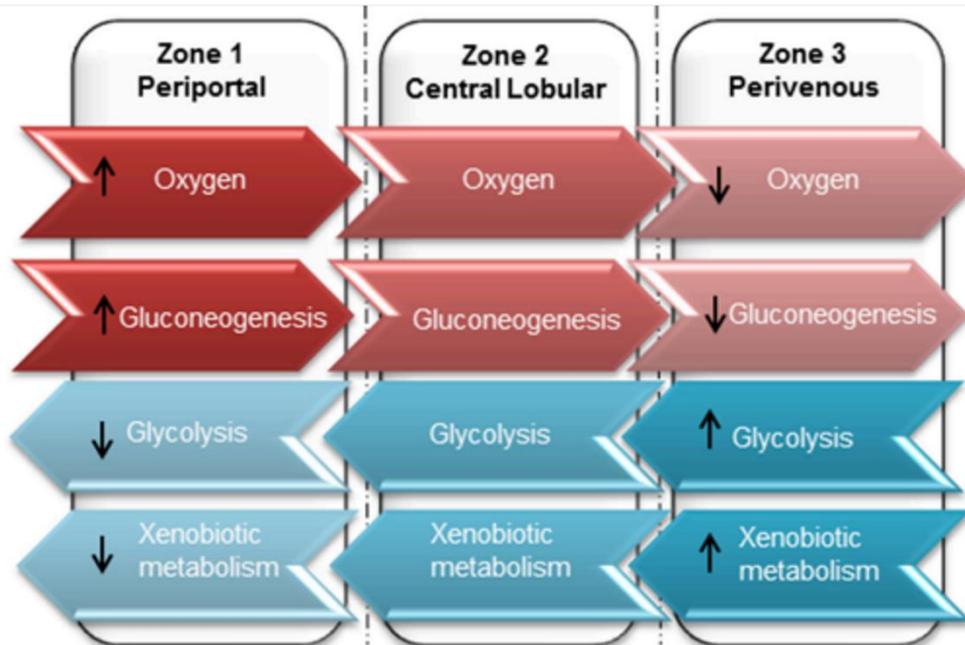
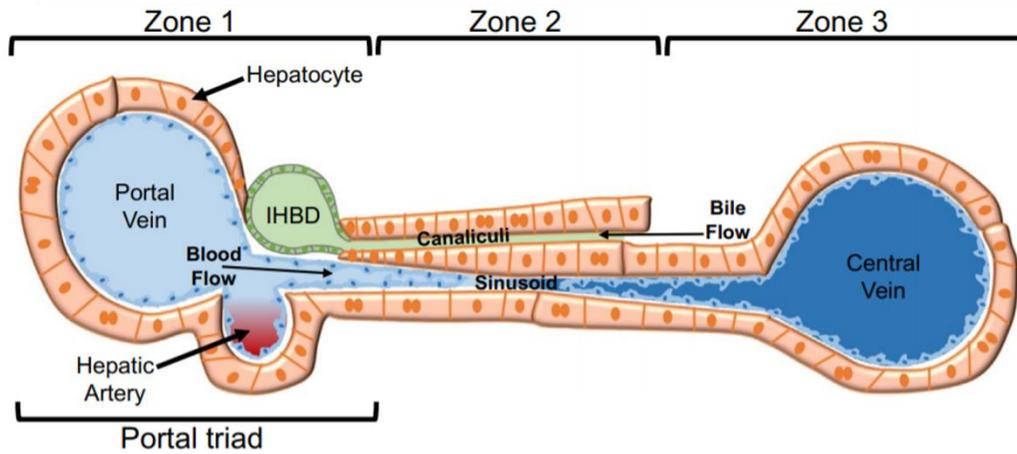


Figura 1.5 Esquema de un sinusoido mostrando las tres zonas del hígado donde los hepatocitos de la zona 1 están expuestos a mayor concentración de oxígeno a diferencia que los que están en la zona 3. Se enlistan las principales funciones de las células en cada zona, tomada de [27,29].

1.2 Modelos *in vitro* para el estudio del hígado

Como ya se ha mencionado, el hígado realiza múltiples funciones para mantener la homeostasis en el cuerpo humano; sin embargo, estas se pueden ver afectadas cuando existe un daño hepático. Algunas de las razones que conllevan a un daño hepático son: las infecciones por virus de la hepatitis, el abuso crónico del alcohol, acumulación de grasa en el hígado (enfermedad por hígado graso no alcohólico), o puede ser inducido por medicamentos [30–33]. Se han usado modelos *in vivo* para estudiar las funciones del hígado, principalmente para la investigación de nuevos fármacos. Sin embargo, los estudios *in vivo* en animales requieren mucho tiempo, son costosos y existen restricciones éticas en su uso [34,35]. Además, se dificulta distinguir los efectos primarios de las sustancias probadas en el hígado, ya que se involucran otros factores como las interacciones complejas con otros órganos [36].

Los modelos *in vitro* son sistemas usados ampliamente en estudios de toxicidad hepática, ya que se disminuye el número de animales empleados reduciendo costos de cuidado y mantenimiento animal. Además, con los modelos *in vitro* pueden realizarse mayor cantidad de pruebas (mayor rendimiento) para evaluar fármacos y se reducen los tiempos de los ensayos. [35,36]. Un modelo *in vitro* que permite conservar la arquitectura del hígado, consiste en aislar el órgano entero y perfundirlo con los fármacos; sin embargo, es difícil de manipular y su funcionalidad no se mantiene más que unas horas [28]. Otros modelos *in vitro* usados actualmente para el estudio del hígado son los cultivos planares o monocapa (cultivo 2D), esferoides/organoides (cultivo 3D) e hígado-en-chip usando microfluídica (Figura 1.6) [37].

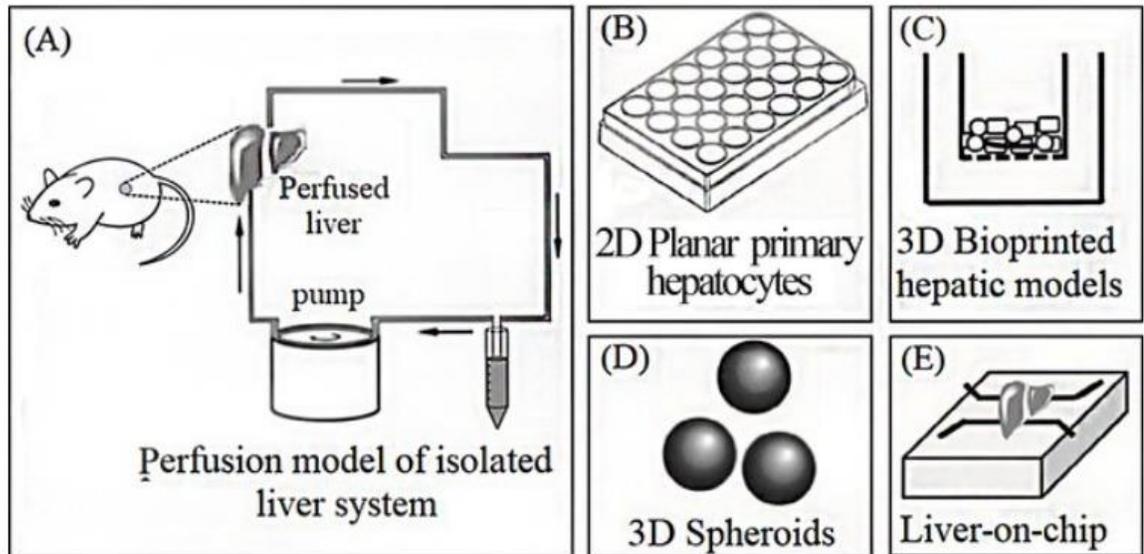


Figura 1.6 Ilustración con los diferentes modelos hepáticos *in vitro*. (a) Aislamiento y perfusión del hígado completo del animal, (b) Cultivos planares o en monocapa 2D, (c y d) Cultivos tridimensionales, (e) Hígados-en-chip, tomada de [37].

1.2.1 Cultivos en monocapa o planares (2D)

En cultivos 2D, los hepatocitos primarios de rata o derivados de una línea celular son cultivados en un sustrato plano, generando una monocapa de células. Estos cultivos 2D son ampliamente usados y permiten realizar estudios de citotoxicidad. Por ejemplo, con modelos 2D se estableció que el ácido oleico y el ácido palmítico inducen el desarrollo de daño hepático generando esteatosis (exceso de grasa en el hígado) dosis dependiente en cultivos primarios [38]. Con estos modelos, se encontró que el efecto citotóxico del ácido palmítico está asociado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen apoptosis y necrosis, así como un decremento en la producción de albúmina [38]. Una de las desventajas que tienen los cultivos monocapa en placas convencionales de 6, 12 o 24 pozos es que solo se mantienen en condiciones estáticas, por lo que no permiten recapitular condiciones dinámicas que puedan

ser fisiológicamente relevantes, como la zonación del hígado [27]. Una forma de mimetizar más de cerca el microambiente celular hepático consiste en la perfusión constante de medio fresco, lo que provee nutrientes y remueve desechos de forma continua [27]. En un estudio se demostró la importancia de incorporar perfusión y diferentes tensiones de oxígeno a estos modelos *in vitro* (Figura 1.7) [27]. Para esos experimentos, los hepatocitos primarios de rata se cultivaron en monocapa sobre un cubreobjetos y se colocaron dentro de una cámara de perfusión. La tensión de oxígeno se controló al variar la altura del cubreobjetos con insertos depositados en el fondo de la cámara [27]. Al analizar la expresión de genes, estos mostraron función metabólica relacionada con las zonas hepática dependientes de la concentración de oxígeno [27]. Con dicho modelo se pudo determinar el rol que juega la concentración de oxígeno sanguíneo en el proceso de zonación [27]. A pesar del conocimiento que se puede generar con los cultivos 2D, una gran desventaja que presentan es que las funciones específicas de los hepatocitos, como secreción de albúmina y metabolismo de fármacos se pierde a los pocos días o incluso a las pocas horas, lo que limita su uso [37].

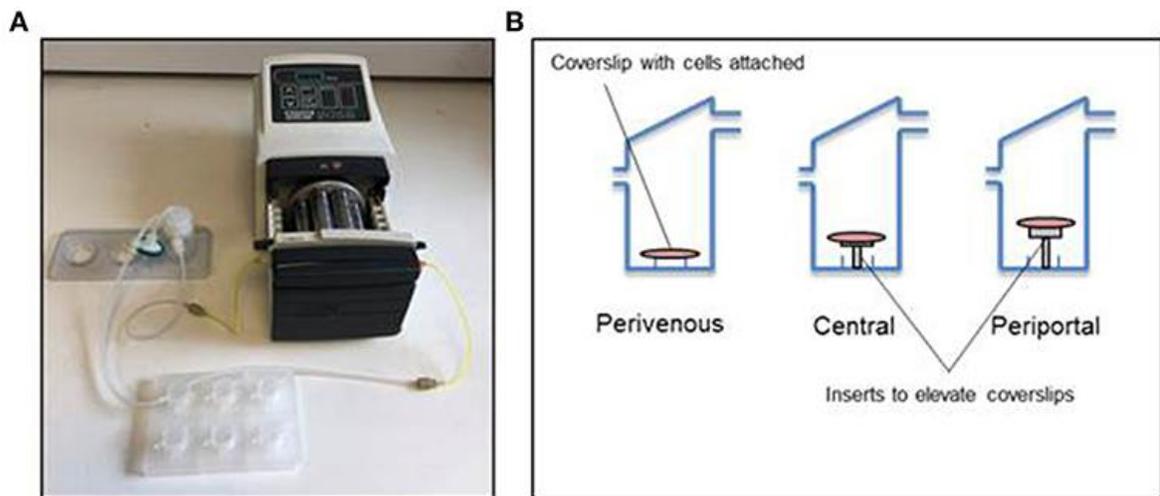


Figura 1.7 (a) Sistema de cultivo y perfusión de hepatocitos en monocapa. (b) Cambiando la posición en z de la monocapa se exponen a diferentes tensiones de oxígeno para imitar la zonación hepática, tomada de [27].

1.2.2 Cultivos tridimensionales (3D)

El estándar de oro de modelos hepáticos *in vitro* para cultivos a largo plazo, son los esferoides (cultivos 3D), en donde las células se agregan y forman estructuras tridimensionales a través de adhesiones célula-célula [39]. La manera de promover la formación de esferoides hepáticos en cultivo celular es prevenir la adhesión de las células a la superficie. Una opción es manteniendo a las células en suspensión a través de agitación mecánica dentro de biorreactores [40]. Sin embargo, los biorreactores necesitan de una gran cantidad de volumen, hasta 300 mL, requiriendo así una gran cantidad de reactivos y muestras [40]. Otra opción para inhibir la adhesión de los hepatocitos al sustrato es a través de la modificación de la superficie con algún compuesto que repela a las moléculas de adhesión celular [41]. Además, los hepatocitos se pueden cultivar embebidos en medios con componentes de la matriz extracelular promoviendo la formación de esferoides [42]. Una de las ventajas de la formación de esferoides es que conlleva a la polarización de los hepatocitos, lo que puede inducir la formación de canalículos biliares en los esferoides [40]. Por otra parte, la estructura esférica brinda protección a los hepatocitos contra apoptosis y ayuda a que conserven su fenotipo por periodos prolongados [41]. Se ha demostrado la ventaja de cultivos de hepatocitos en 3D en comparación con cultivos 2D, ya que las células se mantienen más funcionales, secretando mayor cantidad de albúmina y son más viables a lo largo del tiempo [43,44].

A pesar de las ventajas que tienen los esferoides sobre cultivos 2D, una desventaja de las técnicas para generarlos es que no permiten una regulación fina en su tamaño, ya que pueden variar desde ~30 hasta ~240 células por esferoide [40]. La variabilidad en el tamaño del esferoide puede llevar a un decremento en la reproducibilidad de los datos obtenidos [45]. Una manera sencilla para formar esferoides hepáticos con tamaños uniformes consiste en la fabricación de micropozos en el fondo de una caja de cultivo. Por ejemplo, arreglos con 400 micropozos de 500 μm de altura y diámetro, fabricados en el fondo de una caja con ultra baja adhesión, permitió la generación de esferoides

homogéneos (Figura 1.8) [45]. A pesar de que se pueden generar esferoides con alta reproducibilidad en cajas de cultivo con micropozos definidos, la desventaja de las cajas de cultivo es que no permiten una adecuada oxigenación a los hepatocitos, debido a la altura de la columna de medio de cultivo y además el gran volumen diluye factores endógenos secretados por los mismos hepatocitos, lo que puede contribuir en la pérdida de sus funciones específicas [46].

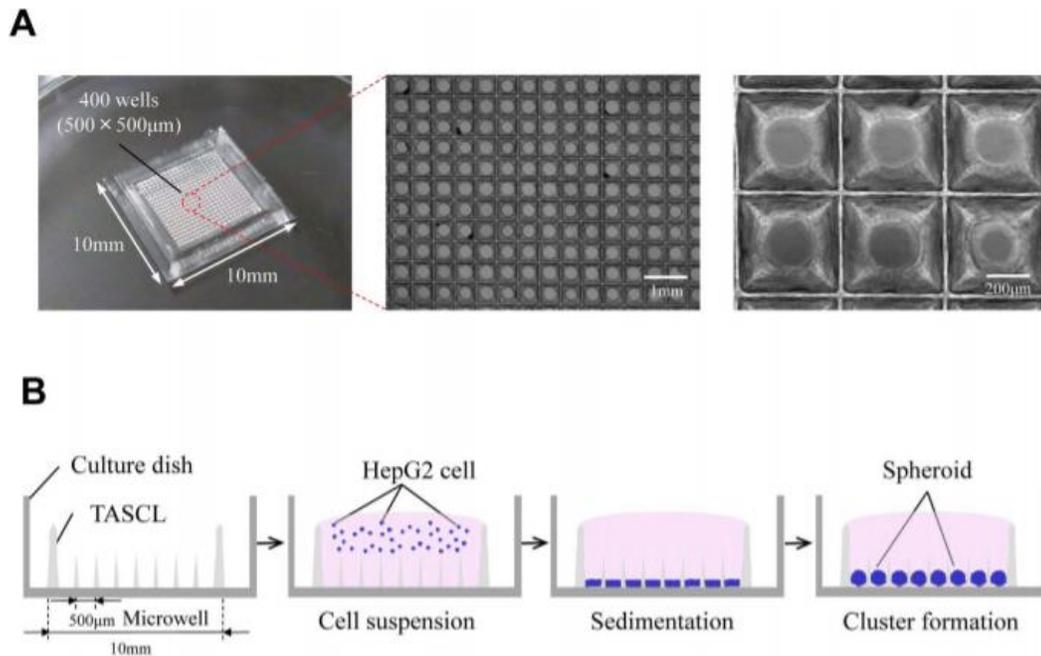


Figura 1.8 (a) Micropozos insertados en placas de cultivo para formar y cultivar esferoides de hepatocitos uniformes, (b) Esquemático de la metodología para formar esferoides, donde se agrega la suspensión celular y se dejan sedimentar en los micropozos para que formen esferoides, tomada de [45].

1.2.3 Hígado-en-chip

El confinamiento espacial de hepatocitos cultivados en dispositivos microfluídicos de PDMS ha permitido que mantengan su función por periodos prolongados (21 días), comparado con cultivos en cajas (7 días) [46]. La mejora en la función se atribuyó probablemente a: i) la alta porosidad del PDMS

combinada con la reducida altura de la columna de medio (~75 μm), lo que permite la difusión libre de oxígeno hacia los hepatocitos, y ii) el volumen reducido de la cámara de cultivo permite que los factores endógenos secretados por los hepatocitos (HGF y TGF- β 1) sean concentrados, contribuyendo a la manutención del fenotipo (Figura 1.9) [46]. Otra de las ventajas del uso de dispositivos microfluídicos para el cultivo de hepatocitos es que es posible diseñarlos para generar un gradiente de oxígeno estable [47]. Añadiendo a dispositivos de PDMS canales para inyectar oxígeno, se logró inducir zonación durante la diferenciación de células madre embrionarias humanas (hESCs) a hepatocitos, mimetizando la heterogeneidad que existe en modelo *in vivo* [47].

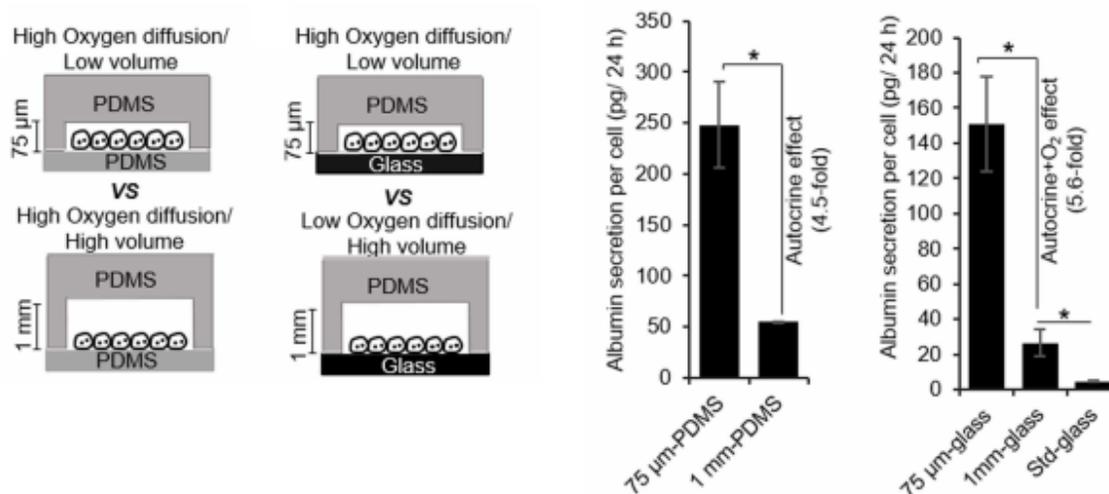


Figura 1.9 Diferentes métodos para cultivar hepatocitos de rata primario, ya sea en un dispositivo completamente de PDMS o un dispositivo con el fondo de vidrio, además ambos con volumen alto o bajo. Los hepatocitos cultivados en un dispositivo completamente de PDMS con volumen bajo secretaron mayor cantidad de albúmina, tomado de [46].

El cultivo en monocapa de hepatocitos en dispositivos microfluídicos de PDMS ha demostrado mejorar la funcionalidad en la secreción de biomarcadores, por lo que una combinación de cultivo 3D en cámaras confinadas de PDMS

sugiere mejorar los modelos *in vitro*. Actualmente, se han desarrollado múltiples sistemas microfluídicos para la formación y cultivo de esferoides [48,49]. Por ejemplo, para la formación de esferoides uniformes se han usado gotas colgantes o encapsulamiento de células en gotas, estos sistemas permiten la generación de esferoides uniformes [48,49], pero no su análisis *in situ*, ya que se tienen que transferir a otro sistema de cultivo. La integración de micropozos en forma piramidal a microcámaras de cultivo ha permitido formar y cultivar esferoides de hepatocitos [50]. Recientemente, se ha estudiado el efecto de cultivar esferoides de hepatocitos en microcámaras confinadas con diferente volumen y, además, lo compararon con cultivos 2D en cámaras confinadas (Figura 1.10) [50]. Para este estudio, desarrollaron un dispositivo microfluídico de PDMS para la formación y cultivo de hepatocitos integrando micropozos en forma piramidal a las cámaras para una formación uniforme de esferoides [50]. Se comprobó que el confinamiento espacial de esferoides de hepatocitos promueve una mejor función en la secreción de albúmina y urea por periodos prolongados, de hasta 21 días, en comparación con cultivos 2D confinados y cultivos 3D con mayor volumen [50]. Los sistemas microfluídicos han demostrado favorecer la funcionalidad y mantener el fenotipo de los esferoides de hepatocitos primarios cultivados en chip. Por lo que, estos sistemas son prometedores para modelar procesos fisiológicos, enfermedades hepáticas o en investigaciones de los efectos en el hígado por fármacos nuevos.

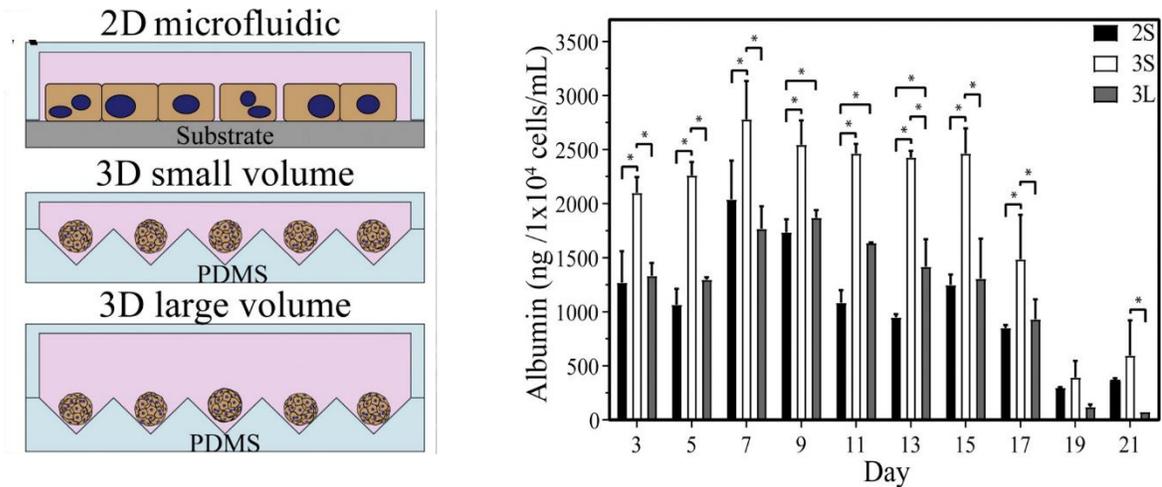


Figura 1.10. Comparación de cultivo de hepatocitos en 3D o 2D, así como comparación de cultivarlos con diferente volumen. Los hepatocitos cultivados en esferoides (3D) con bajo volumen en la cámara secretaron mayor concentración de albúmina durante 21 días, tomada de [50].

1.3 Sistemas microfluídicos para análisis de biomarcadores

La microfluídica es una herramienta adecuada para el desarrollo de modelos hepáticos *in vitro* por su capacidad de mimetizar la microestructura 3D del órgano en espacios confinados con volúmenes reducidos [51]. Sin embargo, el análisis de múltiples metabolitos secretados por esferoides cultivados en estos sistemas microfluídicos representa un desafío debido a la poca cantidad de volumen de muestra disponible. Cada vez es mayor el interés por desarrollar sistemas microfluídicos para cultivo 3D combinados con capacidades de detección para monitorear los biomarcadores secretados por las células [52]. Aunque ya se han desarrollado sistemas microfluídicos que permiten analizar analitos secretados por poblaciones células en cultivos microfluídicos, estos

sistemas no recapitulan las estructuras tridimensionales del microambiente hepático [46,47].

Por otra parte, los análisis de heterogeneidad secretora son relevantes, ya que en un modelo *in vivo*, cada hepatocito presenta diferentes funciones dependiendo de su ubicación (zonación hepática). Como se mencionó anteriormente, ésta heterogeneidad en el hígado se debe a que en los acinos hepáticos existen gradientes de oxígeno [8,27]. En cultivos *in vitro* tridimensionales también se generan gradientes de oxígeno y de nutrientes, mimetizando el microambiente fisiológico (Figura 1.11) [53,54]. Sin embargo, para determinar si, efectivamente, existe zonación en los esferoides de hepatocitos cultivados en dispositivos microfluídicos, es necesario analizar las células de forma individual. Aunque existen diversos métodos para analizar células individuales, las técnicas que permitan analizar la heterogeneidad secretora pueden proveer información relevante acerca de la zonación hepática. Por ejemplo, identificar hepatocitos que secretan mayor cantidad de ácidos biliares (zona 3) de los que producen más albúmina (zona 1). Se han desarrollado dispositivos microfluídicos para medir la secreción de analitos en células individuales, los cuales proveen ventajas sobre las técnicas convencionales. Por ejemplo, una de las principales ventajas es que durante los ensayos las células se mantienen vivas y no se emplean inhibidores de secreción como en citometría de flujo. Además, a diferencia de ELISpot, con estos dispositivos es posible la cuantificación de proteínas, se aíslan por completo a las células y se usa poco volumen de medio. A continuación, se mencionan algunos de los sistemas microfluídicos que existen en la actualidad para analizar biomarcadores secretados por cultivos 3D y por células individuales.

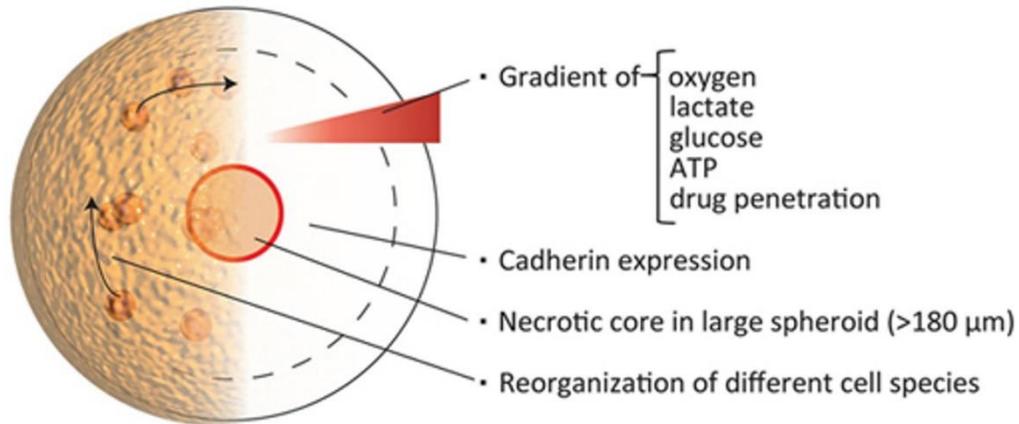


Figura 1.11. Esquema de un esferoide donde se esquematiza que existe in gradiente de oxígeno y nutrientes, tomada de [53].

1.3.1 Análisis de cultivos microfluídicos 3D.

Pocos dispositivos han sido desarrollados para analizar cultivos microfluídicos 3D, siendo la mayoría empleados para analizar islotes de Langerhans del páncreas. Por ejemplo, se reportó un dispositivo con la capacidad de medir la insulina secretada por un islote, el dispositivo cuenta con 16 canales, donde en cada canal se siembran un islote depositándolo por pipeteo (Figura 1.12a) [55]. La detección de insulina secretada se realizó tomando microfotografías en el centro del dispositivo, a donde llega una mezcla con el sobrenadante y los reactivos para un inmunoensayo. También se ha reportado un dispositivo automatizado para realizar mediciones con una alta resolución temporal de insulina secretada por islotes del páncreas (Figura 1.12b) [56]. En este sistema, se transportan los reactivos para medir insulina y el medio condicionado usando bombas peristálticas para enviarlas a una región donde se forman microgotas para mezclar las soluciones. En ambos dispositivos, los islotes se depositan en un reservorio abierto siendo adecuados para analizar células previamente organizadas en 3D. Sin embargo, este formato no permite formar esferoides de

hepatocitos uniformes a partir de células disgregadas. Además, con estos sistemas no se puede controlar el número de esferoides, ni analizar múltiples analitos.

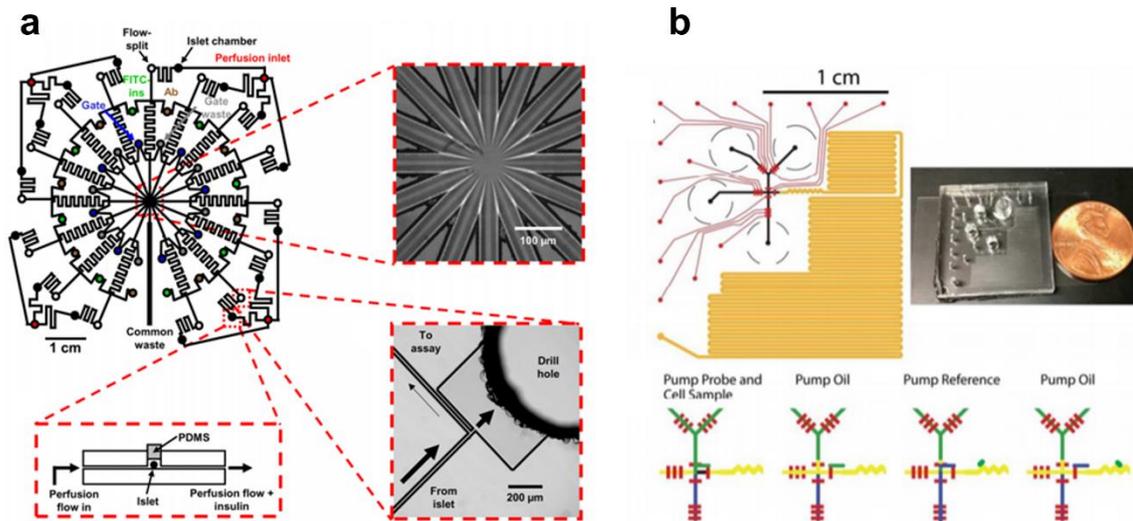


Figura 1.12 Dispositivo para analizar secreción celular de microestructuras tridimensionales. (a) Un dispositivo para analizar secreción de insulina de hasta 16 islotes del páncreas, tomado de [55]. (b) Dispositivo para el análisis temporal de secreción de insulina usando gotas, tomado de [56].

Otro sistema microfluídico reportado para analizar esferoides de hepatocitos primarios, consta de un dispositivo para cultivar los esferoides de hepatocitos y una bomba peristáltica externa para transferir el medio a un dispositivo de detección (Figura 1.13) [52]. El sistema reportado permite monitorear por cinco días la secreción de albúmina y transferrina simultáneamente de la misma muestra de medio condicionado por los esferoides de hepatocitos. Su módulo de análisis emplea un inmunosensor electroquímico basado en microesferas, además cuenta con microválvulas para automatizar la detección [52]. Sin embargo, la desventaja de este sistema es que no permite

formar los esferoides de hepatocitos, los cuales se tienen que generar de forma externa y depositarlos a las cámaras de cultivo, lo que impide controlar la cantidad y el tamaño de los esferoides en la cámara.

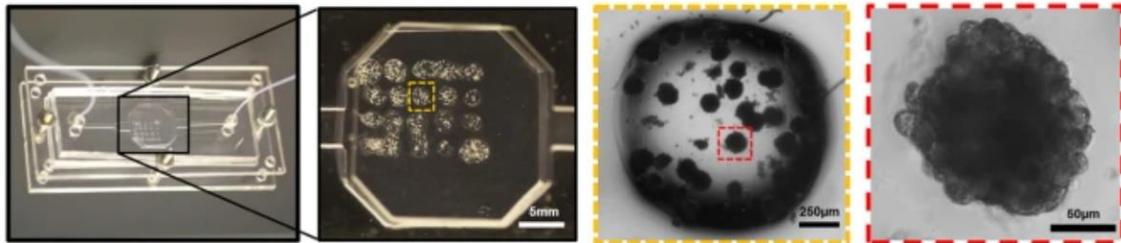


Figura 1.13. Modulo para cultivar esferoides y después conectarlo a un sistema de análisis, se muestran las cámaras donde se colocan los esferoides previamente formados, tomada de [52].

1.3.2 Análisis de células individuales

Actualmente se han desarrollado sistemas microfluídicos para el análisis de la heterogeneidad secretora en células individuales [57]. Estos dispositivos microfluídicos emplean diferentes estrategias para capturar y aislar a las células individuales, ya sea empleado microcámaras, micropozos o gotas [58-62]. Para medir los analitos secretados por las células, se usan diferentes técnicas como microperlas o nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos, o bien se pueden usar microarreglos de anticuerpos [58-63]. Por ejemplo, se ha reportado un dispositivo que permite aislar células en microcámaras mediante el uso de microválvulas (Figura 1.14a) [62]. En ese sistema, la superficie del dispositivo estaba funcionalizada con arreglos de anticuerpos de captura para medir múltiples proteínas [62]. Por otra parte, se han reportado dispositivos

microfluídicos basados en gotas que permiten encapsular células y perlas (Figura 1.14b) [63]. El dispositivo tiene una entrada para inyectar células y otra para inyectar microperlas junto con los anticuerpos de detección que se envían a la zona donde se forman las gotas [63]. También, se ha reportado un dispositivo, el cual tiene la superficie modificada con anticuerpos para inmovilizar células (Figura 1.14c) [64]. Después, al dispositivo se le inyectan microperlas funcionalizadas y se aíslan junto con las células empleando compartimentos [64]. Estos sistemas microfluídicos mencionados, no permiten controlar el número de células por cámara/gota/compartimento, ya que la captura es aleatoria. En general, los sistemas microfluídicos para análisis de la secreción en células individuales actuales, no permiten cultivar las células por más de unas cuantas horas, debido a que no es posible reemplazar el medio de cultivo.

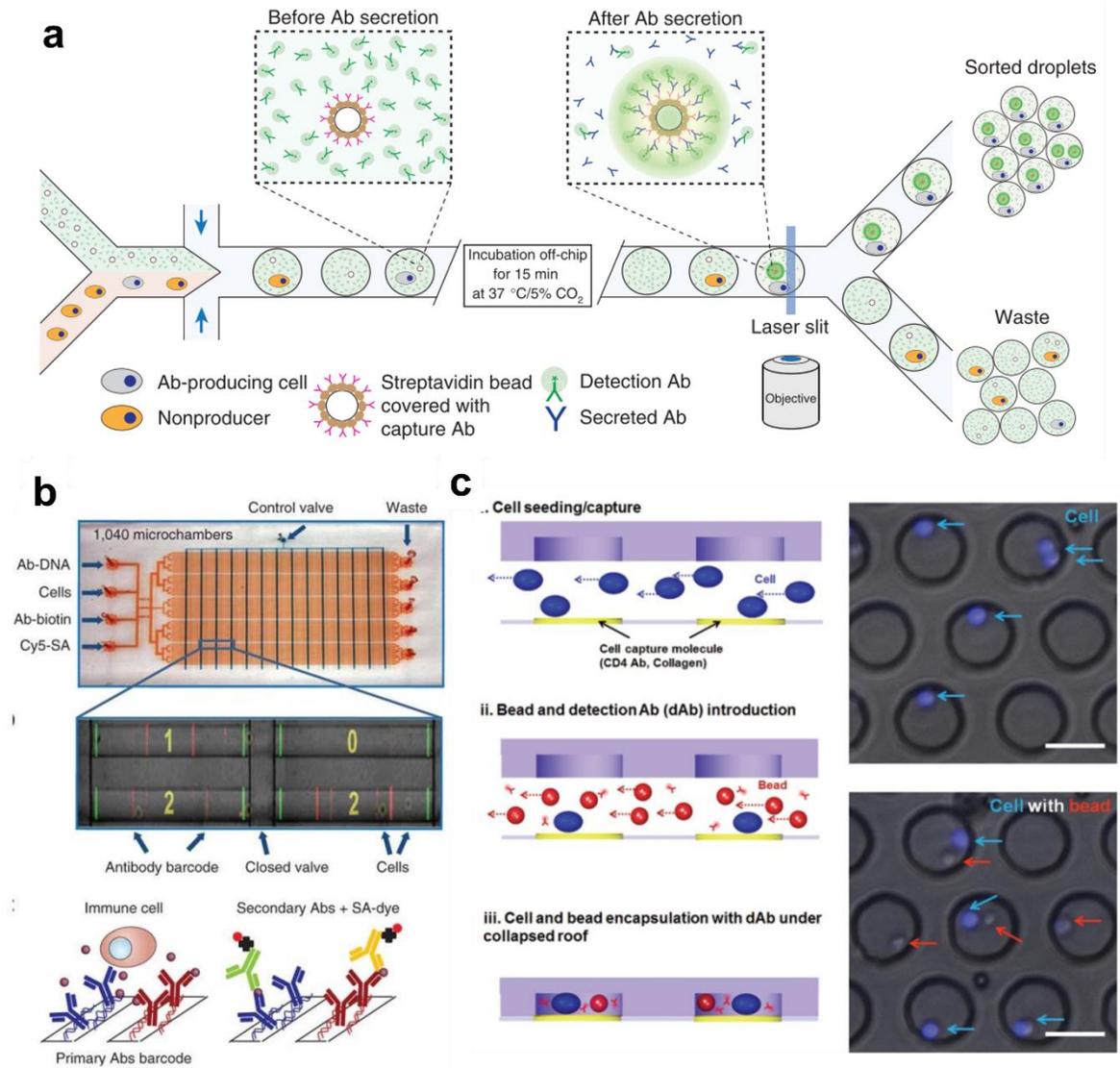


Figura 1.14. Dispositivos microfluídicos para en análisis de secreción en células individuales. (a) Encapsulamiento de células y perlas en gotas, tomada de [63].

(b) Aislamiento aleatorio de células individuales en microcámaras con microarreglos de anticuerpos, tomada de [62]. (c) Captura de células y perlas en compartimentos cerrados, tomada de [64].

1.4 Justificación

El hígado es un órgano vital que realiza múltiples funciones para mantener la estabilidad interna en el cuerpo humano. Estas funciones se pueden afectar cuando existe un daño hepático causado por alguna enfermedad, sustancias nocivas o fármacos. Para estudiar los efectos adversos que producen algunos fármacos o realizar modelos de alguna enfermedad hepática, se pueden emplear modelos *in vitro* del hígado. Estos modelos pueden ser cultivos de hepatocitos en monocapa (2D) o en esferoides (3D) y estos últimos recapitulan la microestructura tridimensional del hígado. Por otra parte, se ha demostrado las ventajas que tiene el cultivo *in vitro* de hepatocitos en sistemas microfluídicos sobre métodos convencionales. Actualmente se han desarrollado dispositivos microfluídicos para el cultivo 3D de hepatocitos primarios. Sin embargo, estos sistemas no permiten el monitoreo de múltiples biomarcadores secretados o no están integrados con métodos para formar esferoides de hepatocitos uniformes. Por otra parte, no se ha evaluado si al formar esferoides de hepatocitos en dispositivos microfluídicos se produce la heterogeneidad dada por los gradientes de oxígeno y que efectúen funciones diferenciales como secreción de ácidos biliares o albúmina. Aunque ya se han desarrollado dispositivos microfluídicos para estudiar la heterogeneidad secretora, tienen la desventaja de que la captura de células individuales es aleatoria o no permiten analizar múltiples condiciones simultáneamente. Además, estos dispositivos están diseñados para ensayos de corta duración porque después del aislamiento celular, se imposibilita adicionar medio fresco con nutrientes para mantener a las células en cultivo. Por estas razones, en este trabajo se desarrollaron sistemas microfluídicos que permitan formar y cultivar esferoides de hepatocitos acoplados a módulos de análisis de biomarcadores secretados. Además, se desarrolló y caracterizó un sistema microfluídico para el análisis de células individuales que permite capturar células individuales de forma controlada, agregar medio fresco a las células después de aislarlas, y realizar hasta seis ensayos diferentes en paralelo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollar plataformas microfluídicas para la detección de biomarcadores en cultivos esferoides de hepatocitos y de células individuales.

2.2 Objetivos específicos

1. Diseñar y fabricar el sistema microfluídico para el cultivo y análisis de esferoides de hepatocitos primarios.
2. Caracterizar el módulo de detección de metabolitos.
3. Lograr un cultivo a largo plazo de hepatocitos primarios en el dispositivo.
4. Analizar los cambios en los metabolitos de esferoides de hepatocitos primarios en un modelo de daño hepático utilizando el dispositivo microfluídico.
5. Diseñar y fabricar un sistema microfluídico con trampas hidrodinámicas para la capturar y el análisis de células individuales.
6. Caracterizar el funcionamiento del dispositivo de trampas.
7. Realizar estudios de secreción de proteínas en células individuales como prueba de concepto.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Sistema microfluídico para el cultivo y análisis de esferoides

3.1.2 Fabricación

Para la fabricación de los dispositivos se emplearon técnicas de fotolitografía y de litografía suave multicapa. La primera técnica se usó para elaborar el molde maestro y la segunda técnica para los dispositivos de PDMS. Todo el proceso de fabricación se realizó en un cuarto limpio.

3.1.2.1 Fabricación de moldes

Para la fabricación de los moldes maestros de todos los dispositivos se usaron obleas de silicio de 10 cm de diámetro (Desert Silicon Inc. Tempe, EE. UU.). Primero, todas las obleas se secan colocándolas en planchas de calentamiento (Cimarec, thermo scientific, EE. UU.) durante 20 minutos a 150° C. Al terminar el desecado, las obleas se colocan inmediatamente sobre un *spin coater* (Laurell WS 650 Spin coater, EE. UU.). Al equipo se le programa un protocolo que consiste en diferentes pasos, los cuales dependen del tipo de fotorresina y de la altura de las estructuras deseadas.

Para la fabricación de los moldes de todas las capas de control de los dispositivos (módulo de cultivo de esferoides, el módulo de detección y el dispositivo integrado) se empleó la misma fotorresina negativa SU-8 2010 (SU82010, MicroChem, EE. UU.) y el mismo protocolo para obtener alturas de 20

µm. Para recubrir las obleas con la fotorresina se le programan los siguientes parámetros al *spin coater*:

Paso 1.

Aceleración: 100 rpm/s

Tiempo: 10 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 1000 rpm

Paso 3.

Desaceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Después se evaporan los solventes de la fotorresina mediante un proceso llamado pre-cocido, el cual consiste en colocar las obleas sobre la plancha de calentamiento a 95° C por 5 minutos. Enseguida, se exponen las obleas usando una alineadora de máscaras con un LED UV de 365 nm (UV-KUB 3, Kloé, Francia). Para la exposición, se coloca la fotomáscara con la cara impresa en contacto con la fotorresina. A continuación, se colocan ambas en el equipo y se programan los parámetros de una exposición por 3 s. Debido a que la polaridad de las fotomáscaras es estructuras/canales transparentes y fondo oscuro, la luz UV solo incide en la fotorresina donde están los canales por lo que solo empieza la polimerización de la resina en esas secciones. Después de la exposición, el siguiente paso es calentar las obleas en una plancha a 95° C por 5 minutos. A este paso se le llama post-cocido, el cual aumenta la adhesión de la resina a la oblea, permite una rápida polimerización e incrementa la resistencia de la resina a los solventes. En seguida, se revelan las estructuras de los moldes usando un revelador para resina negativa SU8 (SU-8 developer, MicroChem, EE. UU.). Para este proceso, las obleas se sumergen en el revelador hasta que la

fotorresina no expuesta a luz UV se disuelve y se observen las estructuras (aproximadamente de 2 a 3 minutos). Luego, se limpian las obleas con alcohol isopropílico (Isopropyl alcohol, SigmaAldrich, EE. UU.) y se revisa bajo un estereomicroscopio para corroborar que no queden restos de resina. Si los moldes aún tienen restos de resina, se repite el proceso de revelado y limpieza. El último paso se llama *hard-bake*, el cual consiste en aumentar la resistencia mecánica y química de las estructuras al calentar el molde a 150° C por 15 minutos.

Para la fabricación de los moldes de la capa de micropozos se prepararon tres obleas para obtener pozos con diferentes alturas, 500, 225 y 150 μm . Se usó la misma fotorresina fotorresina SU-8 2100 (SU82100, MicroChem, EE. UU.) para los tres moldes, pero cambiando los parámetros de recubrimiento. Se programaron los siguientes pasos al *spin coater*:

Para alturas de 500 μm .

Paso 1

Aceleración: 100 rpm/s

Tiempo: 10 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 3.

Desaceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Para alturas de 225 μm .

Paso 1

Aceleración: 100 rpm/s

Tiempo: 10 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 800 rpm

Paso 3.

Desaceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Para alturas de 150 μm .

Paso 1

Aceleración: 100 rpm/s

Tiempo: 10 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 2000 rpm

Paso 3.

Desaceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Después de los recubrimientos se realizaron los pre-cocidos, los cuales dependen de la altura de la fotorresina. A continuación, se mencionan los parámetros usados:

- 1) Para alturas 500 μm , se calentó el molde a 65° C por 10 minutos y después a 95° C por 90 minutos
- 2) Para alturas de 225 μm , se calentó a 65° C por 7 minutos y a 95° C por 45 minutos

3) Para alturas de 150 μm , se calentó a 65° C por 5 minutos y a 95° C por 30 minutos.

A continuación, se realizó la exposición a la luz UV usando la misma máscara de micropozos para todos los moldes. Se realizó una sola exposición por oblea usando diferentes tiempos dependiendo de la altura de la fotorresina:

- 1) Para 500 μm se expuso por 14 s.
- 2) Para 225 μm se expuso por 10 s.
- 3) Para 150 μm se expuso por 8 s.

En seguida, se realizó el post-cocido a los moldes usando los siguientes parámetros:

- 1) Para alturas 500 μm , se calentó el molde a 65° C por 5 minutos y después a 95° C por 30 minutos
- 2) Para alturas de 225 μm , se calentó a 65° C por 5 minutos y a 95° C por 15 minutos
- 3) Para alturas de 150 μm , se calentó a 65° C por 5 minutos y a 95° C por 12 minutos.

Después, se revelaron los moldes, se limpiaron con isopropanol y se verificó que no tuvieran restos de resina. Los tiempos de revelado también dependen de la altura de la resina, para 500 μm se reveló por 30 minutos, para 225 μm por 20 minutos y para 150 μm por 15 minutos. Finalmente, se realizó el *hard-bake* colocando los moldes sobre una plancha de calentamiento a 150 ° C por 30 minutos.

La fabricación de los moldes de las capas de flujo se realiza con dos fotorresinas para obtener diferentes alturas y perfiles de los canales. Para fabricar estos moldes, se usa una resina negativa SU8 para canales con perfil cuadrado y una resina positiva AZ para canales con perfil redondeado. También se usan dos fotomáscaras con diferente polaridad, estructuras transparentes para resina negativa y estructuras oscuras para resina positiva. En los moldes, primero se

fabrican las estructuras con perfil redondeado usando la resina AZ 9260 (AZ9260, Microchemicals GmbH, Alemania) para alturas de 18 μm en el dispositivo de detección basado en gotas. Para el módulo de cultivo de esferoides y el dispositivo integrado se usa la resina positiva AZ 50XT (AZ50XT, Microchemicals GmbH, Alemania) para alturas de 50 μm .

El primer paso para la fabricación de las estructuras con resina positiva es realizar un tratamiento a la superficie de la oblea con plasma de oxígeno por 90 s usando un *plasma cleaner* (PDC-001/002, Harrick plasma, EE. UU.). Después, las obleas se recubren con un promotor de adhesión (MCC Primer 80/20, MicroChem, EE. UU.) usando el *spin coater* con los siguientes parámetros:

Paso 1

Aceleración: 100 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 3000 rpm

Paso 3.

Desaceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Después se evapora el exceso de promotor de adhesión calentando la oblea en una plancha a 110°C por 3 minutos. Se dejan enfriar las obleas por 2 minutos y después se recubren con las fotorresinas usando los siguientes parámetros:

Para alturas de 50 μm con resina AZ 50XT.

Paso 1

Aceleración: 133 rpm/s

Tiempo: 10 s

Velocidad: 200 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 1375 rpm

Paso 3.

Desaceleración: 3400 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Para alturas de 18 μm con resina AZ 9260.

Paso 1.

Aceleración: 100 rpm/s

Tiempo: 10 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 40 s

Velocidad: 800 rpm

Paso 3.

Desaceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

El siguiente paso es el precocido, el cual varía dependiendo de la fotorresina y la altura:

- 1) Para alturas de 50 μm con resina AZ 50XT se calentó de 65° C a 112° C por 22 minutos con una rampa de 450 °C/h.
- 2) Para alturas de 18 μm con resina AZ 9260 se calentó a 90° C por 3 minutos y después a 115° C por 5 minutos.

Después, se dejan los moldes en una etapa de rehidratación que consiste en mantener las obleas en cajas Petri cubiertas por 15 horas para la resina AZ

50XT y una hora para la resina AZ 9260. El siguiente paso es exponer las obleas a la luz UV usando las fotomáscaras correspondientes. Los parámetros de exposición en la alineadora para cada oblea se mencionan a continuación:

1) Para alturas 50 μm con resina AZ 50TX se expone con el 30% de potencia por 6 ciclos de 25 s incidiendo y 30 s de espera entre cada exposición.

2) Para alturas de 18 μm con resina AZ 9260 se expone con 100% de potencia por 5 ciclos de 4 s de exposición y 4 s de espera.

A continuación, se elimina la resina expuesta usando el revelador AZ 400K. Para la resina AZ 50XT, la oblea se sumerge en el revelador con una proporción de 5:2 (agua destilada/revelador) y después de 3 minutos de revelado, se lava con agua destilada. En seguida, se cambia la proporción de revelador a 2:1(v/v) y se mantiene en constante agitación hasta eliminar la resina restante para finalmente lavar con agua destilada. Para la resina AZ 9260, se sumerge la oblea en revelador con una proporción 3:1(v/v) de agua destilada/AZ 400K hasta que se elimine por completo la resina no expuesta y finalmente se lava con agua destilada. El último paso es realizar el reflujado/*hard-bake*, el cual es necesario para lograr un perfil redondeado en los canales. También este paso sirve para aumentar la resistencia mecánica y química a las estructuras. El *hard-bake* es importante para estos moldes debido a que en la siguiente etapa se fabrican las estructuras con la resina SU8 sobre la misma oblea. Para la resina AZ 50XT se calienta el molde de 65°C a 190°C por 15 horas con una rampa de 10°C/h y para la resina AZ 9260 se calienta la oblea de 90 a 190°C por 60 minutos con una rampa de 2 °C/min. Al terminar la fabricación de los canales con perfil redondeado, se continúa inmediatamente con las estructuras de resina negativa. Para la fabricación de las cámaras de cultivo y la serpentina de dispositivo integrado, se recubre la oblea con fotorresina SU8 2050 para obtener alturas de 100 μm . Para el molde del módulo de detección basado en gotas se fabrican los canales con altura de 60 μm usando la resina SU8 2025. Todo el proceso es igual

al protocolo de fabricación de los moldes de las capas de control con resina negativa, solo varían los parámetros de cada paso dependiendo de la altura de la fotorresina. En la tabla 3.1 se mencionan los parámetros para la fabricación de las estructuras, incluyendo los tiempos de aceleración (A), las velocidades (V) y los tiempos de recubrimiento (T).

Tabla 3.1

Fotorresina	Recubrimiento	Precocido	Exposición	Postcocido
SU8 2050 100 μm	Paso 1. A= 100 rpm/s T= 5 s V= 500 rpm Paso 2. A= 300 rpm/s T= 30 s V= 1750 rpm	65°C por 5 min 95°C por 20 min	6.5 s	65°C por 5 min 95°C por 10 min
SU8 2025 60 μm	Paso 1. A= 100 rpm/s T= 5 s V= 500 rpm Paso 2. A= 300 rpm/s T= 30 s V= 1000 rpm	65°C por 3 min 95°C por 9 min	5 s	65°C por 2 min 95°C por 7 min

Después del precocido, se exponen a luz UV con las estructuras alineadas usando las marcas en las obleas y en las fotomáscaras. Los tiempos de revelado y el *hard-bake* para las dos fotorresinas son similares, aproximadamente 5 a 10 minutos y 150°C por 30 min, respectivamente. El proceso de fabricación con las dos capas de resina para los moldes de flujo se esquematiza en la Figura 3.1. Al terminar la fabricación de todos los moldes, se les aplica un tratamiento con clorotrimetilsilano (Chlorotrimethylsilane, Sigma-Aldrich Co.) por 30 minutos para evitar que se les adhiera el PDMS. Finalmente, todos los moldes se almacenan en cajas Petri hasta la fabricación de las réplicas.

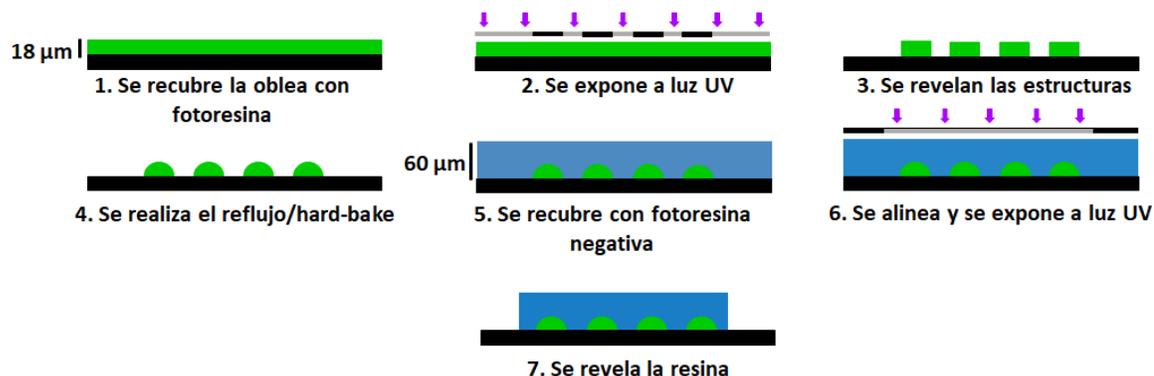


Figura 3.1. Proceso de fabricación del molde de la capa de flujo del módulo para la detección, se esquematiza la metodología para usar dos resinas y alturas diferentes.

3.1.2.2 Fabricación de dispositivos de PDMS

Una vez obtenidos los moldes, el siguiente paso es la fabricación de las réplicas de polidimetilsiloxano (PDMS) usando la técnica de curado parcial. A continuación, se describirá primero el protocolo de fabricación del módulo para la detección de analitos basado en gotas y después el módulo para cultivo de esferoides, cabe mencionar que el protocolo para el dispositivo integrado es el mismo al del módulo de cultivo.

Para fabricar las réplicas del módulo para cultivo de esferoides, primero se prepara una mezcla de PDMS/agente curador (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EE. UU.) a una proporción 5:1(w/w), se vierte sobre el molde de la capa de control y se coloca en una cámara de vacío para desgasificar por 15 minutos. El molde de la capa de flujo se recubre con una delgada capa de PDMS/agente curador a una proporción de 20:1 (w/w) usando el *spin coater*, al cual se le programan los siguientes parámetros:

Paso 1.

Aceleración: 1000 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 600 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Después, ambos moldes se colocan en un horno de convección precalentado a 80 °C (UF55, Memmert, Alemania) y se mantienen por 25 minutos para un curado parcial del PDMS. Al terminar, se desprenden las réplicas de PDMS del molde de la capa de control, se recortan y se realizan las perforaciones de las entradas y salidas usando una prensa (MP10-UNV, SCHMIDT Technology Corporation). Inmediatamente, se alinean las réplicas de la capa de control sobre la membrana de PDMS en el molde de la capa de flujo usando un estéreo microscopio. Se dejan polimerizar ambas capas por 45 minutos en el horno de convección a 80 °C. Durante el tiempo de polimerización de la capa de flujo y control, se realizan las réplicas de la capa de micropozos. Primero, se mezcla PDMS/agente curador a una proporción 10:1(w/w), se vierte sobre el molde de la capa de control, se desgasifica por 15 minutos y se coloca en el horno a 80 °C por 25 minutos. Al terminar, se cortan las réplicas de los micropozos, así como los dispositivos de la capa de control y flujo ya unidas y se realizan las perforaciones correspondientes. Enseguida se les da un tratamiento con plasma de oxígeno por 90 s a las superficies con las estructuras expuestas, se alinean usando un estéreo microscopio y se mantienen en el horno de convección a 80 °C por 15 horas para permitir una unión robusta. Finalmente, se colocan cilindros de vidrio sobre las dos entradas para sembrar células. Los cilindros fungirán como reservorios para medio, estos se adhieren a la superficie de los dispositivos usando PDMS/agente curador con una proporción 10:1(w/w) y polimerizándolo por 60 minutos a 80°C. Los dispositivos fabricados se almacenan en cajas de Petri de plástico modificadas con orificios.

Para fabricar las réplicas del módulo de detección basado en gotas se usó un protocolo similar al descrito anteriormente. Primero se prepara una mezcla de PDMS/agente curador (5:1), se vierte sobre el molde de control y se desgasifica. Después, se recubre el molde de flujo con una mezcla 20:1 de PDMS/curador usando el *spin coater* con los siguientes parámetros:

Paso 1.

Aceleración: 1000 rpm/s

Tiempo: 30 s

Velocidad: 1000 rpm

Paso 2.

Aceleración: 300 rpm/s

Tiempo: 1 s

Velocidad: 1 rpm

Después, los moldes se colocan en un horno a 80 °C por 25 minutos, se recortan las réplicas de la capa de control, se perforan y se alinea sobre el molde de flujo. Se mantiene en el horno a 80 °C por 90 minutos para que se unan las capas, al finalizar se recortan y se realizan las perforaciones correspondientes. Finalmente, el dispositivo ensamblado se pega a un portaobjetos dando un tratamiento con plasma de oxígeno a ambas superficies y se colocan en una plancha de calentamiento por 5 minutos a 80 °C. Los dispositivos terminados se almacenan en cajas Petri hasta su uso.

3.1.3 Operación de los sistemas microfluídicos

Para introducir soluciones a los dispositivos se emplean dos métodos (Figura 3.2). El primero es usando los cilindros de vidrio (reservorios) del módulo de cultivo y del dispositivo integrado. En este método, se introducen las soluciones por presión hidrostática, al reservorio de la entrada se le pipetea un mayor volumen de la solución (250 µL) y al reservorio de la salida se le coloca menor

volumen (50 μL) para obtener columnas de líquido de diferente altura. Esta forma de introducir soluciones es usada para capturar a las células en los micropozos de los dispositivos, ya que es simple y se puede trabajar en la campana de flujo laminar para mantener esterilidad, además es poca la manipulación de las células. El método para inyectar soluciones a los dispositivos es por medio de tubos Tygon, los cuales son mangueras flexibles de plástico transparente (Tygon® AAD04103 Microbore Tubing, Francia). A estos tubos se les coloca un pin metálico (Mat-Cut-Hypo, MicroGroup, EE. UU.), el cual se conecta a las entradas de los dispositivos. El otro extremo de los tubos está conectado a un sistema neumático de presión positiva.

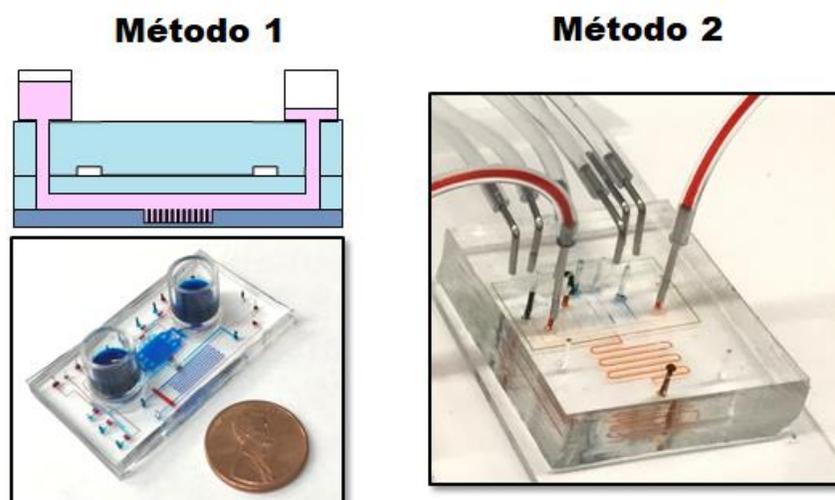


Figura 3.2. Métodos para introducir soluciones a los dispositivos. El primero se usan los cilindros de vidrio con diferentes volúmenes. En el segundo método se usan mangueras con pines y presión positiva usando un compresor de aire.

El sistema neumático está compuesto por un compresor de aire libre de aceite (MedicAIR, Evans, EE. UU.) y un tablero, el cual tiene colectores de válvulas luer manuales de tres vías, reguladores de presión (R230-02B, Parker, EE. UU.) y manómetros (0-100 psi, Metron, México). También tiene válvulas solenoides de tres vías (MH1A24VDCNHC8V, Festo, EE. UU.), las cuales sirven para controlar las microválvulas de los dispositivos. En la Figura 3.3 se muestra una fotografía

de un tablero con sus componentes para controlar a los dispositivos. Por otra parte, las válvulas solenoides están conectadas a una tarjeta de potencia, estos se conectan a un microcontrolador Arduino Mega 2560 y a su vez este se conecta a una computadora. Este sistema es para poder controlar de forma automática a los dispositivos por lo que se requiere que la computadora cuente con LabVIEW 2019 instalado, así como los drivers NI-VISA 18.0 y el software Arduino IDE 1.8.13. Se diseñaron dos interfaces gráficas para controlar los sistemas microfluídicos.

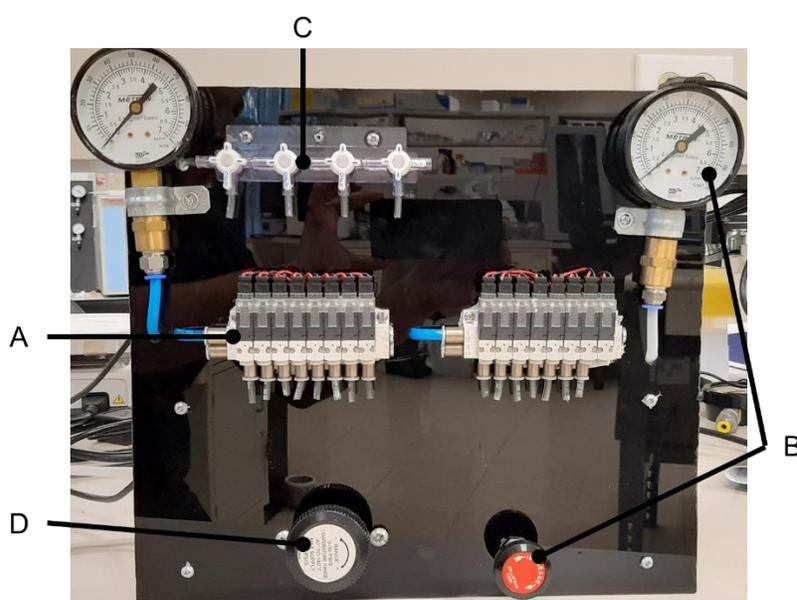


Figura 3.3. Tablero neumático para el control de los dispositivos. A. Válvulas solenoides. B. Regulador y manómetro para controlar la presión en las válvulas solenoides. C. Válvulas luer. D. Regulados de precisión para controlar la presión en las válvulas luer.

3.1.3.1 Módulos de cultivo de esferoides y de detección de analitos

El programa para controlar de forma automática los módulos de detección y cultivo se programaron en LabVIEW y se diseñó una interfaz gráfica de usuario. Esta interfaz tiene un esquemático del dispositivo basado en gotas, indicando

qué entrada corresponde a cada válvula y botón. Como se mencionó anteriormente, el dispositivo basado en gotas cuenta con diez líneas de control y cada una se conecta con un tubo Tygon a cada válvula solenoide. Cada válvula solenoide es controlada por los botones que contiene la interfaz gráfica, por lo tanto, cada botón controla una microválvula del dispositivo microfluídico. Cuando un botón en la interfaz está desactivado (color verde oscuro), la microválvula de dispositivo está abierta y permite el paso de las soluciones. Como se observa en la Figura 3.4, la interfaz tiene unos recuadros blancos donde se escribe el número de gotas que se desean formar para cada mezcla. Cada recuadro tiene una etiqueta que indica la mezcla que se realiza, por ejemplo: Glu/Ctl+ significa que se formaran gotas con los reactivos para la detección de glucosa y el control positivo, LDH/Ctl- indica gotas con reactivos para detección de lactato deshidrogenasa más control negativo, o Bile/Cells son gotas con los reactivos para la detección de bilis más las muestras de la cámara de cultivo. También tiene unas etiquetas (-Ctl, +Ctl y Cells) con recuadros blancos donde se escribe el tiempo de apertura de la válvula V1, esto para controlar el tamaño/volumen de las gotas por cada set de gotas. Por otra parte, también tiene un recuadro para indicar el tiempo de lavado de los canales, enviando las soluciones a la salida de desechos (abriendo V2 y cerrando V1). Una vez que se configuran todos los parámetros, se presiona el botón *Sample* para que comience el programa automático. Al finalizar el programa todas las válvulas se cierran para incubar las gotas en la serpentina.

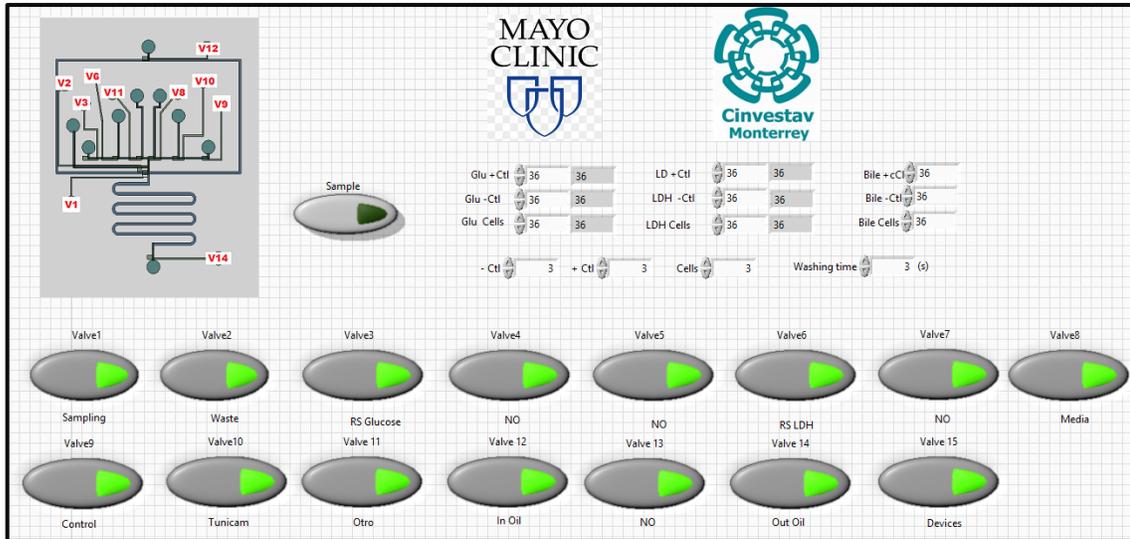


Figura 3.4. Imagen de la interfaz gráfica para el control del módulo de detección basado en gotas.

3.1.3.2 Dispositivo integrado para cultivo y análisis de esferoides

El programa y la interfaz gráfica para controlar el dispositivo integrado también se realizó en LabVIEW. Al igual que la interfaz descrita anteriormente, contiene botones, recuadros para configurar los parámetros y el esquemático del dispositivo. El programa tiene once botones para controlar las once microválvulas del dispositivo microfluídico. A continuación, se describe qué controla cada válvula y botón: V1 = medio con insulina, V2 = medio con glucagón, V3 = medio, V4 = desechos, V5 = válvula para cerrar la cámara de cultivo celular, V6 = válvula para generar gotas, V7 = válvula para residuos de la muestra y los reactivos, V8 = válvula de reactivos para detección de glucosa, V9 = reactivos para detección, V10 = reactivos para detección y V11 = Entrada/salida de aceite. A la interfaz también se le configuran los tiempos de duración de cada paso durante los experimentos:

1: Para remplazar los medios de la cámara de cultivo celular, durante este tiempo, sólo las válvulas 1 (o 2), 5 y 7 están abiertas.

2: Para mover la solución de la cámara de cultivo celular a los desechos e inyectar medio fresco, durante este tiempo, sólo las válvulas 1(o 2), 5 y 7 están abiertas.

3: Para abrir la válvula 6 y generar gotas, durante este tiempo, sólo las válvulas 1(o 2), 5, 6 y 8 están abiertas.

4: Tiempo de incubación de los hepatocitos con medios (medios con insulina o glucagón), durante este tiempo todas las válvulas están cerradas.

5: Para limpiar la red de canales por si hay solución de reacción después de generar una gota, durante este tiempo sólo las válvulas 1(o 2), 5 y 7 están abiertas.

6: Después de generar una gota, esta se debe mover en la serpentina antes de generar la siguiente gota, esto para evitar la fusión de las gotas, durante este tiempo sólo la válvula 11 está abierta.

7: Después del tiempo de incubación de las hormonas en la cámara de cultivo, la presión en la cámara debe ser liberada, durante este tiempo, se abren las válvulas 5 y 7.

8: Tiempo para estabilizar las soluciones que se van a mezclar cuando se forme la gota, durante este tiempo sólo las válvulas 1(o 2), 5, 7 y 8 están abiertas.

9: Para detener el movimiento de las gotas en la serpentina antes de formar la siguiente, durante este tiempo todas las válvulas están cerradas.

También con el programa se puede controlar el número de ciclos de inyección de insulina y glucagón, configurar el número de gotas después de lavar la cámara de cultivo y también permite determinar el número de gotas después de incubar con insulina o glucagón. Al configurar todos los parámetros, se presiona el botón

Sample para comenzar el programa, en la Figura 3.5 se muestra la interfaz gráfica.

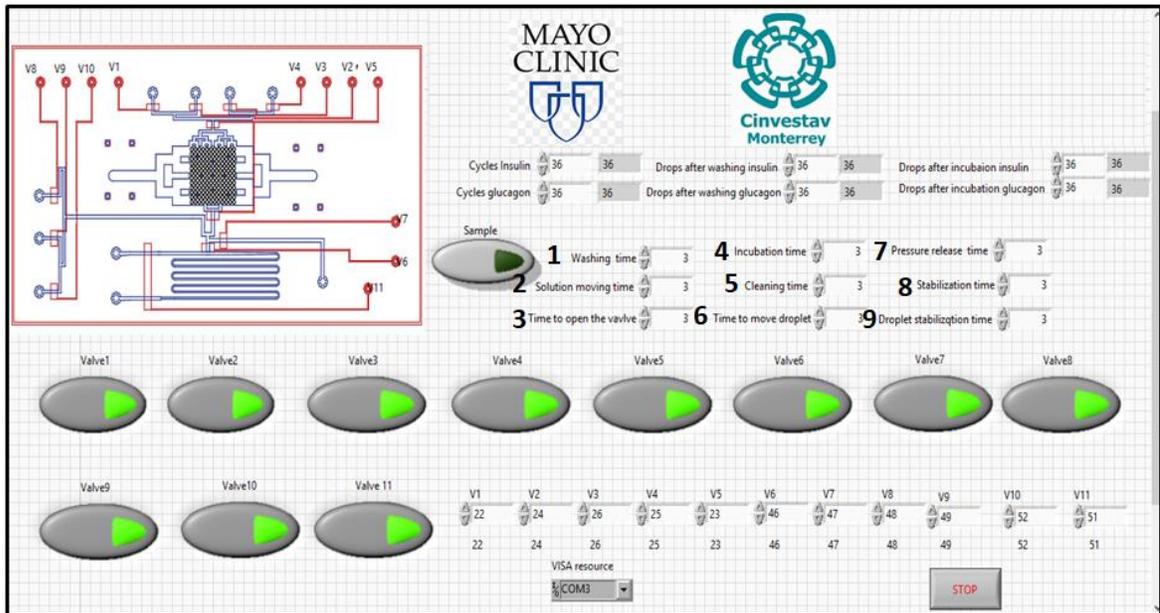


Figura 3.5. Interfaz gráfica para controlar el dispositivo integrado durante los experimentos de estímulos con hormonas.

3.1.4 Preparación de los dispositivos.

3.1.4.1 Módulo para cultivo de esferoides.

Antes de usar el módulo para cultivo de esferoides, los dispositivos se colocan en la campana de flujo laminar bajo luz UV por una hora y después se almacenan en cajas Petri estériles. Luego se deben tratar las superficies del dispositivo para evitar que las células se adhiera al PDMS. El tratamiento consiste en llenar los reservorios con plurónico estéril F127 (20052, ATT Bioquest, EE. UU.) al 2% (p/v), a uno de los cilindros de vidrio se le coloca 250 μ L y al otro 50 μ L, esto permite que la solución entre a la cámara de cultivo por diferencia de presión. Para asegurar que todos los micropozos se hidraten con plurónico, se

realiza un protocolo que consiste en desgasificar el dispositivo por 20 minutos, después guardarlo por 20 minutos a 4°C y repetir el proceso tres veces. A continuación, se almacenan en el refrigerador a 4°C para mantenerlos durante 15 horas con el tratamiento. Justo antes de usar los dispositivos para formar esferoides, se lavan tres veces con buffer de fosfato 1x (PBS, Sigma-Aldrich Co.) usando los reservorios (en un cilindro 250 μ L y al otro 50 μ L) para remplazar el plurónico. Antes de introducir las células a los dispositivos se reemplaza el PBS con medio de cultivo.

3.1.4.2 Módulo de detección de analitos basado en gotas

Antes de cada experimento, se llenan los tubos Tygon con PBS 1X y se conectan a las entradas de las líneas de control del dispositivo y el otro extremo al tablero. Usando la interfaz gráfica, los reguladores y manómetros, se presurizan las microválvulas con 25 psi para llenar los canales de control y cerrar las microválvulas. Después de llenar las líneas de control, los canales donde se inyecta el aceite se tratan con aquapel durante 5 minutos, enseguida se secan los mismos canales con aire presurizado a 3 psi. A continuación, se inyecta aceite mineral con 1% de surfactante spam 80 a la serpentina, con la válvula V1 activada para evitar que entre aceite a los demás canales. Enseguida se conectan los tubos Tygon con los reactivos a las entradas correspondientes y se purga cada solución para eliminar cualquier burbuja de aire. Los pasos para la formación de gotas se esquematizan en la Figura 3.6. Primero, se inyecta aceite mineral en el canal de la serpentina a 3 psi durante 15 minutos. A continuación, se activan las válvulas para inyectar un pequeño volumen de muestra y reactivos del ensayo en la unión T donde se generaron las gotas de agua en aceite. Debido a las dimensiones de los canales y la presión usada, se forma un co-flujo laminar de dos corrientes antes de la formación de las gotas. Una vez completada la generación de gotas para el primer ensayo, se abren otra válvula para mezclar la muestra con los otros reactivos para el s ensayo. Entre cada formación de gotas para cada ensayo, se acciona la válvula de los desechos para limpiar los

reactivos anteriores en los canales. Estos pasos se repiten para todos los ensayos, las gotas se van moviendo por la serpentina hasta finalizar la formación de todas. Una vez generado el número necesario de gotas, el flujo en el dispositivo se detiene para permitir las reacciones enzimáticas en el interior de las gotas y después de 15 min se toman las micrografías. El dispositivo puede reutilizarse eliminando las gotas de la serpentina al abrir las válvulas de la entrada y salida del aceite e inyectarlo hasta expulsar las gotas de la serpentina.

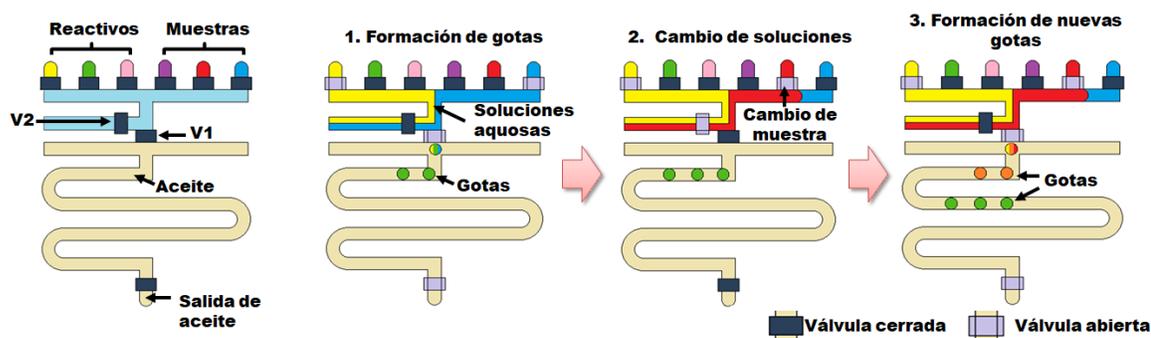


Figura 3.6. Procedimiento para la formación de gotas. Cuando las válvulas del reactivo amarillo y de la muestra azul se abren, esas soluciones acuosas se envían a los desechos (V1=cerrado y V2=abierto). Cuando V1 se abre y V2 se cierra, las soluciones acuosas se cruzan con el aceite y se forma gotas (color verde). Después de la generación del primer set de gotas, se inyecta la solución roja para reemplazar la azul y se vuelven a formar gotas.

3.1.4.3 Dispositivo integrado para cultivo y análisis de esferoides

Al igual que el módulo de cultivo, el dispositivo integrado se esteriliza colocándolo bajo luz UV por una hora en la campana de flujo laminar. Después, usando el protocolo descrito anteriormente, se trata la superficie de PDMS con plurónico al 2% por 15 horas a 4° C. Al finalizar el tratamiento, se lava tres veces el plurónico con PBS 1X. Enseguida, se colocan los dispositivos en cajas Petri de plástico estériles modificadas con perforaciones a los lados. Después se realizan las conexiones de las mangueras usando pinzas dentro de la campana

de flujo laminar. Para esto previamente se cortaron 11 mangueras Tygon de 15 cm, se les conectó pines metálicos y se colocaron en bolsas para esterilizar en autoclave. Las mangueras se llenan con PBS estéril y se conectan a los dispositivos, los extremos de estas mangueras se extraen de la caja Petri usando las perforaciones y se cubre la caja Petri, todo este proceso se realiza dentro de una campana de flujo laminar. Los extremos de las mangueras estériles se conectan a otros tubos más largos que van conectados al sistema neumático. Se presurizan las líneas de control con 25 psi por 20 minutos, después se desconectan los tubos largos de las mangueras conectadas al dispositivo y se limpia la caja Petri con las mangueras rociándolos con etanol a 80%. Después se transfiere la caja con el dispositivo a la campana y se reemplaza el PBS de la cámara de cultivo y de los cilindros con medio de cultivo.

3.1.5 Cultivo y formación de esferoides de hepatocitos

Para estos experimentos en los sistemas microfluídicos, los hepatocitos primarios de rata fueron proporcionados por el Dr. Jonghoon Choi, los cuales fueron aislados de hembras adultas de rata Lewis (Charles River Laboratories, Boston, MA, EE. UU.) utilizando un procedimiento de perfusión de colagenasa. Los hepatocitos se cultivaron en medio completo con hormonas (medio CH). Este medio es DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium, Gibco, EE. UU.) suplementado con 10% suero bovino fetal (Invitrogen, EE. UU.), con 1% (v/v) de penicilina-estreptomina (Invitrogen, EE. UU.), 7.5 g/mL de succinato sódico de hidrocortisona (Sigma, EE. UU.), 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (Invitrogen, EE. UU.), 7 ng/mL de glucagón (Sigma, EE. UU.) y 0,5 U/mL de insulina humana (Novolin N, EE. UU.). Después de cada aislamiento, se midió la viabilidad de las células usando azul tripano, solo se realizaron experimentos cuando la viabilidad era mayor al 90%. Para sembrar los hepatocitos en las cámaras de cultivo, se retira el medio de cultivo del reservorio de la entrada y se dejaron 50 μ L en el cilindro de la salida. Después, se pipeteó en el reservorio de la entrada 250 μ L de la suspensión celular a 3×10^6 células/mL y se esperó a que

las células fluyan a la cámara de cultivo. El flujo se detuvo a los 5 minutos cuando el volumen de los cilindros se igualó. Debido a que la concentración de células es alta, la cámara de cultivo se satura con hepatocitos, por lo que se debe lavar todas las células que queden fuera de los micropozos. El lavado consiste en retirar el medio con células de los cilindros y remplazarlo con medio CH fresco (250 μ L y 50 μ L en cada reservorio), los lavados se repiten hasta solo haya células en los micropozos (Figura 3.7). Los dispositivos se mantienen en cajas Petri en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂. A las 12 horas de cultivo, los hepatocitos comenzaron a agregarse y a formar esferoides. Después de 24 horas, los esferoides de hepatocitos se forman completamente y para mantenerlos en cultivo, se recambia el medio de los cilindros por medio CH fresco cada 24 horas durante tres semanas. El medio condicionado que se retira de los dispositivos se almacena a -80°C para análisis posteriores de albúmina por medio de ELISA.

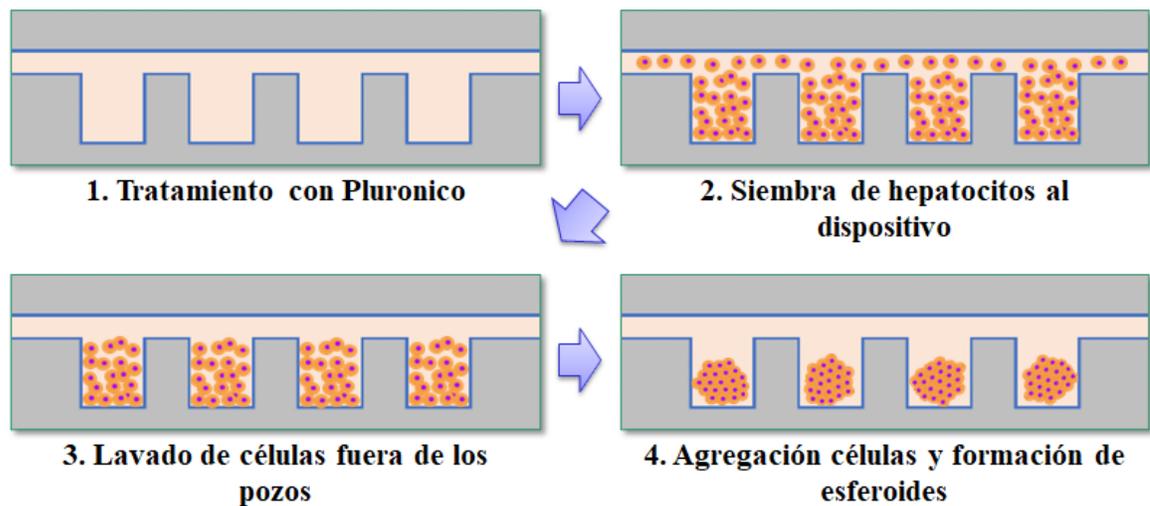


Figura 3.7. Esquema de la siembra de células y formación de esferoides. 1) Se trata la superficie con plurónico y se lava. 2) Se siembran las células y se dejan sedimentar. 3) Se lavan las células fuera de los pozos. 4) Se forman los esferoides.

3.1.6 Preparación de las soluciones para los ensayos

La solución para la detección colorimétrica de la glucosa se preparó disolviendo en buffer de fosfatos 1X con pH 7.4 (DPBS, Gibco, EE. UU.) 70 U/mL de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (GOx, Sigma, EE. UU.), 117 U/mL de peroxidasa de rábano (HRP, MP Biomedical, EE. UU.), 3.6 mM de N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3- sulfopropil)-3-metoxianilina (ADOS, Dojindo Molecular Technology, EE. UU.) y 3.1 mM de 4-Aminoantipirina (4-AAP, Sigma, EE. UU.). La solución para el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) fluorescente se preparó disolviendo 142.8 mM de L-lactato (L-lactato, Sigma, EE. UU.), 7 mM de sal sódica de β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺, Sigma, EE. UU.), 8 U/mL de diaforasa (DPR, MP Biomedical, EE. UU.) y 56.7 μ M de sal sódica de resazurina (Rezasurin, Sigma, EE. UU.) en DPBS 1X. Para preparar la solución del ensayo fluorescente para medir ácidos biliares se disolvió 25 U/mL de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD, Sigma, EE. UU.), 11.7 mM de NAD⁺, 40 U/mL de DPR y 30 μ M de resazurina en 1X DPBS.

3.1.7 Curvas de calibración

Para realizar las curvas de calibración en el módulo de detección basado en gotas, se usaron ocho concentraciones diferentes de cada analito y se generaron cinco gotas por cada concentración en todos los experimentos. Para la curva de calibración de glucosa, primero se inyectaron cuatro concentraciones altas de glucosa (3.1, 6.3, 12.5 y 25 mM) y después se inyectaron cuatro concentraciones bajas (0, 0.4, 0.8 y 1.6 mM). Para la curva de calibración de LDH, primero se inyectaron concentraciones altas (10, 20, 40 y 80 U/ L) de la enzima y después cuatro concentraciones bajas (0, 1.25, 2.5, 5 U/L). Igualmente, para la detección de ácidos biliares se inyectaron cuatro concentraciones altas de glicoquenodesoxicólico (75, 150, 300 y 600 μ M) y después cuatro concentraciones bajas (0, 8.1, 16.3 y 32.5 μ M). Después de formar las gotas con las mezclas de una concentración estándar de analito y la solución de ensayo, se detuvo el flujo durante 15 minutos para que se produjeran las reacciones

enzimáticas. Para la curva de calibración de glucosa en el dispositivo integrado, se inyectaron primero tres concentraciones altas de glucosa (25, 12.5 y 6.12 mM), después tres medias (3.13, 1.56 y 0.78 mM) y al final tres concentraciones bajas (0.39, 0.19 y 0 mM). Para los ensayos colorimétricos, las mediciones de absorbancia se realizaron utilizando una cámara CCD de color montada en el microscopio (IX-83, Olympus, EE. UU.) y ajustada a 100 μ s de tiempo de exposición. Para los ensayos fluorescentes, las imágenes de las gotas se adquirieron utilizando un filtro rojo de excitación/emisión (530-550/575-625 nm) con 250 ms de tiempo de exposición.

3.1.8 Monitoreo del daño hepático en esferoides

A los esferoides de hepatocitos en el módulo de cultivo se expusieron a 400 μ M de palmitato (Donado por la Dra. Harmeet Malhi) en medio CH durante 24 horas para inducir daño lipotóxico. Como control, en otro módulo de cultivo de esferoides se mantuvieron solo con medio de CH sin palmitato. Después de 24 horas, se conectó una salida el dispositivo de cultivo de esferoides a una entrada del módulo de detección de analitos usando un tubo Tygon de 10 cm (Figura 3.8a). A la entrada del dispositivo de cultivo se le conectó una manguera, la cual contenía medio fresco (con o sin palmitato). Las conexiones de las mangueras se realizaron en la campana de flujo laminar y los dispositivos se colocaron en cajas Petri modificadas con perforaciones. A las entradas del módulo de detección se le cargaron las cinco soluciones, dos controles y tres soluciones para los ensayos. El control positivo contenía una mezcla de LDH (75 U/L) y glicoenodesoxicólico (150 μ M) en medio CH con 24.6 mM de glucosa. Como control negativo se usó PBS sin LDH, ácidos biliares ni glucosa. Después de las conexiones, se colocaron los dos módulos en una cámara de humedad y se controló la temperatura a 37 °C y el CO₂ al 5%. Esta cámara se montó en el microscopio para obtener imágenes de los ensayos dentro de las gotas.

La secuencia de formación de gotas fue la siguiente: se formaron tres gotas mezclando reactivos de ensayo de glucosa con la solución de control positivo, seguidas de tres gotas de reactivos de ensayo de glucosa mezcladas con las soluciones de control negativo, y tres gotas formadas mezclando reactivos de ensayo de glucosa con los medios del dispositivo de cultivo celular. La misma secuencia se repitió para el ensayo de LDH y luego para el de ácidos biliares, para obtener un total de 27 gotas (Figura 3.8b). Después de formar las gotas, estas se mantuvieron en la serpentina al cerrar todas las válvulas, y se tomaron micrografías a los 15 minutos. Las imágenes se tomaron con un objetivo 5X formando un mosaico de nueve micrografías para obtener la imagen completa de todas las gotas en la serpentina. Los esferoides de hepatocitos se analizaron cada 24 h en el transcurso de 96 h, realizando cambio de medio (con y sin palmitato) cada 24 horas después del análisis con el módulo de detección. Se prepararon soluciones nuevas de los controles y de las soluciones con los reactivos para los ensayos antes de cada experimento.

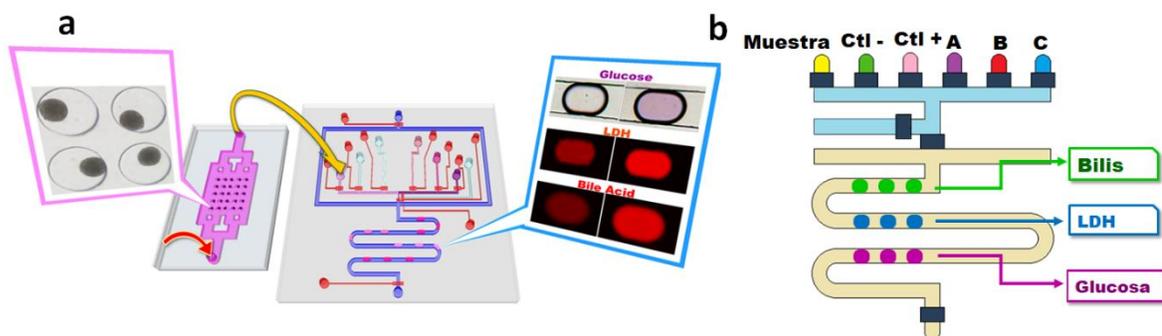


Figura 3.8. (a) Esquema de la configuración del dispositivo de cultivo con el módulo de detección de analitos basado en gotas. (b) Figura mostrando la configuración del módulo de detección.

3.1.9 Experimento de estimulación con insulina/glucagón.

Para estos experimentos los esferoides en el dispositivo microfluídico integrado se cultivaron durante 1 hora con medio MEM con 5.5 mM de glucosa, sin insulina, glucagón ni FBS. Después, se retiró el medio de los reservorios y estos se cerraron con tapones de acrílico. Enseguida, se conectaron las mangueras estériles con los medios (con insulina o glucagón), los reactivos para la detección de glucosa y el aceite, cada manguera estaba conectada a tubos de 1.5 mL, las cuales tenían las soluciones. Todas las conexiones se realizaron dentro de una campana de flujo laminar y la tubería se extrajo de las cajas Petri modificadas, donde se almacenaron los dispositivos para mantener esterilidad. Al terminar las conexiones en el dispositivo, las mangueras de las líneas de control se conectaron a tubos Tygon largos conectados al sistema neumático. Después se presurizaron todas las válvulas para cerrarlas, las cuales ya estaban llenas con PBS estéril antes de sembrar los hepatocitos. A continuación, se presurizaron los tubos de 1.5 mL al conectarles tubos Tygon largos acoplados al sistema neumático, esto permitió inyectar las soluciones al dispositivo microfluídico con presión positiva. Después de purgar todas las soluciones, se comenzó el programa automático que realizó los siguientes pasos (Figura 3.9):

Paso 1: Se perfundió el medio MEM (5.5 mM de glucosa e insulina 100 nM) durante 5 minutos para lavar la cámara.

Paso 2: Se cerraron todas las válvulas para incubar el medio MEM (5.5 mM de glucosa y 100nM de insulina) durante 25 min.

Paso 3. Después de la incubación, se generaron gotas mezclando el medio con la solución para le detección de glucosa.

Paso 4. Se cerraron la entrada y la salida del canal de serpentina para incubar las gotas. Al mismo tiempo, se lavó la cámara de cultivo celular perfundiendo medio MEM (5.5 mM de glucosa y 80 pM de glucagón) durante 5 minutos.

Paso 5. Se cerraron todas las válvulas para incubar el medio MEM (5.5 mM de glucosa y 80 pM de glucagón) durante 25 min.

Paso 6. Después del tiempo de incubación, se generaron nuevas gotas mezclando el medio con la solución para medir glucosa.

Paso 7. La entrada y la salida del canal de serpentina se cerraron para incubar las nuevas gotas. Al mismo tiempo, se lavó la cámara de cultivo celular perfundiendo medio MEM (5,5 mM de glucosa y 100 nM de insulina) durante 5 minutos. Se repitieron cuatro ciclos de perfusión de insulina/glucagón y formación de gotas y se tomaron micrografías 15 minutos después de la formación de las gotas en cada paso para analizarlas posteriormente.

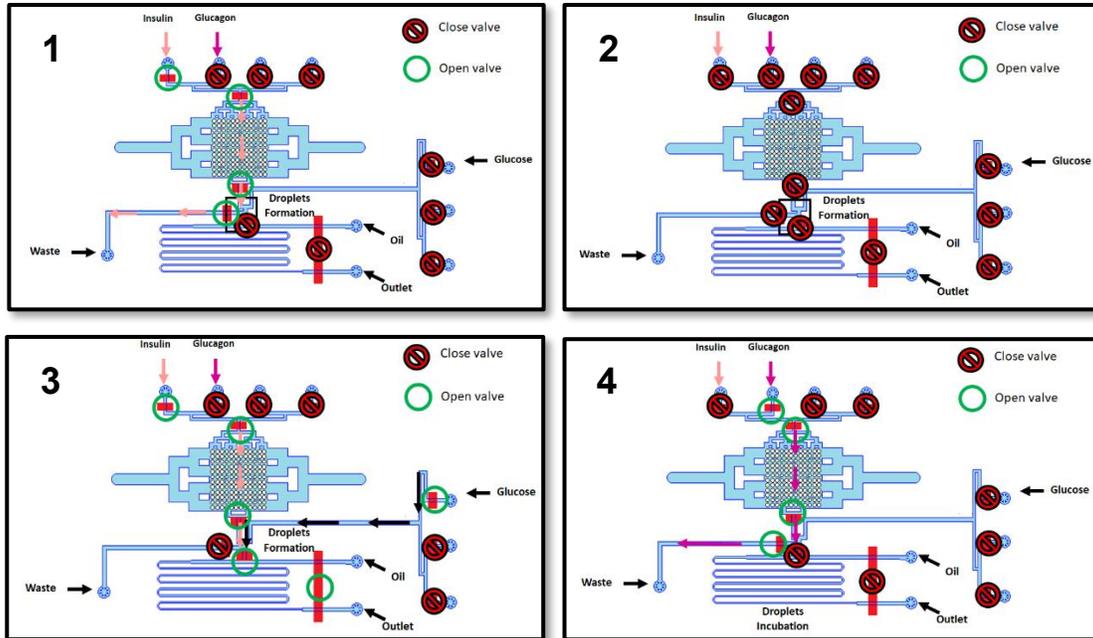


Figura 3.9. Esquema de la secuencia de los experimentos de estimulación con hormonas. 1) Primero se perfunde medio con insulina a la cámara. 2) Se cierran todas las válvulas para incubar la insulina. 3) Después de la incubación se generan las gotas mezclando el medio de la cámara con los reactivos para detectar glucosa. 4) Se perfunde medio con glucagón a la cámara y se repiten los pasos.

3.1.9 Análisis de imágenes

Las micrografías obtenidas se analizaron con un script en MATLAB personalizado (Figura 3.10). Para el análisis, los mosaicos compuestos por nueve micrografías se guardaron en campo claro y en el canal de fluorescencia en una carpeta junto con el programa. Al empezar el programa, el mosaico completo se despliega en la pantalla las veces deseadas, por ejemplo, si se desean analizar las 27 gotas en una serpentina, se despliega las 27 veces la misma imagen. Cada vez que se despliega la imagen, manualmente se selecciona una sola gota que se quiera analizar dando *click* sobre ella. Después, aparece una ventana con un

zoom de la gota seleccionada y se da *click* en el centro de la gota para obtener una imagen de la región de interés. Para el canal de fluorescencia, la región se transforma a escala de grises y se obtiene el valor promedio del área seleccionada y al terminar el análisis de todas las gotas, se despliega una lista con los valores promedios de grises. Para el ensayo colorimétrico (imagen en campo claro) se obtienen los valores de CMYK y al finalizar, se despliega los valores del color magenta (M). Es importante seleccionar las gotas en orden para poder relacionar el valor de la lista con la gota seleccionada. Después, se repite el análisis, pero seleccionando una zona cercana a las gotas para obtener los valores del fondo y restársela al valor de cada gota (extracción de fondo).

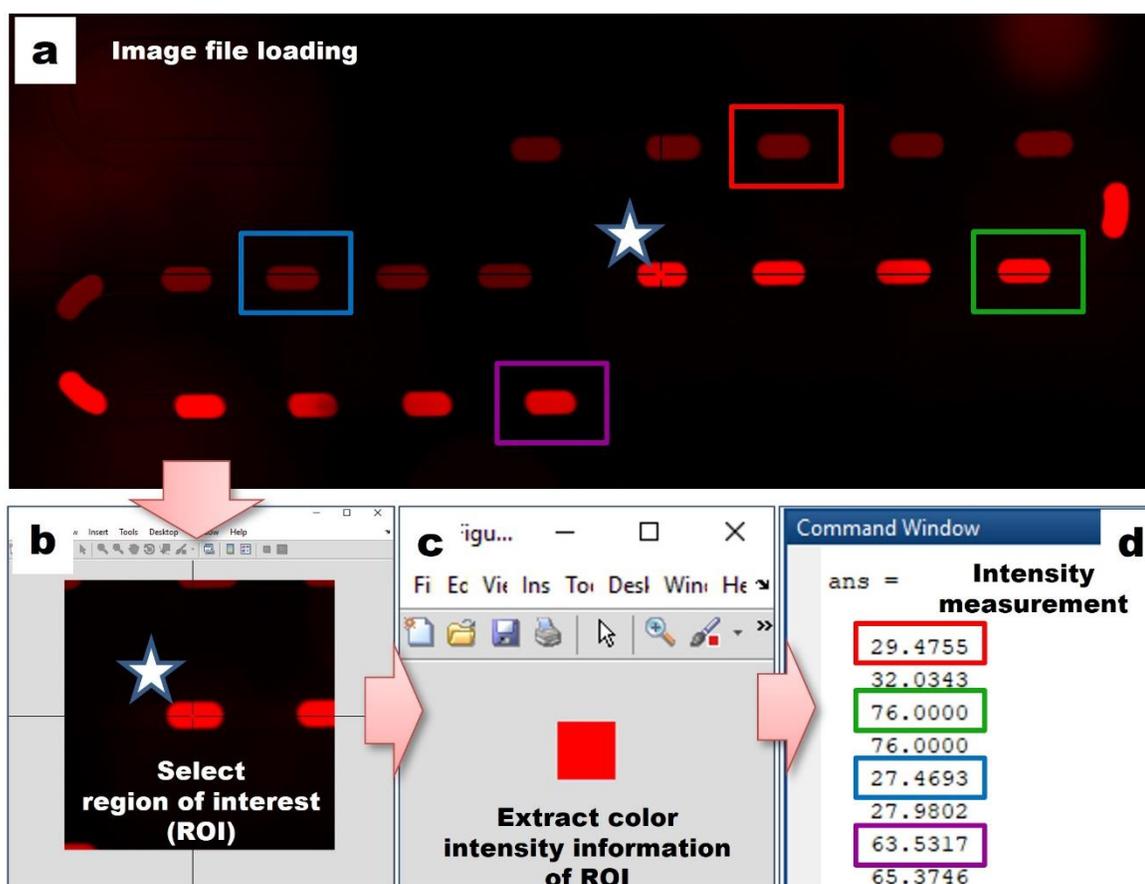


Figura 3.10. Representación de cómo se analizan las imágenes.

3.2 Sistema microfluídico para el análisis de células individuales

3.2.2 Fabricación

Antes de la fabricación, el diseño del dispositivo para el análisis de células individuales se realizó en el software Autodesk AutoCAD 2018. El diseño se guardó como archivo DXF y con el programa KLayout 0.23.10 se convirtió a formato GDS. Este archivo es compatible con el equipo microgenerador de patrones. (μ PG 101, Heidelberg Instruments, Alemania).

Los dispositivos también se fabricaron con técnicas de fotolitografía y de litografía suave multicapa. La primera técnica se usó para elaborar los moldes de la capa de control y la de flujo. Los dispositivos de PDMS se fabricaron con la técnica de litografía suave multicapa.

3.2.2.1 Fabricación de moldes

Para fabricar el molde de la capa de control y el de la capa de flujo, a las dos obleas de 10 cm primero se les da un tratamiento con plasma de oxígeno (Zepto, Diener Electronic GmbH & Co. KG, Alemania) por 5 minutos. El molde de la capa de flujo se fabrica con cuatro recubrimientos y cuatro resinas diferentes, ya que se debe fabricar primero las marcas de alineación, después los canales estrechos con una altura baja, luego las cámaras con las trampas y finalmente los canales con perfil redondeado para poder bloquearse con las válvulas (Figura 3.11). A continuación, se detallan todos los pasos para la fabricación del molde de la capa de flujo:

1. Se recubre la oblea con la resina negativa (GM1060, Gerstelec Sarl, Suiza) para realizar las marcas de alineación y al *spin coater* se le programaron los siguientes pasos:

Paso 1

Rampa: 10 s

Tiempo: 40 s

Velocidad: 700 rpm (para altura de 25 μm)

Paso 2.

Rampa: 10 s

Tiempo: 0 s

Velocidad: 0 rpm

2. Se realiza el pre-cocido colocando la oblea en una plancha de calentamiento y se realiza el siguiente protocolo:

i) Se calienta empezando en 50°C y se va aumentando 5°C cada 2 minutos hasta 65°C

ii) Se mantiene a 65°C durante 10 min

iii) Se aumenta a 70 °C y cada 2 minutos 5°C hasta 95°C

iv) Se mantiene a 95°C durante 30 min.

3. Se expone la fotorresina a luz UV usando el equipo *micro pattern generator* (μPG 101, Heidelberg, Alemani), el cual tiene un láser de 377 nm. El equipo se conecta a una computadora donde se cargan los diseños GDS. El láser incide sobre la fotorresina trazando el diseño para comenzar la polimerización. En el equipo se elige la cantidad de energía (10 a 70 mW) y el porcentaje de energía (5 a 100%). Para ese molde se usa el cabezal de 4 mm con los parámetros de 30 mW al 50%.

4. Se realiza el post-cocido usando el siguiente protocolo:

i) Empezando en 50°C se aumenta 5°C cada 2 minutos hasta 65°C

- ii) Se mantiene a 65°C durante 10 min
 - iii) Se aumenta a 70 °C y cada 2 minutos 5°C hasta 95°C
 - iv) Se mantiene a 95°C durante 30 min.
5. Se revela la oblea usando acetato de éter monometílico de propilenglicol (PGMEA, Sigma, EE. UU.) e isopropanol para detener la reacción y limpiar.
6. Se realiza el *hard-bake* a 135 °C por 1 hora
7. Para la siguiente capa de resina a la oblea se da un tratamiento de 5 min con plasma de oxígeno.
8. Se recubre con la resina SU 8 GM1050 (Gerstelec Sarl, Suiza) para realizar los canales estrechos y se coloca en el *spin coater*, al cual se le programan los siguientes pasos:
- Paso 1
 - Rampa: 25 s
 - Tiempo: 40 s
 - Velocidad: 3800 rpm (para altura de 3 µm)
 - Paso 2.
 - Rampa: 25 s
 - Tiempo: 0 s
 - Velocidad: 0 rpm
9. Se realiza el pre-cocido calentando la oblea a 120°C por 1 min.
10. Se alinea y se expone la oblea usando el cabezal de 4 mm con los parámetros de 30 mW al 50%
11. Se realiza el post-cocido usando el siguiente protocolo:
- i) Empezando en 50°C se aumentó 5°C cada 2 minutos hasta 65°C
 - ii) Se mantuvo a 65°C durante 3 min
 - iii) Se aumentó a 70 °C y cada 2 minutos 5°C hasta 95°C
 - iv) Se mantuvo a 95°C durante 10 min

12. Se revela la oblea usando PGMEA e isopropanol para limpiar.
13. Se realiza el *hard-bake* a 150 °C por 30 min.
14. Para la siguiente capa de resina usada para formar las cámaras, se recubre la oblea con la resina GM1060, se colocó en el *spin coater*, al cual se le programaron los siguientes pasos:
 - Paso 1
Rampa: 10 s
Tiempo: 40 s
Velocidad: 800 rpm (para altura de 23 µm)
 - Paso 2.
Rampa: 10 s
Tiempo: 0 s
Velocidad: 0 rpm
15. Se realiza el pre-cocido usando el siguiente protocolo:
 - i) Empezando en 50°C se aumenta 5°C cada 2 minutos hasta 65°C
 - ii) Se mantiene a 65°C durante 10 min
 - iii) Se aumenta a 70 °C y cada 2 minutos 5°C hasta 95°C
 - iv) Se mantiene a 95°C durante 30 min.
16. Se expone la oblea en la maquina µPG Heidelberg dos veces usando el cabezal de 10 mm con los parámetros de 70 mW al 100%
17. Se realiza el post-cocido usando el siguiente protocolo:
 - i) Empezando en 50°C se aumenta 5°C cada 2 minutos hasta 65°C
 - ii) Se mantiene a 65°C durante 10 min
 - iii) Se aumenta a 70 °C y cada 2 minutos 5°C hasta 95°C
 - iv) Se mantiene a 95°C durante 30 min.
18. Se revela la oblea usando PGMEA e isopropanol.
19. Se realiza el *hard-bake* a 135 °C por 1 hora

20. A la misma oblea se le da un tratamiento de 1:30 minutos con plasma para fabricar las siguientes estructuras que serán con perfil redondeado.

21. Se recubrió la oblea con promotor de adhesión y se colocó en el *spin coater*, al cual se le programaron los siguientes pasos:

Paso 1

Rampa: 3 s

Tiempo: 20 s

Velocidad: 3000 rpm

Paso 2.

Rampa: 3 s

Tiempo: 0 s

Velocidad: 0 rpm

22. Se coloca en la plancha a 120°C por 5 min

23. Se recubre con AZ 9260 y se coloca en el *spin coater*, al cual se le programan los siguientes pasos:

Paso 1

Rampa: 5 s

Tiempo: 10 s

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Rampa: 18 s

Tiempo: 40 s

Velocidad: 800 rpm (para altura de 18 μm)

Paso 3.

Rampa: 18 s

Tiempo: 0 s

Velocidad: 0 rpm

24. Se coloca en la plancha a 90°C por un minuto

25. Se coloca en otra plancha a 115°C por 5 minutos

26. Se alinea y se expone la oblea cuatro veces usando el cabezal de 10 mm con los parámetros de 60 mW al 80%
27. Se revela la oblea utilizando el reactivo AZ 400K, diluido con agua destilada en una relación 1:3 (v/v) y se limpia con agua destilada.
28. Se realiza el reflujo a 135 °C por 30 minutos.

Para la fabricación del molde de la capa de control solo se realiza un recubrimiento con la resina negativa GM1060, la cual es la misma empleada para fabricar las marcas de alineación del molde de la capa de flujo. El protocolo de fabricación es exactamente el mismo que las marcas de alineación, usando los pasos del 1 al 6. Al finalizar la fabricación de los dos moldes, se les da un tratamiento de 30 minutos con clorotrimetilsilano (Chlorotrimethylsilane, Sigma-Aldrich Co.) para evitar la unión del PDMS a las estructuras y lograr desprender las réplicas de PDMS sin dañar los moldes.

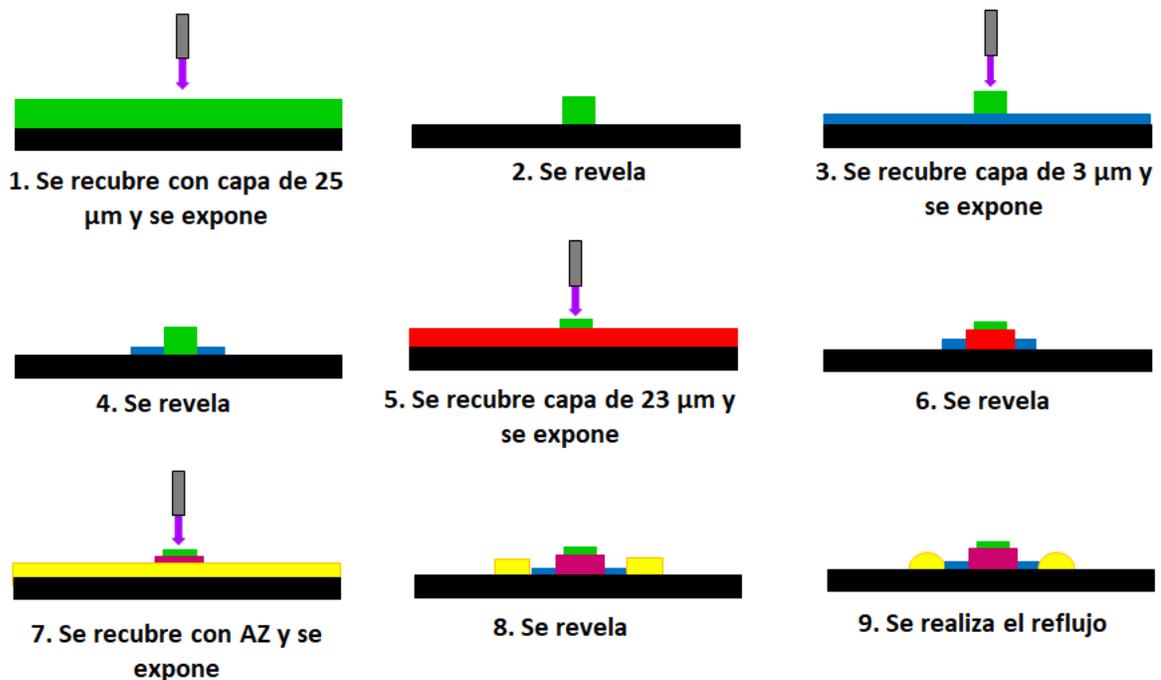


Figura 3.11. Esquema del protocolo de fabricación para el molde de la capa de flujo.

3.2.2.2 Fabricación de dispositivos de PDMS

El protocolo para la fabricación de las réplicas de PDMS del dispositivo para análisis de células individuales es similar al protocolo usado para el módulo de detección basado en gotas. A continuación, se resume brevemente la metodología de fabricación. Se vertió PDMS con una mezcla de base y agente curador a 5:1 (w/w) en el molde de la capa de control y se desgasificó por 15 minutos. El molde de la capa de flujo se recubrió a 1850 rpm durante 35 s con una mezcla 25:1 (w/w) base/curador. Ambos moldes se curaron parcialmente a 80°C durante 25 min. Después, se despegaron las réplicas de la capa de control, se perforaron y se alinearon sobre la capa de flujo y se dejaron unir durante 90 minutos a 80°C. Se perforaron las entradas y salidas de la capa de flujo y las réplicas de PDMS fueron pegadas a portaobjetos usando plasma de oxígeno durante 90 s.

3.2.3 Operación.

Al igual que el módulo de detección basado en gotas, la inyección de soluciones al dispositivo para análisis de células individual es por medio del método 2 (Figura 3.2), el cual consiste en conectar tubos Tygon a las entradas usando un pin metálico. De igual forma, las soluciones y suspensiones se introducen con presión positiva, ya que los tubos también están conectados a un sistema neumático como el de la Figura 3.3.

3.2.3.1 Dispositivo de células individuales

Para controlar las microválvulas del dispositivo se realizó un programa con una interfaz gráfica en LabVIEW (Figura 3.12). Cuando se comienza el programa, primero se cierran las válvulas de los canales laterales y se comienza a inyectar medio a los canales centrales (T1). El segundo paso consiste en abrir el canal lateral que conecta con las trampas para células (T2, tiempo en que permanece abierto hasta el siguiente paso). En el tercer paso se comienzan a inyectar las

células por el tiempo que el usuario defina, para los experimentos se configuró a 10 minutos (T3). Después se abre el canal lateral conectado a las trampas para las perlas durante el mismo tiempo que el segundo paso (T2). En el siguiente paso se comienzan a perfundir las perlas a los canales centrales, se configuró el tiempo de 2 a 25 s (T4). El último paso del programa es inyectar medio a los canales centrales para lavar cualquier célula o perla que se quede fuera de las trampas (T5). Si es necesario repetir el procedimiento se puede configurar los ciclos que se deseen, independientes para las células o las perlas. Después de terminar el programa, manualmente se cierra el canal central para separar las cámaras, el cierre de esta válvula debe ser lento para evitar expulsar a las células de las trampas, aproximadamente a 0.5 psi/s. A continuación, la inyección de las soluciones por el canal lateral es manual y después de esto, se cierran las válvulas de los canales laterales para aislar completamente las cámaras.

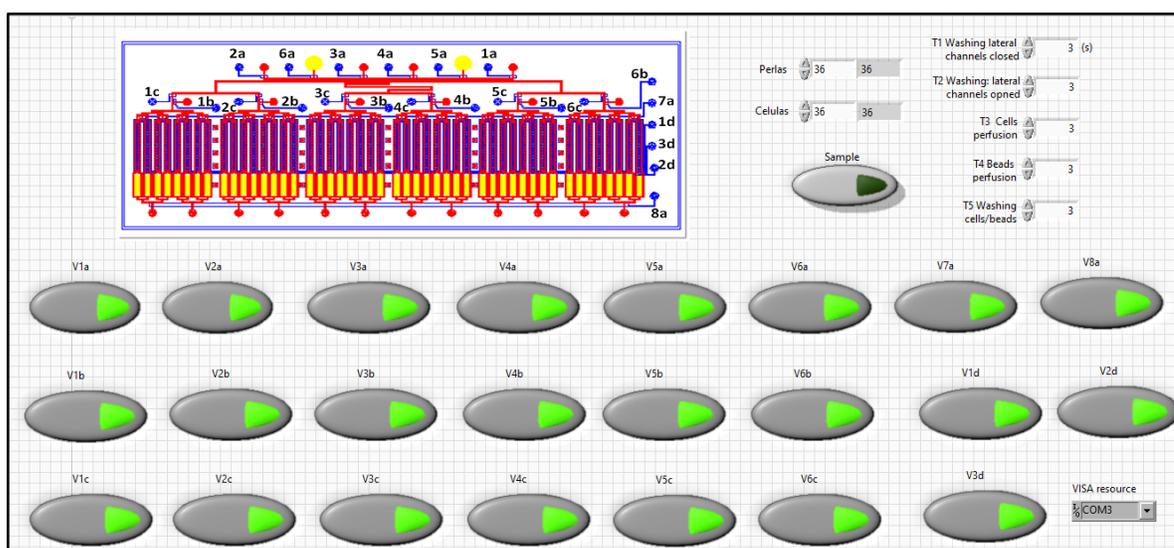


Figura 3.12. Interfaz gráfica para controlar el dispositivo para análisis de células individuales.

3.2.4 Preparación de los dispositivos.

Primero, a las entradas de las líneas de control se les conectaron tubos Tygon con PBS 1X estéril y se presurizaron a 25 psi para llenar las microválvulas.

Después, se llenaron los canales de la capa de flujo con medio RPMI (21870-076, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) suplementado con 10% de FBS (FBS, 16000-036, Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.) usando mangueras y tubos de 1.5 mL presurizados. A continuación, se conectaron las mangueras con los estímulos para cada sección, se purgaron y se eliminaron las burbujas. Se volvió a inyectar medio por 10 min para limpiar los canales de los estímulos y después se cerraron todas las salidas, pero se mantuvo la entrada de medio abierta. El medio se incubó por 1 hora, ya que el FBS ayuda a evitar la adhesión inespecífica de células y microesferas a la superficie. El siguiente paso es perfundir las suspensiones de células y perlas, la metodología se detallará más adelante.

3.2.5 Cultivo de líneas celulares y aislamiento de monocitos

La caracterización de la ocupación de las trampas para células se realizó usando la línea células NALM-6, las cuales son células de leucemia linfoblástica aguda Pre-B y fueron amablemente proporcionada por la Dra. Rosana Pelayo. Las células se cultivaron en cajas T25 en un medio completo, que consiste en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y se mantuvieron en condiciones de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. Antes de inyectar las células en el dispositivo, se tiñeron los núcleos con 5 µg/mL de Hoechst 33342 (H3570, Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.) durante 5 minutos y se lavaron con medio completo por medio de centrifugación.

Para los experimentos de secreción de citocinas, se usaron monocitos humanos, los cuales se purificaron a partir de sangre periférica. Primero se recolectó sangre venosa de donadores sanos en tubos con EDTA. Después, se colocaron 3 mL de sangre entera sobre 3 mL de Histopaque (10771, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en tubos de centrifuga de 15 mL y se centrifugaron a 450 g durante 30 min. La capa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) se recogió con cuidado usando una pipeta Pasteur y se lavó dos veces con PBS centrifugando por 10 min a 200 g. Las PBMC se

transfirieron a cajas Petri de plástico y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 min en medio RPMI 1640 suplementado con pen-strep sin FBS. Las células no adheridas se lavaron con PBS a 37°C, mientras que las adheridas se cultivaron durante 3 días en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero autólogo y 1% de pen-strep. Los monocitos se despegaron de las cajas Petri incubando con tripsina-EDTA al 0.05% (59418C, Sigma) durante 5 minutos. Se utilizó medio RPMI con suero autólogo para inactivar la tripsina y la suspensión celular se centrifugó a 200 g durante 3 min. Antes de introducir las células, se ajustó la densidad a 1.5x10⁶ células/mL y se añadió DNasa I a 0,2 U/mL (AM2222, Thermo Fisher Scientific) para evitar que el ADN ocluyera los canales mientras se inyectaban las células.

3.2.6 Preparación de las microperlas

Para la caracterización de la ocupación de trampas por perlas, se usaron perlas de poliestireno de 6.5 µm y para los inmunoensayos se usaron microperlas de poliestireno con estreptavidina de 6.7 µm (SVP-60-5, Spherotech Inc., EE. UU.). Para funcionalizar las microperlas con los anticuerpos de captura, primero se lavó una suspensión de perlas de 30 µL a ~30 × 10⁶ perlas/mL con diluyente 1X ELISA/ELISPOT (00-4202-56, eBioscience, EE. UU.). Los lavados se realizaron tres veces mediante centrifugación a 6000 rpm durante 15 min. Después, se incubaron en un volumen de 50 µL ~9 × 10⁵ microperlas con anticuerpos de captura anti-IL8 biotinilados a 11 µg/mL (BAF208, R&D Systems, EE. UU.) durante toda una noche o hasta su uso, con un almacenamiento máximo de hasta 3 semanas a 4 °C. El día del experimento, se lavaron con medio completo tres veces mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. Justo antes de inyectar las perlas al dispositivo, se mezclaron con PEG al 20% (202398, Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) y con 13.3% de densificador (OptiPrep™ Density Gradient Medium, D1556, Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) para evitar que las perlas se pegaran entre sí y que se sedimenten en los tubos.

3.2.7 Curvas de calibración

Las curvas de calibración se realizaron en dispositivos separados y se usaron las perlas funcionalizadas con anti-IL-8. Primero, se capturaron las perlas en sus trampas correspondientes, al cerrar la válvula del canal lateral conectado a las trampas para perlas. Después, se perfundieron diferentes concentraciones de IL-8 recombinante humana (IC208P, R&D Systems, EE. UU.) en medio RPMI. Para esto, a cuatro secciones se les perfundió una concentración diferente (0.09, 0.19, 0.39, 0.78 ng/mL) y una quinta sección se usó como control negativo al solo inyectarle medio. Después, se aislaron las microcámaras con las perlas al activar lentamente las válvulas y se dejó incubar por 90 minutos. Los inmunoensayos tipo sándwich se revelaron al cambiar la solución de la microcámara por anticuerpos de detección anti-IL-8 marcados con ficoeritrina (R-PE) (IC208P, R&D Systems, USA) a 10 µg/mL. Para realizar en recambio de soluciones, se empleó un protocolo que consiste en inyectar por 30 s la nueva solución por el canal lateral conectado a las trampas para perlas a un flujo volumétrico de 1 µl/min. En el siguiente paso se activaron las válvulas de ese canal lateral durante 30 s y se repitieron los ciclos 10 veces consecutivas. Se dejaron incubar los anticuerpos de detección por 30 minutos y finalmente se tomaron micrografías de las cámaras con las perlas. Las micrografías se tomaron con un objetivo 10X en campo claro y en el canal de fluorescencia R-PE usando un microscopio invertido de epifluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania). Se siguió el mismo protocolo con los mismos parámetros para evaluar las concentraciones más altas (1,56, 3,125, 6,25, 12,5 ng/mL y control negativo) de la proteína IL-8.

3.2.8 Detección de citocinas secretadas por células individuales

Para esto experimentos se usaron monocitos de sangre periférica, los cuales se resuspendieron en 100 µl de medio para perfusión celular, el cual es medio completo con un 13% de OptiPrep™ y EDTA 0.05%. Las células fueron

atrapadas en sus sitios de captura abriendo el canal lateral cercano a las trampas celulares y estas se inyectaron en cinco secciones. Luego se lavó el medio de perfusión con medio fresco durante 2 min para deshacerse de las células que no fueron capturadas. Una vez ocupadas las trampas celulares, se abrieron las válvulas del canal lateral opuesto (canal lateral de microperlas) y se inyectaron las perlas funcionalizadas con anticuerpos en seis secciones del dispositivo, en una sección solo se capturaron perlas como control negativo. A continuación, se aislaron las células en las cámaras de ensayo aumentando lentamente la presión en las válvulas del canal central (~ 0,5 psi/s). Luego, se añadió a las microcámaras una mezcla de medio completo, anticuerpos de detección y LPS a diferentes concentraciones (0, 1, 5, 10 y 50 µg/mL) utilizando el protocolo de intercambio de soluciones. Después, se activaron las válvulas de los canales laterales para aislar completamente las microcámaras. El dispositivo se mantuvo en condiciones de cultivo a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Finalmente, se escaneó todo el dispositivo tomando micrografías en campo claro y fluorescencia utilizando un objetivo de 10X.

3.2.9 Análisis de imágenes.

Las micrografías se exportaron como extensión TIFF sin compresión y se analizaron con un programa en MATLAB. El programa despliega todas las imágenes, las cuales contienen tres cámaras. Visualmente se selecciona con un *click* la cámara que se desea analizar (cámaras con células y perlas), y se genera un zoom sobre la cámara para visualizar las perlas. Se selecciona la perla que se desea analizar, se obtiene una región de interés (ROI), esa región de interés es la misma de las imágenes de fluorescencia. En esas imágenes se corta la ROI, se transforma a escala de grises y se obtiene el promedio de gris. Para analizar cámaras con más de una perla, se debe volver a correr el programa y seleccionar la otra perla en la cámara. Las imágenes se despliegan en el orden en el que se tomaron por lo que se puede determinar el valor de grises en las

perlas de cada cámara, ya que el primer valor de la lista corresponde a la primera cámara. Los valores se promedian manualmente cuando hay más de una perla en la cámara. Para restar el fondo, se repiten los análisis, seleccionando las cámaras y se selecciona un área del canal cercano a las perlas para después restar los valores del fondo a los valores de las perlas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos de los sistemas microfluídicos desarrollados. En la primera parte se reportan los resultados de los dispositivos para el análisis de esferoides, incluyendo los módulos de cultivo y de análisis basado en gotas, así como del dispositivo integrado. En la segunda parte se muestran los resultados del dispositivo para el análisis de células individuales.

4.1 Sistemas microfluídico para el cultivo y análisis de esferoides

4.1.1 Módulos de cultivo de esferoides y de detección de analitos

La plataforma para el análisis de esferoides está formada por dos módulos: 1) el primero para la formación y cultivo de esferoides de hepatocitos y 2) el segundo para el análisis de biomarcadores (Figura 4.1). Estos módulos son dispositivos microfluídicos ya que contienen canales y estructuras en el orden de los micrómetros y el régimen del flujo es laminar. La plataforma microfluídica utiliza dos principales métodos para el análisis de biomarcadores en esferoides: microválvulas y microfluídica basada en gotas. Las microválvulas neumáticas (válvulas de Quake) permiten el control del flujo de los reactivos/muestras en el dispositivo [65]. La microfluídica basada en gotas manipula fluidos de bajo volumen y los discretiza en fases inmiscibles a través de la unión de flujo cruzado de agua y aceite [66]. El sistema microfluídico con la combinación de los dos métodos permite la mezcla de las muestras con los reactivos para los ensayos, la multiplexación de los ensayos y la automatización de los procesos.

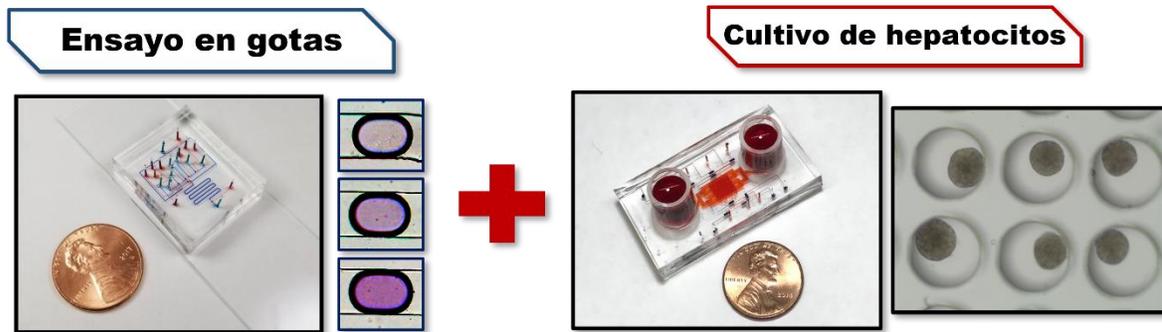


Figura 4.1. Fotografías de los dos módulos. El dispositivo microfluídico para análisis usando gotas y el dispositivo para la formación y cultivo de esferoides.

4.1.1.1 Diseño de los módulos.

Antes de la fabricación, diseños de los dispositivos para el cultivo y análisis de esferoides se realizaron con el software Autodesk AutoCAD 2017, los cuales se guardaron como DWG y se exportaron como PDF. Los archivos se enviaron para la impresión de las fotomáscara a la compañía *CAD/Art Services*. En el archivo PDF se indicó la polaridad de las estructuras (estructuras oscuras o transparentes) dependiendo del diseño, la fotorresina empleada y el protocolo de fabricación.

4.1.1.1.1 Modulo de cultivo.

El módulo para cultivo de esferoides permite introducir células para capturarlas dentro de micropozos, con el fin de formar y cultivar esferoides. El diseño del dispositivo está formado por tres capas: una de control, una de flujo y una de micropozos (Figura 4.2). La primera capa tiene ocho líneas de control con microválvulas para controlar el flujo del fluido dentro del dispositivo. Las válvulas bloquean o permiten el paso de las soluciones hacia la cámara de cultivo al activarse o desactivarse. La capa de flujo contiene una cámara de cultivo de $5550 \times 5550 \mu\text{m}$, además dos canales de transporte que se ramifican hacia la cámara.

Los canales de transporte tienen un ancho de $950\ \mu\text{m}$ y cada canal contiene sus respectivas entradas y salidas para la siembra de hepatocitos. También tiene una red de canales de $250\ \mu\text{m}$ en los lados de la cámara de cultivo con entradas y salidas que pueden usarse para las conexiones con el módulo de detección. La capa de micropozos es un arreglo de 12×12 pozos para un total de 144 y cada pozo tiene un diámetro de $350\ \mu\text{m}$.

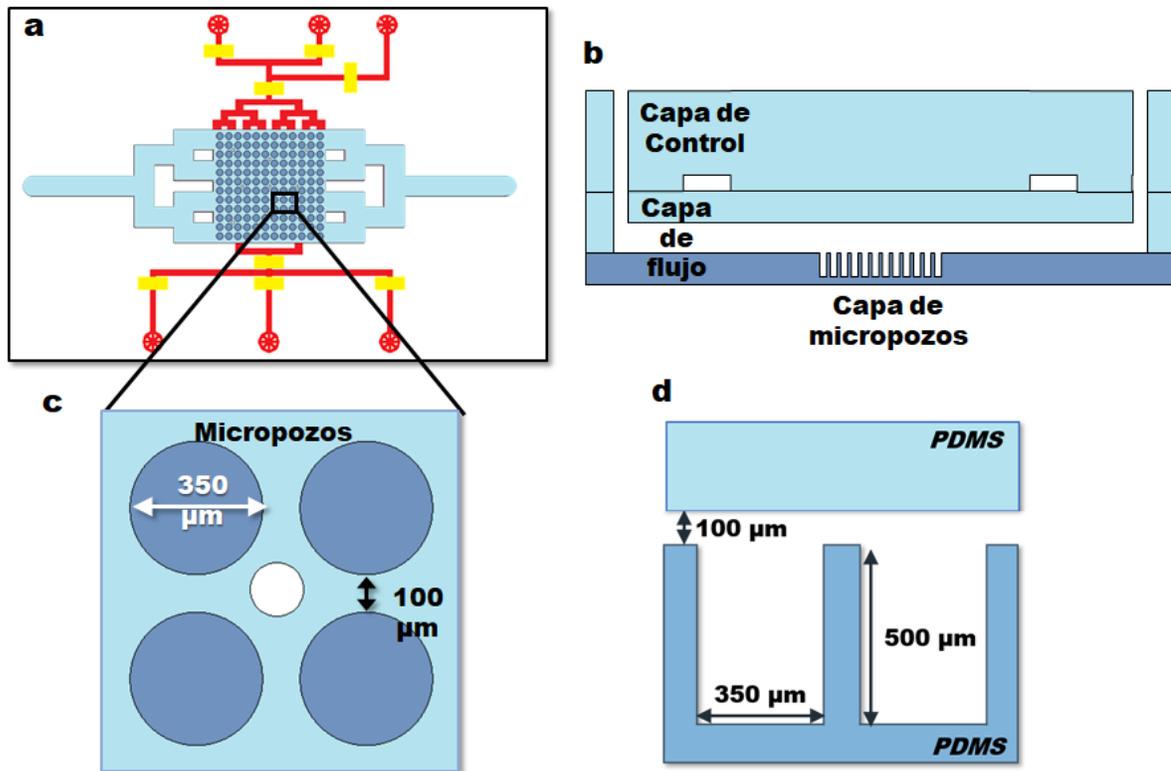


Figura 4.2 (a) Diseño del módulo de cultivo de esferoides, en azul se muestra la cámara de cultivo con canales de transporte, en amarillo las microválvulas y en rojo la red de canales de flujo. (b) Vista lateral del dispositivo con las tres capas. (c) Diseño de una sección con cuatro micropozos. (d) Vista lateral de la cámara de cultivo y dos micropozos.

Para la impresión de las fotomáscaras, el diseño se separa por capas y por secciones, dependiendo de la altura deseada para las estructuras. Después, se determina con qué polaridad se imprimen las fotomáscaras (Figura 4.3). Para

la capa de flujo, el diseño se separa por tipo de estructura y se agregan marcas de alineación a los extremos de la fotomáscara. La cámara de cultivo y los canales de transporte tiene una altura de 100 μm y la red de canales tiene una altura de 50 μm , se fabrican con resina negativa y positiva, respectivamente. Para la capa de control, la cámara de cultivo y los micropozos, la polaridad de las estructuras es transparente (blanco) y para la red de canales la polaridad de las estructuras es oscura (negro).

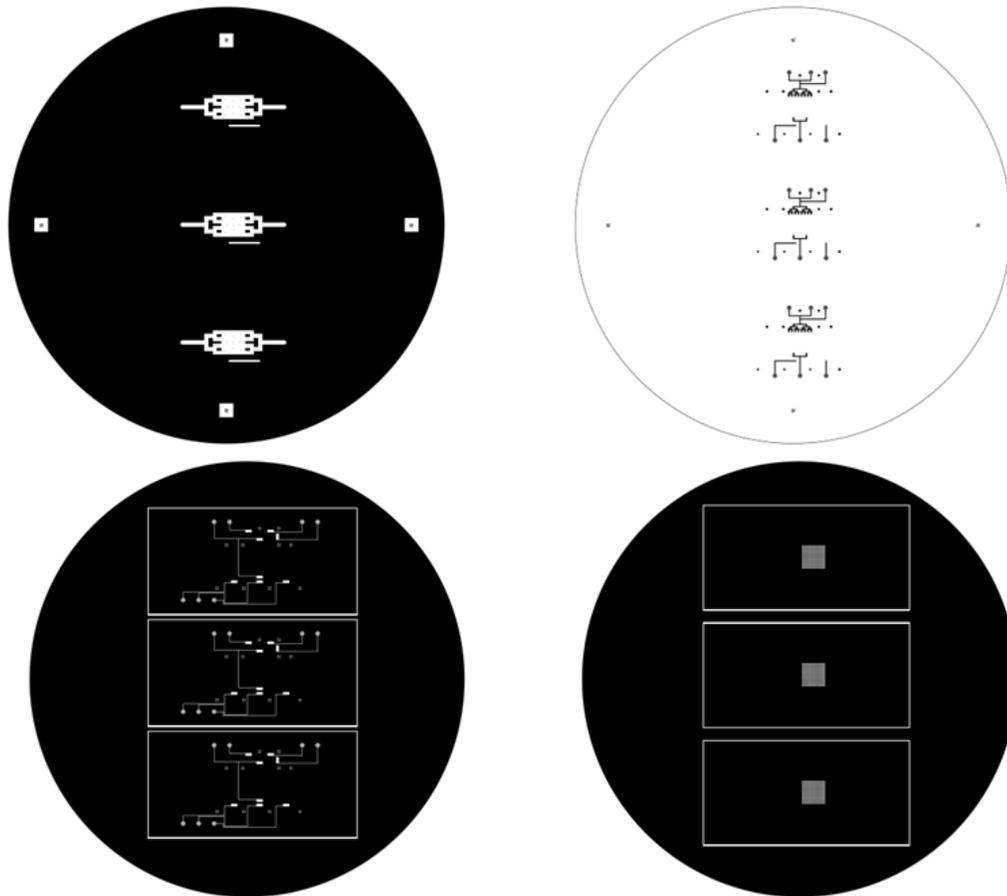


Figura 4.3. Diseño de las fotomáscaras. La capa de control, la de pozos, las cámaras de cultivo con los canales de transporte tienen polaridad con estructuras transparentes y la red de canales con estructuras oscuras.

4.1.1.1.2 Modulo de análisis basado en gotas.

El módulo está diseñado para la medición de múltiples analitos usando gotas donde se mezclan los reactivos y las muestras. El dispositivo está formado por dos capas una de control y una de flujo (Figura 4.4), además el sustrato donde se pegan es de vidrio. La capa de control contiene diez líneas con válvulas de $450 \times 350 \mu\text{m}$. Seis válvulas son usadas para bloquear o permitir la entrada de reactivos al dispositivo. Las válvulas V1 y V2 son usadas para formar las gotas o enviar las soluciones a desechos, respectivamente. Las otras válvulas son para permitir el paso del aceite o bloquear la salida de la serpentina. La capa de flujo está separada en dos secciones, una para introducir los reactivos/muestras y otra para el aceite. La primera sección cuenta con una red de canales con seis entradas y una salida para desechos, los canales de esta sección tienen un ancho de $150 \mu\text{m}$. La segunda sección tiene un canal en forma de serpentina con $200 \mu\text{m}$ de ancho, por donde pasa el aceite y se almacenan las gotas. También tiene un canal que se conecta a una entrada, este canal rodea las entradas de reactivos/muestras y es usado para introducir el aceite.

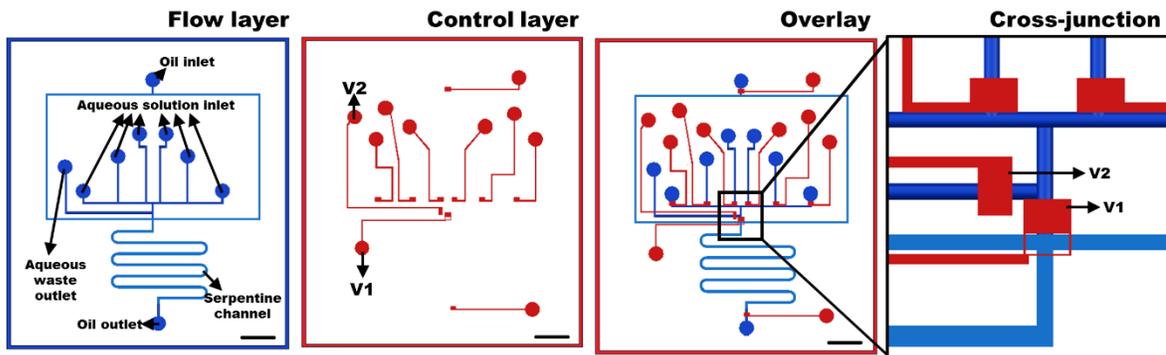


Figura 4.4. Diseño del módulo de detección de analitos basado en gotas. En azul se muestra la capa de flujo y en rojo la capa de control.

Después de realizar el diseño, se mandan a imprimir las fotomáscaras, para la capa de control solo se requiere una máscara con estructuras

transparentes. Para la capa de flujo, el diseño se separa en dos secciones, los canales para soluciones acuosas y los canales para el aceite. Esta separación se debe a que las estructuras se fabrican con diferente resina, positiva para las secciones con canales para soluciones acuosa o que vaya a tener un perfil redondo y negativa para los canales con aceite. Por lo tanto, las máscaras de la capa de flujo tienen diferente polaridad, para la primera sección las estructuras son oscuras y para la segunda sección las estructuras son transparentes (Figura 4.5).

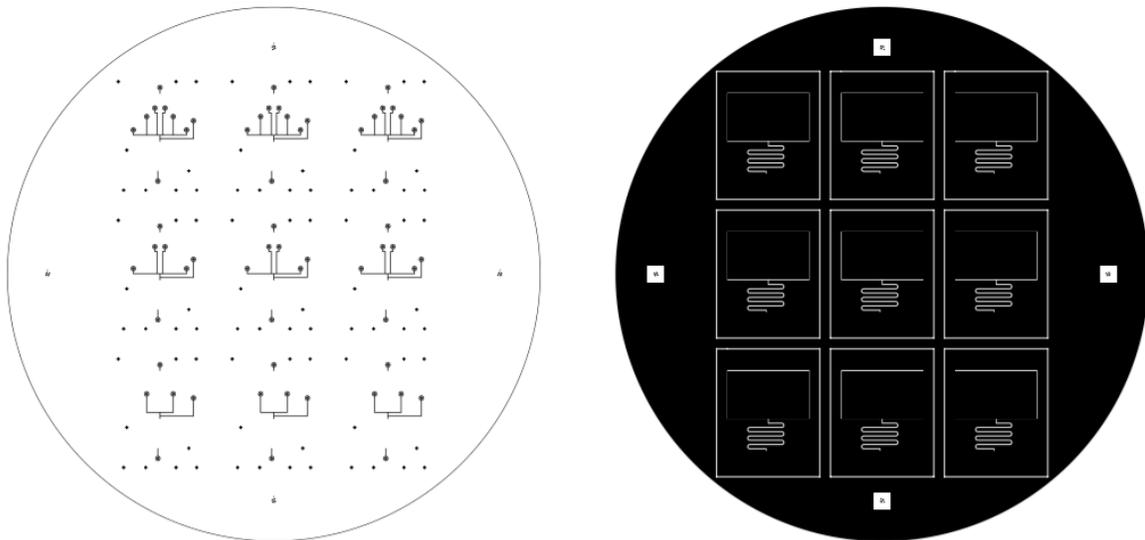


Figura 4.5. Diseño de las fotomáscaras para fabricar el molde de la capa de flujo, estructuras oscuras para los canales que se fabrican con resina positiva y estructuras transparentes para canales fabricados con resina negativa.

4.1.1.2 Módulo para cultivo de esferoides.

El dispositivo para la formación y cultivo de esferoides está fabricado completamente de PDMS y consta de tres capas. Este material ofrece varias ventajas, ya que es transparente, biocompatible, permeable a gases como el oxígeno y, además, con el PDMS se pueden formar estructuras en el orden de

micrómetros [67]. Por otra parte, se han desarrollado dispositivos de PDMS para el cultivo de hepatocitos, mostrando mejor funcionamiento de estas células [46]. El módulo de cultivo desarrollado en este trabajo posee micropozos de 500 μm de profundidad que permiten la captura de células, agrupándolas en ellos. Al tratar la superficie del PDMS con plurónico, se evita la adhesión de células a la superficie [68,69]. El plurónico es un compuesto anfipático formado por un bloque de tres polímeros (PEO-PPO-PEO), en los extremos tiene óxido de polietileno (PEO), también conocido como polietilenglicol (PEG), y en el centro óxido de polipropileno (PPO). El PPO es hidrofóbico, por lo que las interacciones hidrofóbicas entre el PDMS y el PPO deja expuestos los segmentos PEO en los canales microfluídicos [70]. Por lo tanto, al quedar expuestos los segmentos de PEO en las superficies de los micropozos, los hepatocitos no se adhieren a la superficie y se agregan entre ellos mediante las uniones E-cadherina para formar los esferoides [50,71]. En la Figura 4.6 se muestran micrografías de los micropozos del dispositivo con hepatocitos después de sembrarlos (0 h), donde las células ocupan todo el pozo. A las 6 horas se observa que se empiezan a agregar, a las 24 y 48 horas se forman esferoides compactos.

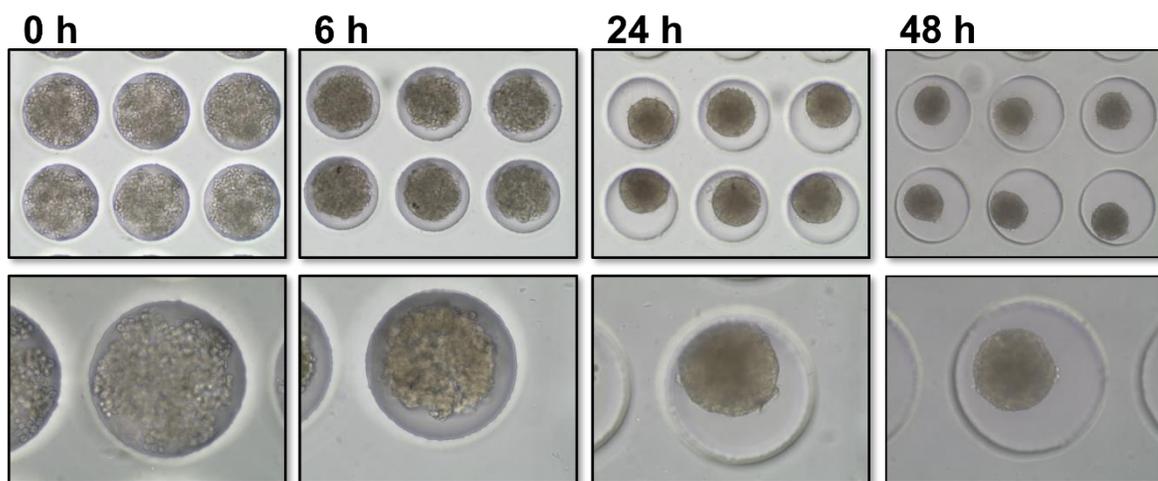


Figura 4.6. Micrografías de los hepatocitos en el dispositivo, después de la siembra los pozos están llenos con células, a las 6 horas se empiezan a agregar, a las 24 horas los esferoides se forman y a las 48 h los esferoides están compactos.

Para un cultivo convencional de monocapa (2D) de hepatocitos primarios de rata en placas de 6 pozos, se recomienda sembrar 5×10^5 células en 2 mL de medio de cultivo y cambiar el medio cada dos días [72]. Por otra parte, cultivos 2D de hepatocitos primarios de rata en dispositivos microfluídicos se han cultivado exitosamente por 14 días sembrando 4×10^6 células/mL para al final obtener 20 000 células dentro de una cámara de $75 \mu\text{m}$ de altura para un volumen de $1 \mu\text{L}$, reservorios con $250 \mu\text{L}$ y cambiando el medio cada 48 horas [46]. Para el módulo de formación y cultivo de esferoides se inyectaron $250 \mu\text{L}$ de suspensión celular a 3×10^6 células/mL y el volumen de la cámara de cultivo es de $5 \mu\text{L}$. Para determinar el número total de células en el dispositivo después de los lavados y formación de esferoides, se realizó un ensayo para cuantificar el ADN. Para estos experimentos, durante la siembra de los hepatocitos se separaron alícuotas con 1000×10^3 , 250×10^3 , 62.5×10^3 , 15.6×10^3 y 0 células/mL y se almacenaron a -80°C . A las 48 horas de la siembra, cuando los esferoides ya estaban completamente formados, se disgregaron dentro del dispositivo con tripsina y colagenasa I, después se lisaron y se recuperó todo el contenido del dispositivo. Usando las muestras almacenadas con número de células conocidas y las muestras recuperadas del dispositivo, se cuantificó el ADN total con un kit comercial (DNA Quantification Assay Kit Fluorometric, Abcam, EE. UU.) y se determinó el número total de células en los dispositivos. Se obtuvo que la cantidad total de células en los dispositivos con pozos de $500 \mu\text{m}$ de profundidad era de 420,000 células por dispositivo y conociendo el número de pozos por dispositivo y considerando que los esferoides son uniformes, se estimó que cada esferoide contiene aproximadamente 2,916 células. Debido al volumen del dispositivo, los reservorios y la cantidad de células, se realizaron cambios de medio cada 24 horas.

Se monitorearon los esferoides por 21 días, se adquirieron micrografías y también se recuperó y almacenó el medio de cultivo. En la figura 4.7 se muestran micrografías de los esferoides en los pozos tomadas con objetivos de 5X, 10X y 20X a lo largo de los 21 días. Por otra parte, se analizó la función de los esferoides de hepatocitos, al medir la cantidad de albúmina secretada dentro de los

dispositivos a lo largo de las tres semanas. La albúmina es un marcador de funcionalidad de los hepatocitos, por lo que al disminuir a lo largo de los días indica que están perdiendo función o están muriendo [46,50,73]. En la figura 4.8 se muestran los resultados, se puede observar que siguen secretando albúmina durante las tres semanas, aunque a las dos semanas comienza a disminuir la cantidad de albúmina secretada. Sin embargo, se puede observar que gran parte de los esferoides siguen manteniendo su forma durante las tres semanas, aunque algunos se empiezan a adherir a la superficie o a desprenderse células del esferoide. Los siguientes experimentos con los esferoides se realizaron dentro de los primeros doce días de cultivo.

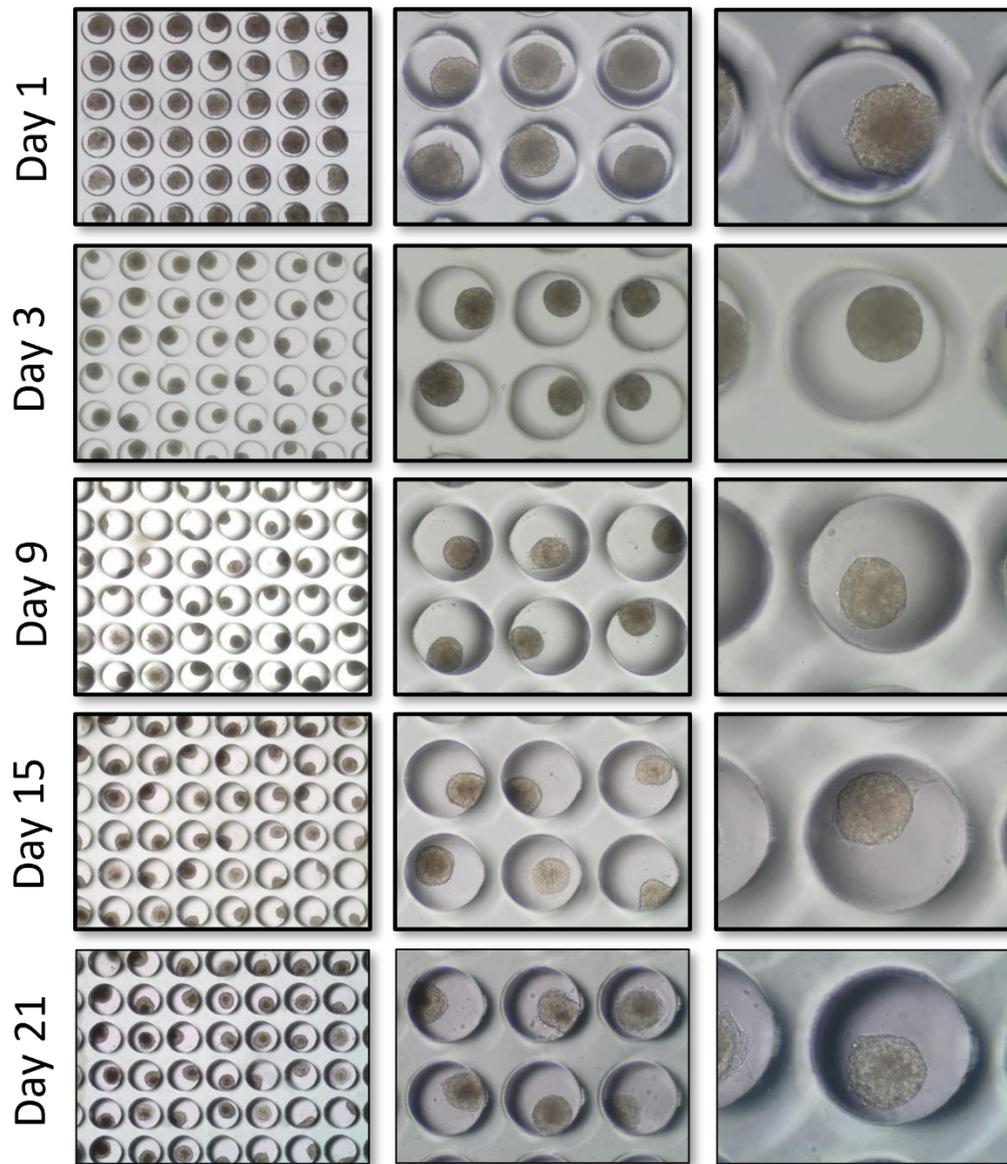


Figura 4.7. Micrografías de los esferoides de hepatocitos formados y cultivados por 21 días en los micropozos de 500 μm de profundidad.

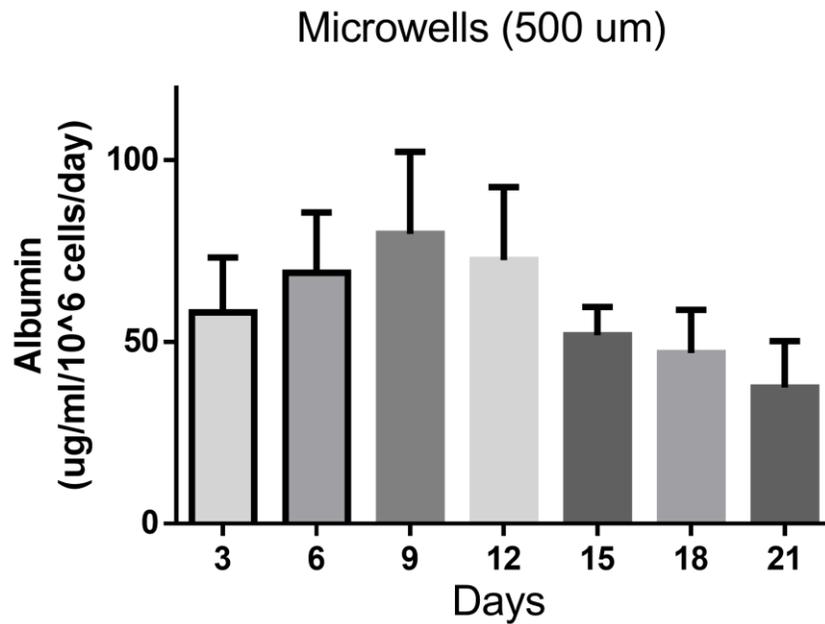


Figura 4.8. Gráfica con los resultados de la secreción de albúmina por los esferoides de hepatocitos sembrados en el dispositivo con pozos de 500 μm de profundidad.

4.1.1.3 Módulo de detección de biomarcadores basado en gotas.

El dispositivo microfluídico para la detección de biomarcadores permite la formación de gotas y emplea las microválvulas para combinar mezclas de soluciones. En la Figura 4.9 se muestra una fotografía del dispositivo, los canales de control con las microválvulas se llenaron con colorante rojo y los canales de flujo con colorante azul. Las entradas están enumeradas de la siguiente forma:

1. Entrada para conectar la manguera con aceite.
2. Entradas para conectar las muestras, reactivos o el módulo de cultivo de esferoides.
3. Salida de desechos cuando se limpian los canales.
4. Salida del aceite y las gotas.

Para controlar la formación de gotas con diferentes mezclas, realizar ensayos multiplexados e incubar las gotas dentro del dispositivo es necesario implementar las microválvulas, a continuación, se describe el funcionamiento de cada válvula:

V1. Esta válvula separa las soluciones acuosas del aceite y sirve para formar las gotas. También se puede controlar el volumen de las gotas al variar el tiempo de apertura de esta válvula.

V2. Para enviar las soluciones a una salida de desechos para lavar los canales con soluciones acuosas. La sincronización entre esta válvula con la V1 permite la correcta formación de gotas con las soluciones deseadas, además controla la separación entre las gotas.

V3. Para controlar la entrada del aceite al dispositivo.

V4. Para permitir la salida del aceite y gotas, además al activarse junto con la válvula V3 inmoviliza las gotas para incubarlas dentro de la serpentina.

V5. Para controlar las entradas de los reactivos o muestras hacia los desechos o para formar gotas.

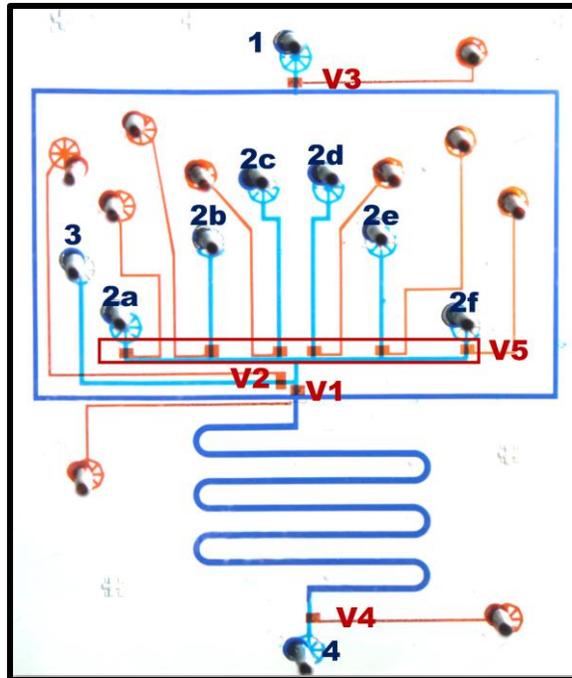


Figura 4.9. Fotografía del dispositivo microfluídico para el análisis de biomarcadores secretados por esferoides usando gotas. Las líneas de control se llenaron con colorante rojo y los canales de flujo con colorante azul.

4.1.2.2.1 Caracterización del dispositivo

Los seis canales de las entradas para los reactivos/muestras tienen la misma distancia hacia la intersección entre los canales de las soluciones acuosas y los canales para el aceite. Los canales para los reactivos y muestras tienen las mismas dimensiones de 150 μm de ancho, 6700 μm de largo y 18 μm de alto, para que tengan las mismas resistencias hidráulicas y así conectar todas las entradas al mismo regulador de presión. Se determinó experimentalmente las presiones neumáticas para formar correctamente las gotas, para las soluciones acuosas se usaron 2 psi, para el aceite 2.5 psi y para la entrada cuando se conecta el módulo de cultivo 4 psi; estas presiones se fijaron para todos los experimentos. Las dimensiones de los canales y las presiones usadas para inyectar las soluciones generan flujo laminar en los canales. Además, junto con las microválvulas se hace posible generar dos corrientes de flujo de diferentes

soluciones para después formar gotas donde las dos soluciones se mezclan. Como se muestra en la Figura 4.10, con la válvula V1 cerrada y la válvula V2 abierta, las soluciones de colorantes amarillo y azul co-fluyen sin mezclarse. Al cerrar V2 y abrir V1 se empujan los colorantes amarillos y azules al canal con aceite y se forma la gota. En la gota recién formada, se pueden observar los colores amarillo, azul y verde, lo que indica que la mezcla ha comenzado mientras que las primeras gotas formadas ya muestran un color verde homogéneo.

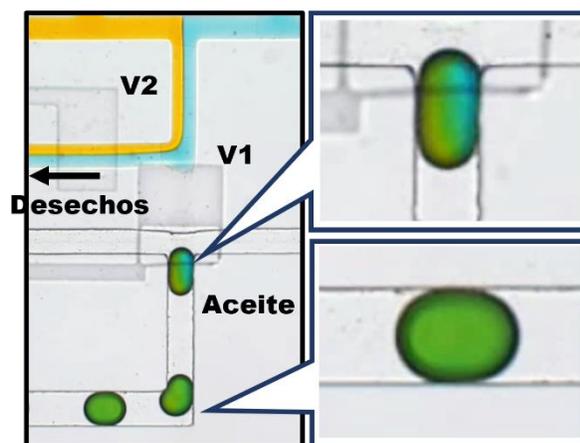


Figura 4.10. Micrografías de la unión T donde está la válvula V1 para separar las soluciones acuosas del aceite y gotas verdes formadas con colorante azul y amarillo.

Para comprobar el funcionamiento del dispositivo se realizaron experimentos con colorantes para formar mezclas con diferentes colorantes. Se usó el programa y la interfaz gráfica realizada en LabVIEW que permite abrir secuencialmente las válvulas para mezclar las soluciones y generar gotas de forma automática. En la Figura 4.11 se muestran esquemáticos y micrografías de las secuencias para formar gotas con diferentes mezclas de colorantes. Para estos experimentos primero se perfunde el aceite abriendo las válvulas V3 y V4. A continuación, se inyectan dos soluciones (colorante amarillo y azul) a la salida de desechos abriendo V2. Enseguida, se cierra V2 y se abre V1, para inyectar

un pequeño volumen de las soluciones a la intersección de flujo cruzado del aceite y es donde se generan las gotas de agua en aceite. La sincronización y la rápida actuación de estas válvulas es fundamental, ya que si se cierran ambas válvulas por un tiempo prolongado las soluciones se comienzan a mezclar en el canal. Por otra parte, si las dos válvulas se mantienen abiertas, las soluciones no se mezclan en las gotas de forma proporcional. Se puede formar la cantidad de gotas deseadas al accionar de nuevo las válvulas V1/V2 y esto es fácilmente controlado al configurar el número de gotas en la interfaz gráfica. Para formar el siguiente set de gotas, las válvulas se accionaron para dirigir los residuos a la salida de desechos con el fin de eliminar la solución anterior de los canales. Después se repite el proceso al activarse la válvula de otra entrada de reactivos, se ejemplifica en la Figura 4.11, al formar una gota con colorante rojo y amarillo. Esta secuencia de pasos se puede repetir para llenar la serpentina con diferentes gotas. Es posible reusar el dispositivo al transportar las gotas hacia la salida de la serpentina, solo se debe de mantener la válvula V1 cerrada y continuar perfundiendo aceite hasta limpiar el canal.

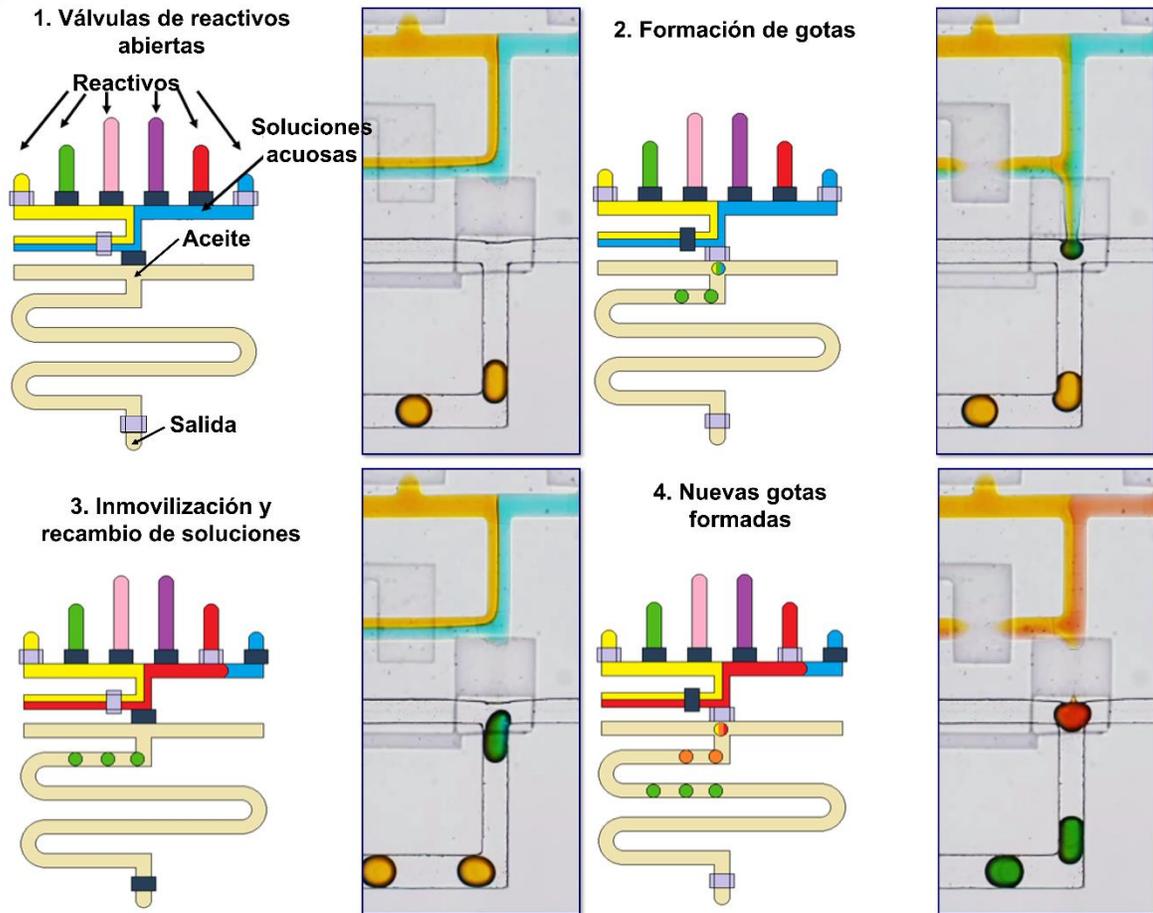


Figura 4.11. Esquemáticos y micrografías del proceso para formar gotas con diferentes soluciones. 1) Cuando las válvulas en la entrada de los colorantes amarillo y azul se abren V1 está cerrado y V2 abierto, las soluciones se desvían a la salida. 2) Cuando se invierte el estado de V1 y V2, se forma gotas (color verde). 3) Después de la generación del primer grupo de gotas la solución roja se introduce en lugar de la azul. 4) Se forman nuevas gotas (color naranja).

El dispositivo microfluídico permite generar gotas de diferentes combinaciones de reactivos y muestras, ajustar el volumen de las gotas, controlar la cantidad de gotas y crear secuencias de diferentes combinaciones. En la Figura 4.12 se muestran micrografías de la serpentina con gotas de diferentes volúmenes y combinación de colores. Para las gotas amarillas, se mezcló colorante amarillo con agua destilada, para las gotas verdes se combinó

colorante amarillo con azul y para las gotas naranjas se usó colorante amarillo con rojo. Para los experimentos de la Figura 4.12a, primero se formaron gotas con las tres combinaciones y volúmenes de 0.08 nL, después otras tres gotas con las tres diferentes combinaciones, pero con volúmenes de 1.6 nL y de igual forma gotas con volúmenes de 2.05, 2.48 y 2.69 nL. En los experimentos de la Figura 4.12b, todas las gotas con combinación de colorante amarillo y agua se formaron con volumen de 0.08 nL, la combinación de amarillo más azul con 1.6 nL, y las gotas formadas con amarillo y rojo de 2.05 nL. El volumen de las gotas se puede controlar al modificar el tiempo de apertura de la válvula V1 (*sampling time*), ya que entre más tiempo permanece abierta la válvula, mayor cantidad de volumen pasa al canal con aceite. Para estos experimentos, se varió el tiempo en el que la válvula permanece abierta usando 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25 s. Después de formar las gotas con los diferentes tiempos, se tomaron micrografías del canal y se midió la longitud de las gotas para estimar el volumen considerando un cilindro y las dimensiones del canal (altura del canal 60 μm y ancho 200 μm). Como se muestra en la Figura 4.12c, usando tiempos de 0.05 a 0.25 s, se generaron gotas con longitudes que van desde 220 a 720 μm o de 0.8 a 2.69 nL, con desviaciones estándar de 0.09, 0.06, 0.07, 0.01 y 0.02 nL para cada set de gotas.

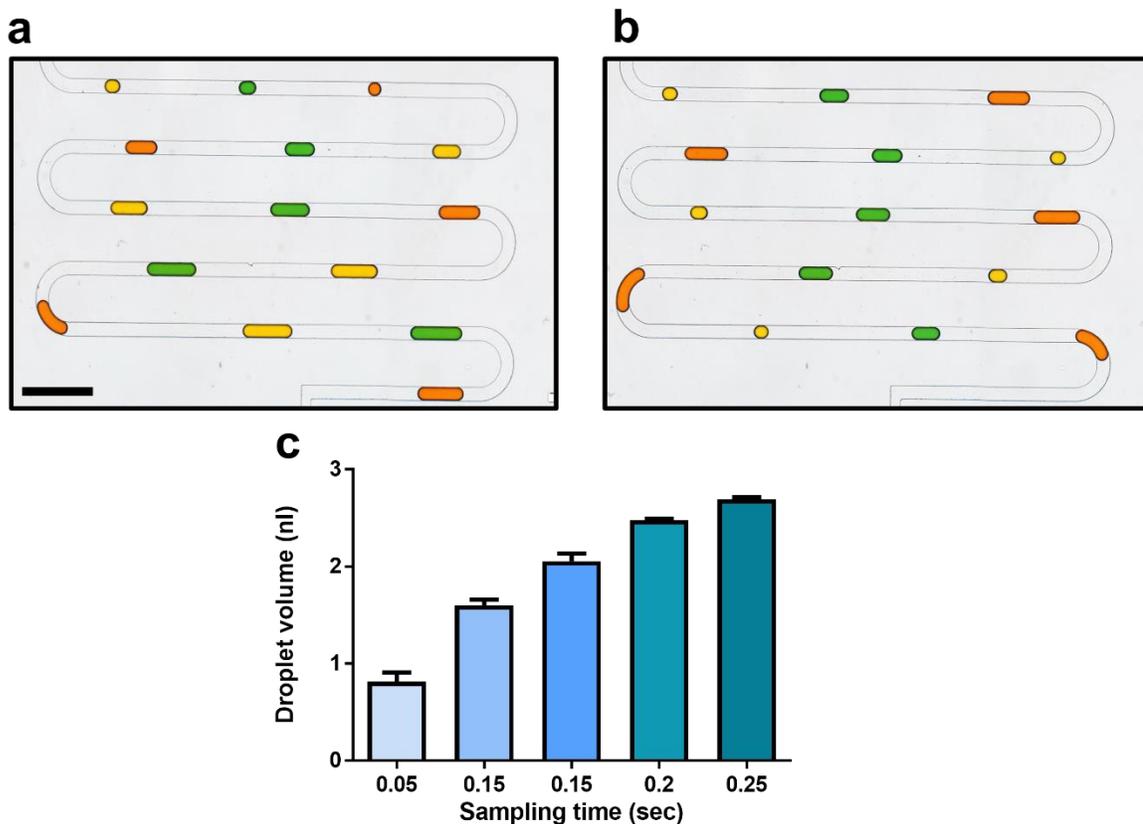


Figura 4.12. (a y b) Micrografía de las gotas formadas en distintas condiciones de muestreo. Se generaron gotas de diferentes combinaciones de colores y diferentes longitudes al variar el tiempo de apertura de la válvula V1. Barra de escala = 1 mm. (c) Gráfico mostrando la relación entre el volumen de las gotas y el tiempo de muestreo.

Por otra parte, también se puede controlar el número de gotas en la serpentina al controlar la frecuencia del funcionamiento de la válvula V1. Se fijó el tiempo en el que permanece la válvula V1 abierta a 0.05 s (gotas de 0.8 nL) pero se varió la frecuencia de funcionamiento de 15 a 250 mHz. Para cambiar la frecuencia de funcionamiento de la válvula V1 a 15 mHz, primero se mantuvo abierta la válvula por 0.05 s y después se cerró por 64 s mientras la válvula V2 permaneció abierta ese tiempo y se continuaba con la perfusión de aceite. Con estos parámetros solo se pueden obtener tres gotas muy separadas en la

serpentina (Figura 4.13a). En otro caso, con una frecuencia de funcionamiento de 250 mHz, se abrió la válvula V1 por 0.05 s y después se cerró por 4 s para después volverla a abrir. Con estos parámetros, se pueden obtener hasta 48 gotas en la serpentina. En la Figura 4.13 se muestra la gráfica de la cantidad de gotas generadas con la frecuencia de funcionamiento de la válvula que van de 15 a 250 mHz y también micrografías de la serpentina con diferente número de gotas. Para los siguientes experimentos donde se generaron las curvas de calibración, se configuró el programa a un tiempo 8 s o 0.125 Hz de funcionamiento de la válvula. Con esos parámetros se obtuvieron 20 gotas ya que por cada concentración se formaron cinco gotas y se usaron 4 diferentes muestras con los analitos. Sin embargo, es posible generar 6 gotas por concentración porque con 0.125 Hz se pueden obtener un máximo de 24 gotas en la serpentina.

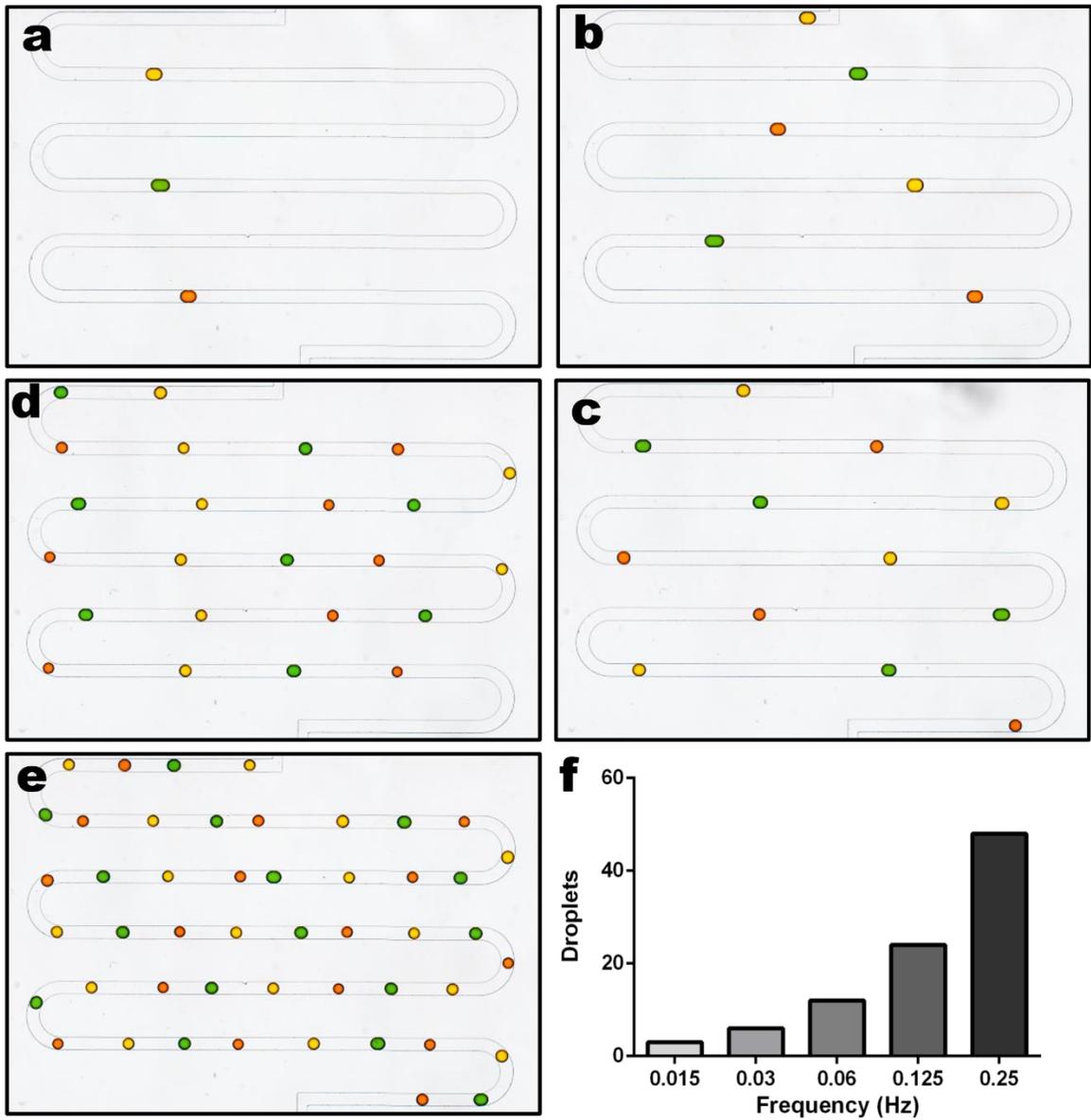


Figura 4.13. Control del número de gotas variando la frecuencia de apertura de V1. Gotas generadas usando la frecuencia de 0.015 Hz (a), 0.03 Hz (b), 0.06 Hz (c), 0.125 Hz (d) y 0,25 Hz (e). (f) Gráfica con la correlación entre el número de gotas y la frecuencia de apertura de la válvula V1.

4.1.2.2.2 Curvas de calibración.

Para usar el dispositivo como módulo de análisis de esferoides de hepatocitos, se realizaron ensayos para la detección de biomarcadores asociados a la viabilidad celular (lactato deshidrogenasa, LDH), al metabolismo energético (glucosa) y a la función específica del hígado (ácido biliar)[24,74,75]. Por otra parte, los ensayos en las gotas pueden ser colorimétricos o fluorescentes, ya que para monitorear los cambios de glucosa en el medio se obtienen señales de absorbancia (color magenta). Para la detección de LDH y ácidos biliares las lecturas de las señales en las gotas son fluorescentes. Para realizar los ensayos, las soluciones con los reactivos para la detección de los biomarcadores se cargaron en una de las entradas mientras que las soluciones con diferentes concentraciones de glucosa, LDH o ácido biliar se cargaron en las otras entradas (Figura 4.14). Posteriormente, se mezclaron las soluciones generando cinco gotas por cada concentración al activar secuencialmente las válvulas neumáticas que controlaban el flujo de las entradas.

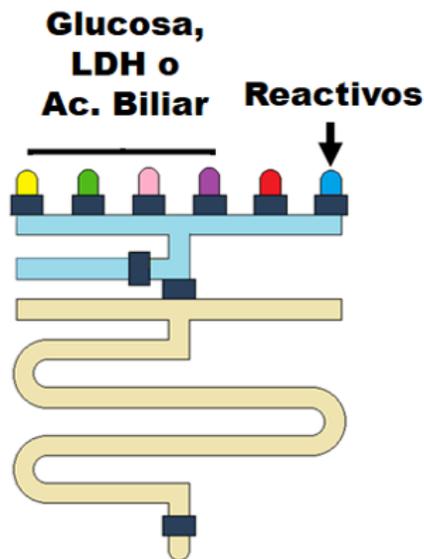


Figura 4.14. Esquemas donde se muestra la configuración de las entradas del módulo de detección para realizar las curvas de calibración.

El ensayo para la detección de glucosa se realizó mezclando en una solución glucosa oxidasa (GOx) y peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés) como pareja de enzimas para catalizar a la glucosa, y 4-AAP/ADOS como reactivos para generar color magenta [76,77]. En esta reacción, la oxidación de la glucosa por GOx da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez se oxida a agua en presencia de HRP. La reacción catalizada por la HRP produce un color magenta debido a la reducción de los reactivos de color (4- AAP/ADOS)[77]. Después de formar las gotas con las mezclas, se incubaron en condiciones estáticas en la serpentina durante 5 minutos al activar las válvulas de la entrada y salida del aceite, permitiendo que se produzca la reacción y se genere el color. Como se muestra en la Figura 4.15, la intensidad del color de las gotas es proporcional a las concentraciones de glucosa usadas que van desde 0.39 a 25 mM. Se determinó el límite de detección (LOD) de 70 μ M, definido como el promedio mas tres veces la desviación estándar del blanco, mientras que el coeficiente medio de variación (CV) se calculó en un 10,8%, indicando reproducibilidad. A pesar de que algunos kits comerciales para la detección de glucosa tienen una mayor sensibilidad incluso llegando a LOD de 7 μ M, los ensayos en las gotas para glucosa son adecuados para monitorear cambios en el medio de cultivo. El medio usado para el cultivo de esferoides (DMEM) tiene una concentración de glucosa de 25 mM que va disminuyendo, ya que los hepatocitos usan la glucosa. Por lo que el rango de detección y el LOD es lo suficientemente sensible como para lograr el objetivo de este trabajo: monitorizar los cambios en el metabolismo de los esferoides de hepatocitos.

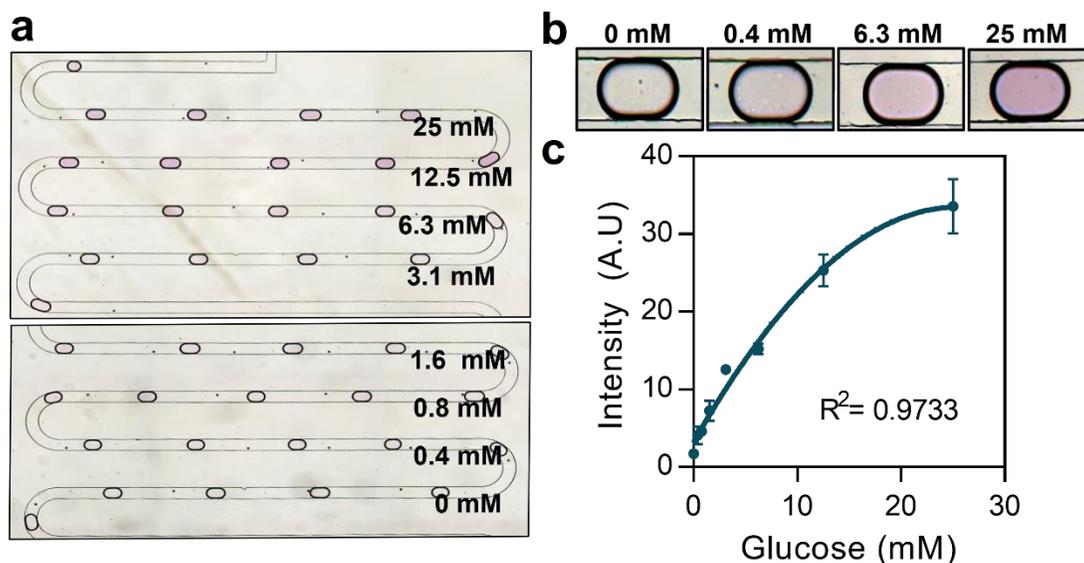


Figura 4.15. Curva de calibración del ensayo colorimétrico para la detección de glucosa. (a) micrografías de las gotas en la serpentina, las cuales tienen diferentes concentraciones de glucosa. (b) Micrografías ampliadas de gotas representativas. (c) Curva de calibración para el ensayo de glucosa.

El lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima intracelular en las células vivas, cuando se compromete la membrana celular, LDH de las células muertas se libera al medio extracelular. LDH es un marcador usado comúnmente para medir muerte celular o daño tisular [74]. La solución usada para la detección de LDH contiene lactato exógeno que es el sustrato para LDH, así como NAD^+ , una coenzima que se reduce a NADH al aceptar electrones de LDH y que luego es oxidada por la enzima diaforasa, o DPR [78,79]. La señal fluorescente se genera cuando la resazurina no fluorescente recibe electrones de la DPR y se convierte en resorufina, el compuesto fluorescente. Como se observa en la Figura 4.16, las mezclas en las gotas con los reactivos y las diferentes concentraciones de LDH (0, 1.3, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 U/L) da lugar a los diferentes niveles de señal de fluorescencia. El límite de detección cuantificado al analizar las imágenes fue de

0.5 U/L mientras que el CV fue de 4.1%. Este límite de detección es comparable a con kit de ensayos comerciales para la detección de LDH [80].

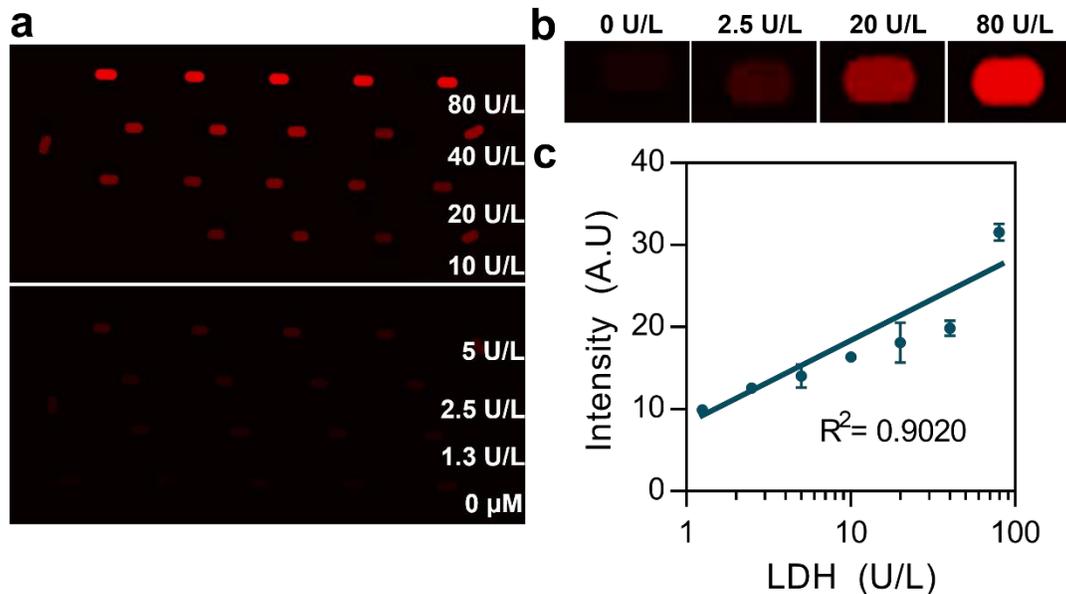


Figura 4.16. Curva de calibración del ensayo fluorescente para la detección de lactato deshidrogenasa. (a) Micrografías de las gotas en la serpentina, las cuales tienen diferentes concentraciones de LDH. (b) Micrografías ampliadas de gotas representativas. (c) Curva de calibración para el ensayo de LDH.

Los ácidos biliares son producidos en el hígado por los hepatocitos y es un biomarcador del funcionamiento hepático. Los ácidos biliares tienen un papel importante en la eliminación de los productos de desecho, además participan en la digestión de alimentos[21,81,82]. Se adaptó un kit comercial, el cual es un ensayo enzimático fluorescente para la detección de ácidos biliares (fluorometric total bile acid assay kit from BioAssay Systems LLC). En este ensayo se usó glicoquenodesoxicólico como ácido biliar, el cual es descompuesto a 3 α -hidroxiesteroide por la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD, por sus siglas en inglés). Al igual que en el ensayo para LDH, la coenzima NAD se reduce a NADH al aceptar electrones de HSD, después se oxida por la enzima DPR y la

resazurina recibe electrones de esta para convertirse en resorufina y generar una señal fluorescente [83,84]. En la Figura 4.17 se muestran las gotas con las diferentes concentraciones de ácido biliar (0, 2.3, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75 y 150 μM), donde la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de ácido biliar. Se cuantificó el límite de detección y el coeficiente medio de variación al analizar las imágenes y se obtuvo 2.1 μM y 4,7%, respectivamente. El ensayo adaptado a las gotas es similar al ensayo comercial cuando se realizan en placa de 96 pozos con mayor volumen, ya que el fabricante menciona en el manual que la saturación llega a los 150 μM y que el LOD es de 1 μM .

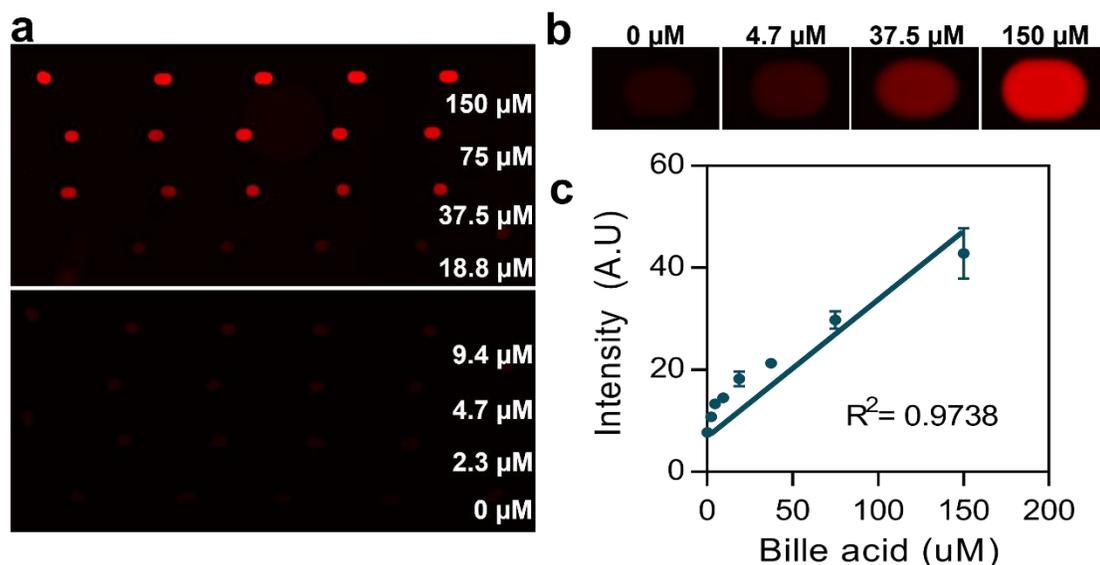


Figura 4.17. Curva de calibración del ensayo fluorescente para la detección de ácido biliar. (a) Micrografías de las gotas en la serpentina, las cuales tienen diferentes concentraciones de ácido biliar. (b) Micrografías ampliadas de gotas representativas. (c) Curva de calibración del ensayo.

Los resultados muestran la capacidad del dispositivo microfluídico basado en gotas para realizar ensayos multiplexados, automatizados y con un control

preciso de los reactivos y muestras para formar gotas. También se pueden realizar ensayos colorimétricos o fluorescentes en las gotas para la detección biomarcadores relacionados con estado de los hepatocitos. Se pueden realizar mediciones de cuatro diferentes concentraciones de glucosa, LDH y ácido biliar en un mismo dispositivo, formar las cuatro mezclas con cinco replicas en menos de 2 minutos en gotas con volúmenes de 0.8 nL y gastar una mínima cantidad de reactivos.

4.1.1.4 Monitoreo del daño hepático en esferoides.

En las secciones anteriores se mostró la capacidad de formar esferoides de hepatocitos y mantenerlos en cultivo por tres semanas en el dispositivo microfluídico. Además, se probó que en el módulo de detección es posible formar gotas y mezclar diferentes soluciones en un solo dispositivo, así como realizar ensayos para la detección de biomarcadores asociados al estado hepático y generar las curvas de calibración para glucosa, LDH y ácido biliar. Lo siguiente fue emplear ambos módulos para monitorear un modelo de daño hepático en los esferoides. Primero, se conectan ambos dispositivos por medio de un tubo Tygon y para mover el medio de la cámara de cultivo al módulo de análisis, se inyecta medio fresco en la entrada del módulo de cultivo para desplazar el medio en la cámara. Para disminuir la dilución del medio condicionado cuando se transporta hacia el módulo de análisis, se conectó entre los dispositivos el tubo tygon vacío. Se usaron 4 psi (750 nL/min) para inyectar medio fresco a la entrada del dispositivo de cultivo y mover el medio de la cámara hacia el tubo conectado a la salida y transportarlo hacia la entrada del dispositivo de gotas. Se gastaron aproximadamente 280 nL de volumen para generar 9 gotas con medio condicionado, incluyendo el volumen que se va hacia los desechos cuando se limpian los canales. Se realizó un experimento para comprobar que, con este método para transportar el medio de la cámara al módulo de análisis, no hay una dilución significativa de los primeros microlitros. Para este experimento, se inyectó Dextran-TRITC (0.5 mg/ml) en la cámara de cultivo y después se

transportó la solución al módulo de análisis, inyectando medio fresco sin Dextran-TRITC por la entrada del dispositivo de cultivo. Se observa en la Figura 4.18 que las primeras 30 gotas (primeros 930 nL de la muestra) la dilución fue inferior al 10%, sin embargo, los valores de intensidad de las siguientes gotas van disminuyendo debido a la dilución.

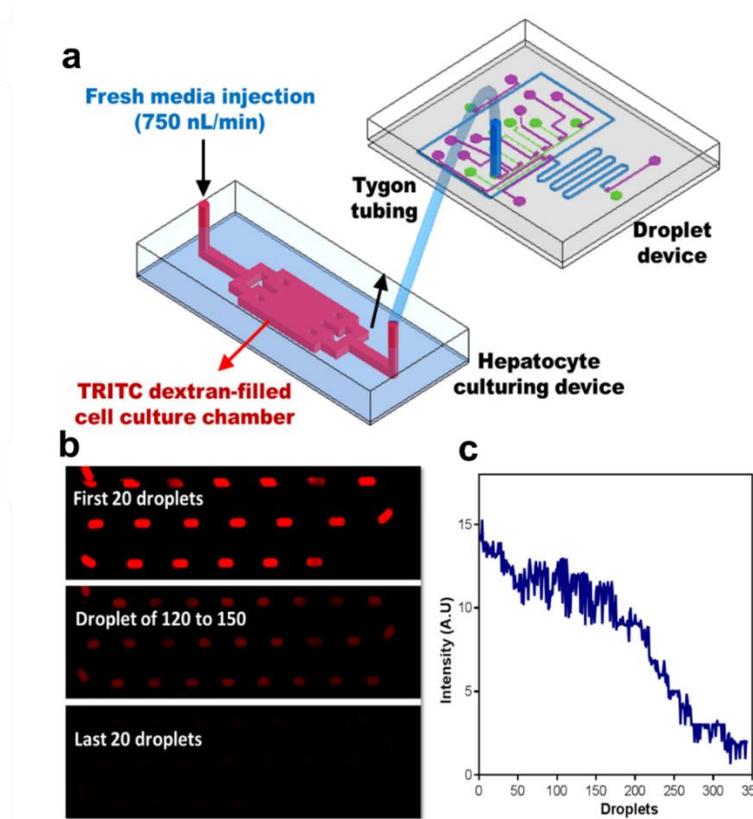


Figura 4.18. Evaluación de la dilución en la muestra en la cámara de cultivo al inyectar medio fresco. (a) Esquemático del montaje experimental, donde el dispositivo se llena con TRITC, se conecta al módulo de análisis y se inyecta medio fresco. (b) Micrografías de las primeras 20 gotas, de las 20 gotas centrales de la 120 a la 140 y de las últimas 20 gotas. (c) Gráfica de intensidad en las gotas que se van formando hasta la numero 350.

Los siguientes experimentos se realizaron con el sistema microfluídico para ejecutar ensayos multiplexados detectando tres analitos, además de poder

muestrear y analizar los pequeños volúmenes de las cámaras de cultivo microfluídicas. Para estos experimentos, se utilizaron los módulos de análisis basados en gotas para medir los biomarcadores de daño y función de los hepatocitos en los módulos de cultivo, al ser expuestos a un estímulo de palmitato como modelo de daño hepático. El palmitato es un ácido graso saturado lipotóxico que a altas concentraciones induce apoptosis en los hepatocitos al activar el receptor 2 del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R2 o receptor de muerte 5, DR5) [85].

Para estos experimentos, se sembraron los hepatocitos en los dispositivos y se mantuvieron con medio CH por tres días. Después, los esferoides de hepatocitos se cultivaron en presencia o ausencia de palmitato durante 4 días y se analizaron todos los días conectando los módulos de cultivo y análisis. En módulo de análisis se realizaron ensayos de forma secuencial mediante la generación de gotas con diferentes mezclas. En cada experimento, se analizó un pequeño volumen de medio condicionado proveniente de la cámara con los esferoides de hepatocitos para medir glucosa, LDH y ácidos biliares, además, se incluyeron gotas de control positivo y negativo para cada analito. Para formar las gotas de control positivo se mezcló una concentración conocida de cada analito para evaluar el funcionamiento de los reactivos y para las gotas de control negativo se empleó PBS para la sustracción del fondo y la normalización. Se generaron tres gotas para el medio condicionado por las células por cada analito y al igual tres gotas para cada control (Figura 4.19). Después de generar las 27 gotas, se detuvo el flujo en la serpentina para incubar y permitir que la señal óptica se generara en las gotas.

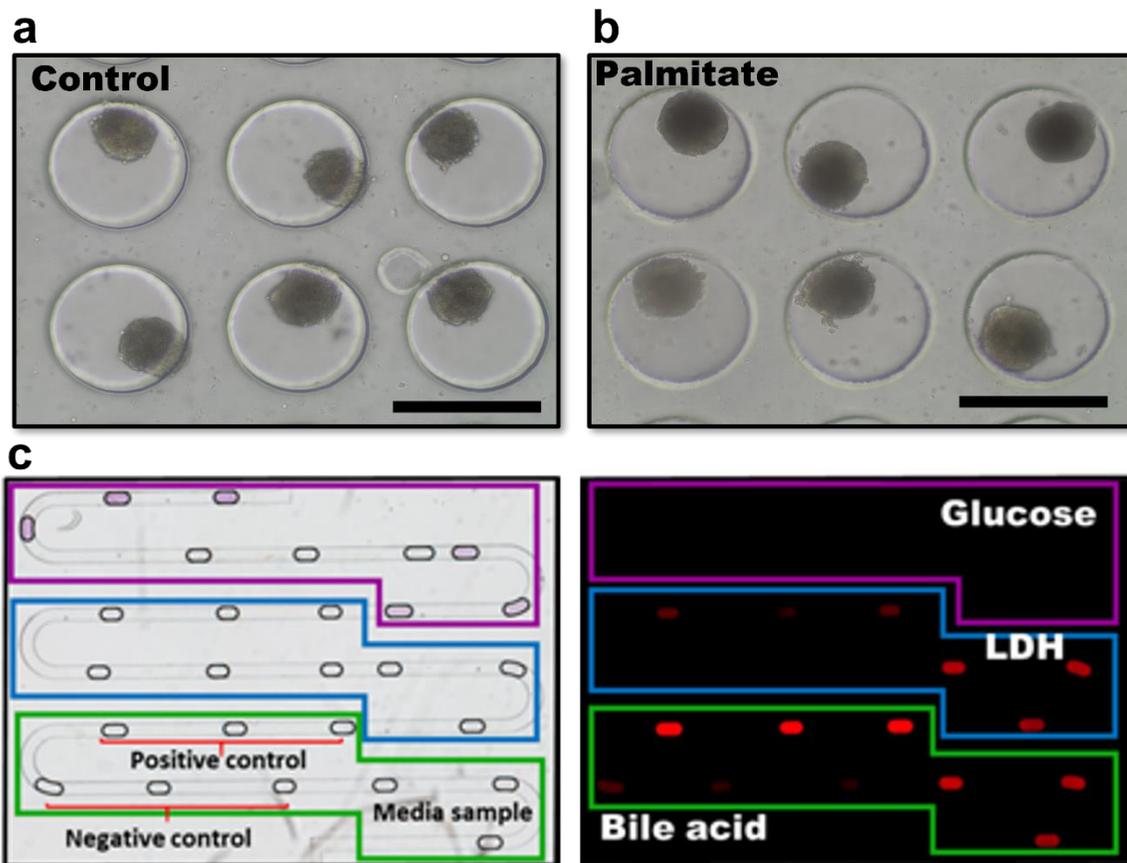


Figura 4.19. Experimento de daño hepático en los esferoides. Micrografías representativas de esferoides primarios de hepatocitos de rata formados en los dispositivos tras 3 días de incubación con (a) solo medio y (b) palmitato. Barra de escala: 250 μ m. (c) Micrografías representativas de los ensayos de metabolitos basados en gotas para el hepatocito con palmitato, se muestran las gotas del ensayo colorimétrico de glucosa y de los ensayos fluorescentes de LDH y ácidos biliares.

Los resultados de los experimentos de monitoreo del daño celular inducido por palmitato se muestran en la Figura 4.20. Se puede observar que, en ausencia de palmitato, no hay diferencia significativa en los niveles de glucosa y de ácidos biliares en los esferoides de hepatocitos. entre las primeras mediciones a las 24 horas y las últimas a 96 horas. Por otro lado, se observa que la producción de

LDH aumentó moderadamente en un 28% entre la primera y la última medición. Sin embargo, al comparar los esferoides de hepatocitos expuestos a 400 μ M de palmitato, mostraron mayor producción de LDH, llegando a ser 2 veces mayor a las 96 horas, en comparación al primer día. Por otra parte, también se observó menor síntesis de ácidos biliares, al comparar el primer día con el último, y la concentración de glucosa en el medio también fue mayor en el cuarto día. El aumento en los niveles de LDH fue debido al daño celular por la citotoxicidad del palmitato. También, la disminución de la síntesis de ácidos biliares podría atribuirse a una combinación de muerte celular hepática y pérdida de la función hepática. Los niveles más altos de glucosa en los cultivos de hepatocitos tratados con palmitato también podrían atribuirse a la muerte celular y a la disminución de la función de los hepatocitos, ya que hay menor consumo de glucosa en el día 4.

En general, los resultados obtenidos muestran que es posible detectar los cambios en los niveles de concentración de biomarcadores relacionados con el estado funcional de esferoides de hepatocitos. Es posible monitorear a lo largo de los días y de forma multiplexada, los niveles de hasta tres analitos en muestras de poco volumen, como las recolectadas de cámaras de cultivo microfluídico. Sin embargo, el sistema microfluídico no es adecuado para análisis de alta resolución temporal, ya que una vez que se comienza a inyectar medio para transportar las muestras, este se va diluyendo. Si se quisiera volver a muestrear, se tendría que retirar el tubo de conexión entre los módulos para evitar diluir o mezclar la muestra con el medio dentro del tubo, se tendría que reemplazar por un vacío, de forma manual, y realizar la nueva conexión en una campana de flujo. Por esta razón, un dispositivo integrado es adecuado para estudios con mayor resolución temporal.

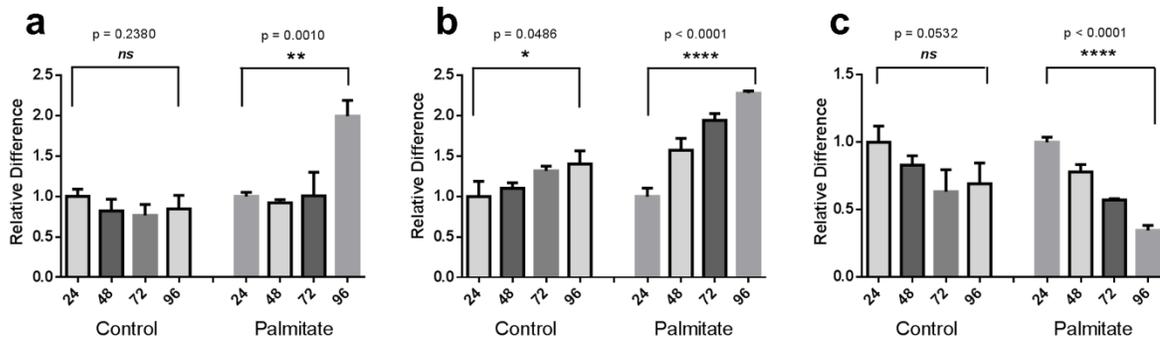


Figura 4.20. Graficas del monitoreo durante 96 h de los esferoides de hepatocitos como el modelo de daño hepático y el control, donde se midieron cada 24 horas glucosa (a), LDH (b) y ácido biliar (c).

4.1.2 Dispositivo integrado para cultivo y análisis de esferoides

Como se mencionó en la sección anterior, con un dispositivo integrado se evita la dilución de la muestra con el volumen muerto del tubo para conectar módulos. Además, se pueden tener estímulos dinámicos rápidos, ya que todo el sistema se conecta por microcanales permitiendo un rápido recambio de soluciones dentro de los dispositivos. Con un dispositivo integrado también se pueden realizar análisis temporales con mayor resolución y con todos los pasos de muestreo automatizados. Por esta razón, se diseñó un sistema microfluídico con el módulo de cultivo y de análisis basado en gotas integrado en una sola plataforma. El dispositivo integrado está formado por tres capas de PDMS, una capa de control, una de flujo y una de pozos. Al igual que el módulo de cultivo, el dispositivo tiene dos cilindros de vidrio que funcionan como reservorios para el medio y se usan para sembrar las células (Figura 4.21).

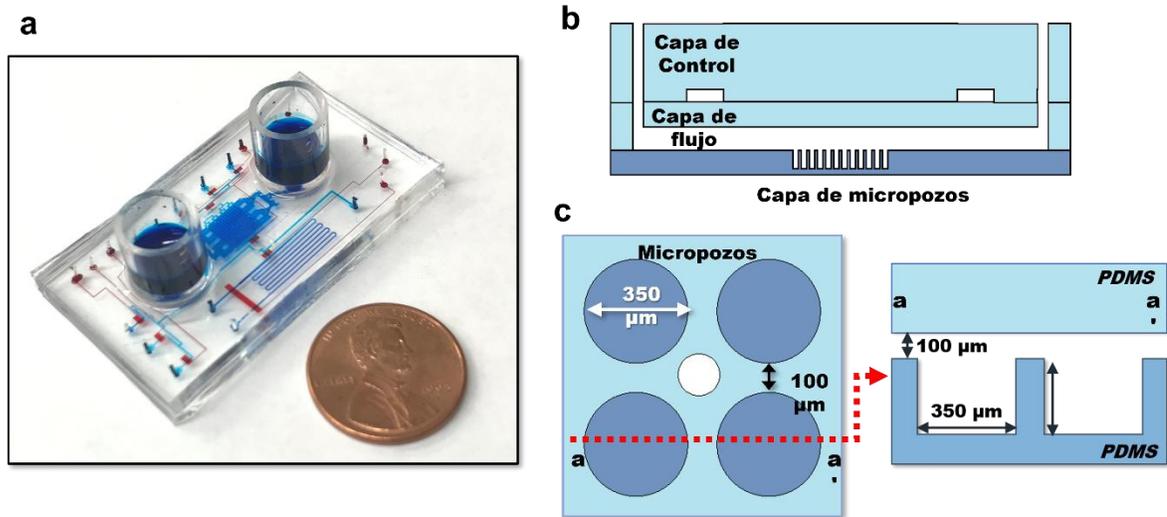


Figura 4.21. Dispositivo integrado para el cultivo y análisis de esferoides. (a) Fotografía del dispositivo con los canales de flujo y reservorios se llenaron con colorante azul y las líneas de control con colorante rojo. (b) Esquemáticos de una vista lateral con las tres capas, (c) una sección de la cámara con cuatro micropozos y vista lateral con las medidas de las estructuras.

4.1.2.1 Diseño del dispositivo.

El dispositivo integrado es una combinación entre el módulo de cultivo de esferoides y el módulo de detección basado en gotas (Figura 4.22). Este dispositivo está diseñado para permitir la formación, cultivo y análisis de esferoides. El diseño cuenta con tres capas, la de control, la de flujo y la de micropozos. La capa de control posee once líneas de control con microválvulas, cuatro son para bloquear o permitir el paso de medio a la cámara de cultivo. Otras dos válvulas están conectadas a la misma línea de control y sirven para aislar la cámara de las entradas y de la serpentina. En la parte inferior se tiene una válvula que permite separar la sección con aceite y para la formación de gotas, además tiene otra válvula para la salida de desechos. Se cuenta con otras tres válvulas para controlar la entrada de los reactivos y una última válvula para cerrar la salida de la serpentina. La capa de flujo está formada por una cámara de cultivo con

dos entradas para inyectar células, esta cámara de cultivo es igual y tiene las mismas dimensiones que la cámara diseñada en el módulo de cultivo de esferoides (sección 3.1.1.1). En la parte superior se tiene una red de canales con cuatro entradas para inyectar los medios con diferentes hormonas. En la parte inferior, se tiene otra red de canales que se ramifican hacia tres partes: a una salida de desechos, a las tres entradas de los reactivos y a la serpentina. Finalmente, se cuenta con la serpentina con su respectiva entrada y salida para inyectar el aceite, el cual solo entra a este canal. La red de canales superiores, inferiores y la serpentina tiene un ancho de 250 μm . La capa de pozos es usada para formar los esferoides y es igual a la del módulo de cultivo con un arreglo de 12 x 12 pozos y cada pozo tiene un diámetro de 350 μm .

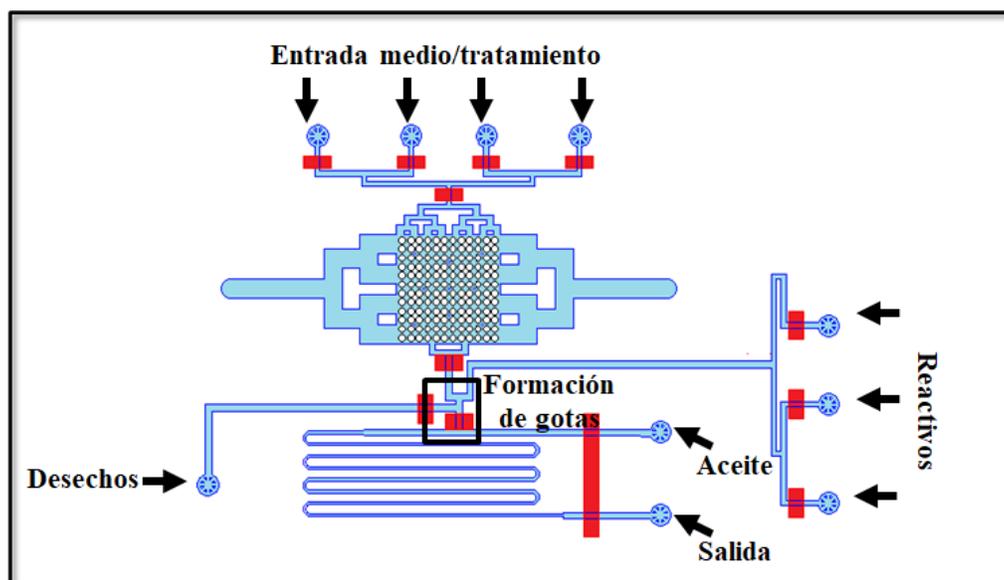


Figura 4.22. Diseño del dispositivo integrado para la formación, cultivo y análisis de esferoides. En azul se muestra la capa de flujo y en rojo las microválvulas.

Para fabricar el dispositivo integrado, se generaron tres fotomáscaras (Figura 4.23), una para la capa de control y dos para la capa de flujo. Debido a que las dimensiones de la cámara de cultivo y la capa de pozos es igual al diseño del módulo de cultivo de esferoides, se usó la misma máscara para la capa de

pozos. Las máscaras para la capa de control, la cámara de cultivo y la serpentina tiene las estructuras transparentes. La máscara restante de la capa de flujo tiene las estructuras oscuras, ya que esta tiene la red de canales para fabricarse con la resina positiva.

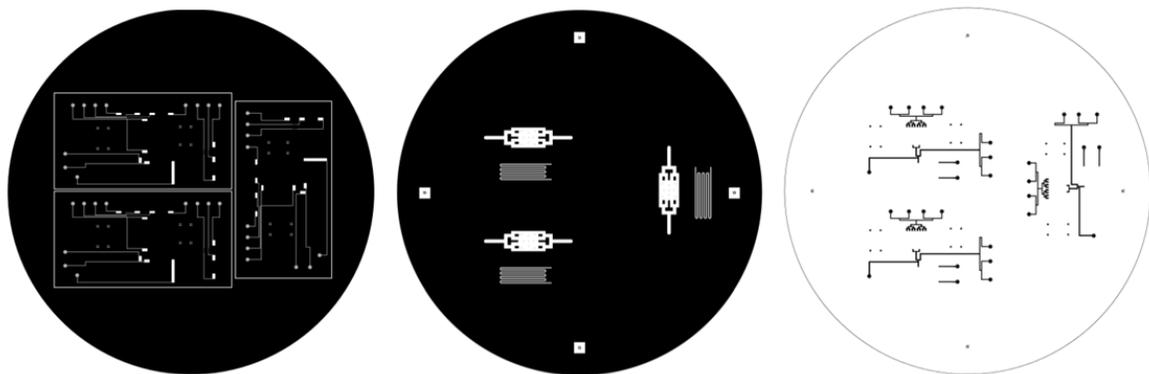


Figura 4.23. Diseño de las fotomáscaras para fabricar el dispositivo integrado.

4.1.2.2 Comparación de pozos con diferente profundidad.

En general, las dimensiones y las estructuras del dispositivo integrado son similares al módulo de cultivo. Por ejemplo, la capa de flujo tiene una cámara de cultivo de 100 μm de altura y la capa de pozos contiene un arreglo de 144 micropozos con diámetro de 350 μm . A pesar de que en el módulo de cultivo se formaron correctamente esferoides de hepatocitos, se mantuvieron en cultivo por tres semanas y fueron funcionales, se quiso analizar si la profundidad de los micropozos afectaba la función de los hepatocitos. Para este análisis, se fabricaron otras dos capas de pozos, donde en una capa los micropozos tenían una profundidad de 150 μm y otra capa con 225 μm . Estos experimentos surgieron porque se ha demostrado que el cultivo de hepatocitos (monocapa) confinados en cámaras de bajo volumen (1 μL) extienden el tiempo de vida y la funcionalidad de las células, en comparación con cultivos estándar [46]. Anteriormente, los micropozos tenían una profundidad de 500 μm (0.04 μL) para un volumen total con todos los pozos de 5.76 μL . Para los siguientes

experimentos se buscó disminuir el volumen, siendo 0.02 μL (2.88 μL en total) con los pozos de 225 μm y 0.01 μL para un total de 1.44 μL con los pozos de 150 μm . La metodología para sembrar las células fue la misma en todos los experimentos, se inyectó el mismo volumen y concentración de células a todos los dispositivos. Al analizar las imágenes tomadas con el microscopio óptico, el diámetro de los esferoides es similar (aproximadamente 163 μm) en los micropozos con diferente profundidad (Figura 4.24). Sin embargo, al determinar la cantidad de células en los esferoides formados en los diferentes micropozos se observa que el número de células por esferoide aumenta dependiendo de la profundidad. Para pozos con profundidad de 500 μm los esferoides tienen 2900 células, en los de 225 μm hay 1800 células y los esferoides en pozos de 150 μm tienen 630 células. Estos resultados, sugieren que los esferoides no tienen la misma altura en los diferentes tipos de pozo, por lo que para poder determinar la altura y forma de los esferoides es necesario tomar micrografías con un microscopio confocal.

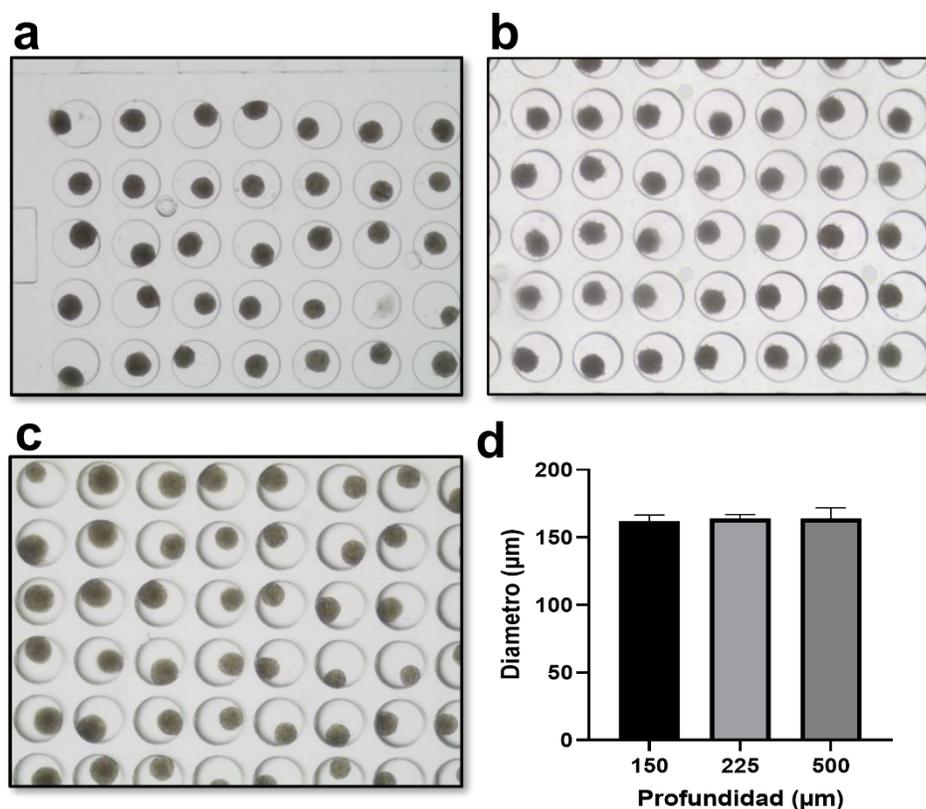


Figura 4.24. Micrografías de los esferoides de hepatocitos formados en pozos de 150 (a), 225 (b) y 500 (c) μm de profundidad. (d) Gráfica de los diámetros de los esferoides formados en los diferentes pozos.

Durante el cultivo de los esferoides, se cambió el medio cada 24 horas en los dispositivos con micropozos de 150 y 225 μm, además se monitorearon tomando micrografías. En la figura 4.25 se muestran las micrografías de esferoides formados en los micropozos con profundidad de 150 μm. En estos micropozos, gran parte de los esferoides se adherieron a la superficie al día 9, incluso se observa en la Figura 4.25 que un esferoide se adhirió desde el día 3. También se destaca que después de adherirse, se fusiona con esferoides contiguos para después volver a adquirir una estructura 3D y formar esferoides grandes y no uniformes, como se observa en el día 15 y 21. Se tomaron

micrografías representativas en contraste de fase de los esferoides adheriéndose y fusionándose en los pozos de 150 μm (Figura 4.26).

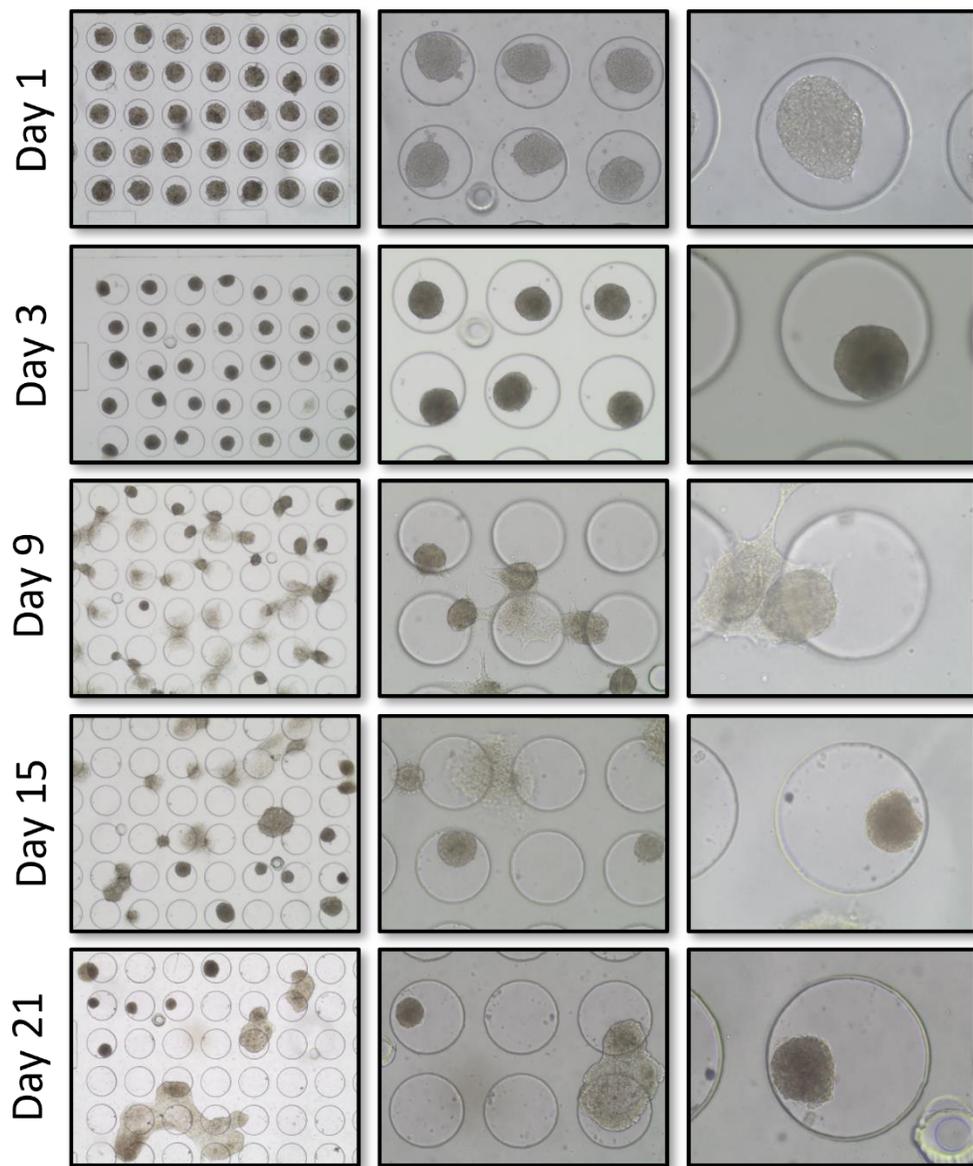


Figura 4.25. Micrografías de los esferoides de hepatocitos formados y cultivados por 21 días en los micropozos de 150 μm de profundidad.

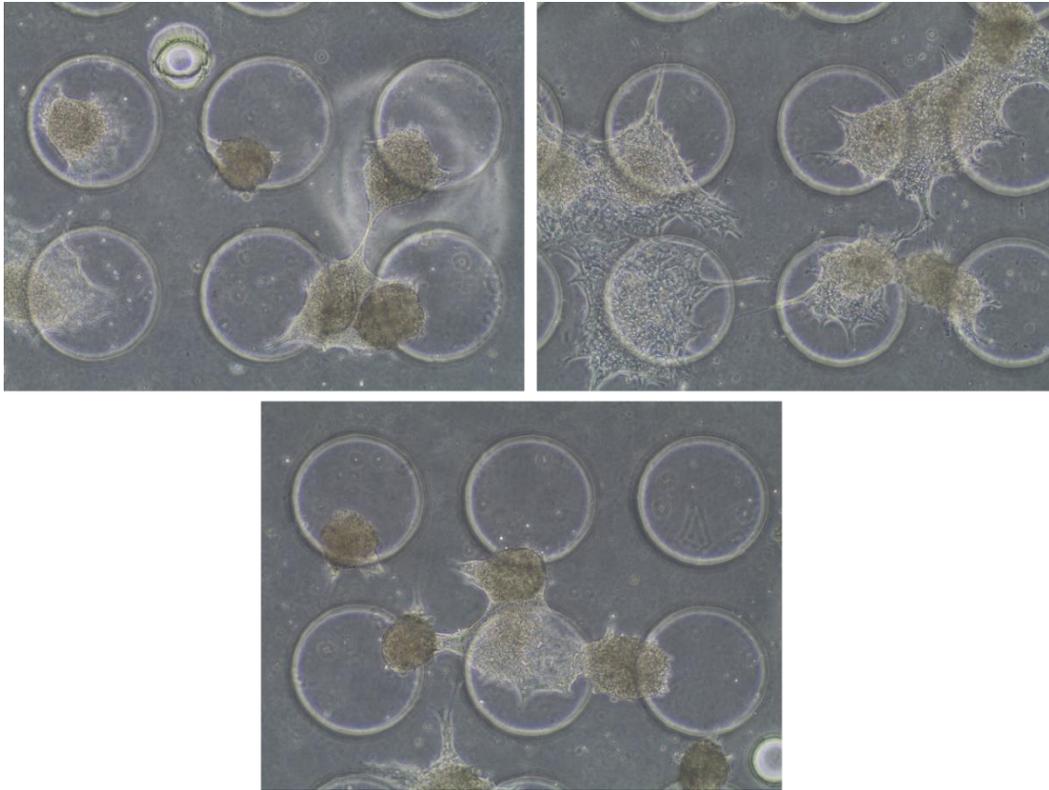


Figura 4.26. Micrografías tomadas en contraste de fase de los esferoides de hepatocitos fusionándose al día 9 en los pozos de 150 µm de profundidad.

Al igual que los dispositivos con pozos de 150 µm, también se adquirieron micrografías a lo largo de 21 días de los esferoides formados en los micropozos de 225 µm (Figura 4.27). Se observa que a partir del día 15, algunos esferoides se empiezan a adherir a la superficie y después también se fusionan. Sin embargo, en comparación con los pozos de 150 µm, los esferoides formados en los pozos de 225 µm duran más tiempo uniformes, sin adherirse y fusionarse. Por otra parte, los esferoides en pozos de 500 µm no se observaron que se fusionaran durante los 21 días en cultivo, aunque algunos si se adhirieron a la pared de los pozos (ver Figura 4.7). Es probable que tarden más en fusionarse los esferoides en pozos más profundos debido a la distancia que deben recorrer entre los pozos. Por otra parte, posiblemente los esferoides se estén adhiriendo en la superficie del PDMS porque se fue perdiendo el tratamiento con plurónico. También puede

ser que se estén desdiferenciando, lo cual es común cuando se cultivan de forma estándar en monocapa, ya que a las 72 horas pierden sus características fenotípicas distintivas. Sin embargo, para poder concluir esto, es necesario realizar estudios más profundos como análisis de la actividad del complejo enzimático citocromo P 450 (CYP450), realizar mediciones de albúmina y urea secretada, etc.

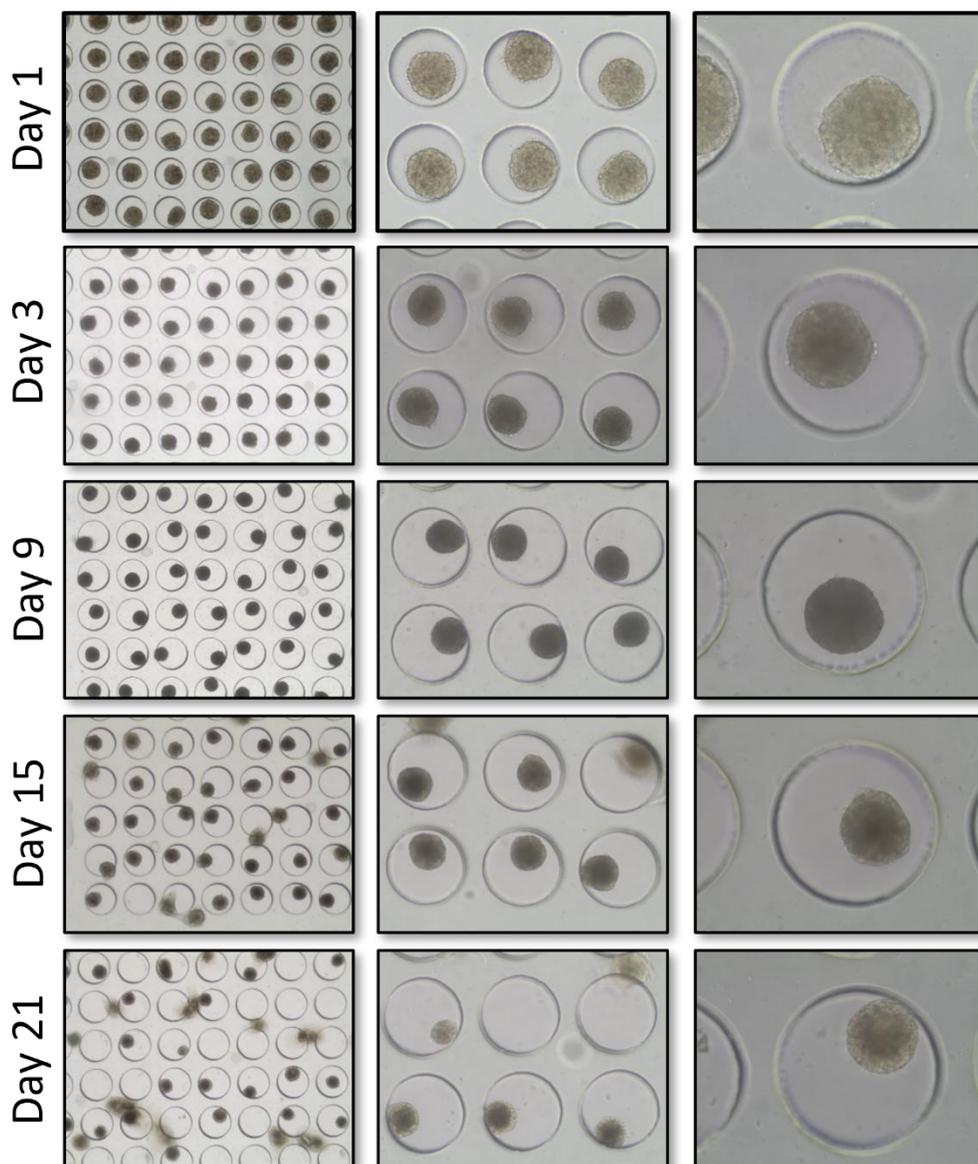


Figura 4.27. Micrografías de los esferoides de hepatocitos formados y cultivados por 21 días en los micropozos de 225 μm de profundidad.

En estos experimentos solo se analizó la secreción de albúmina como marcador de funcionalidad. En la figura 4.28 se muestran los resultados de la secreción de albúmina de los esferoides en los pozos con profundidad de 150 y 225 μm y en la figura 4.8 se mostraron los resultados para los esferoides en los pozos de 500 μm . A pesar de que en los pozos de menor profundidad los hepatocitos secretaron más albúmina entre los días 9 y 15, la secreción fue más uniforme a lo largo del tiempo en los pozos con profundidad de 225 μm y fue mayor en comparación con los pozos de 500 μm . Por esta razón se decidió realizar los siguientes experimentos usando los dispositivos con pozos de 225 μm de profundidad. Además, también se emplearon los pozos de 225 μm porque se pueden mantener por más tiempo esferoides uniformes dentro de los micropozos.

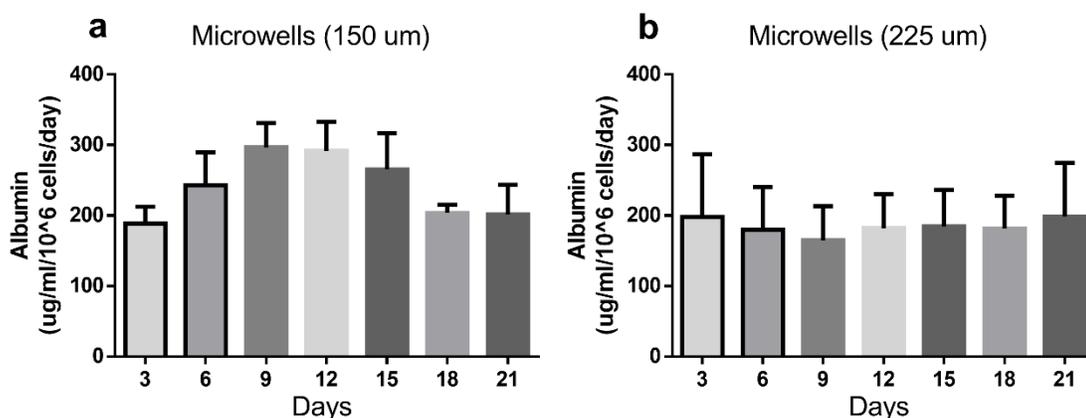


Figura 4.28. Graficas con los resultados de la secreción de albúmina por los esferoides de hepatocitos sembrados en el dispositivo con pozos de 150 (a) y 225 (b) μm de profundidad.

4.1.2.3 Caracterización del dispositivo integrado

En los siguientes experimentos se analizó el tiempo en el que se tarda recambiar las soluciones dentro de las cámaras de cultivo usando los dispositivos con pozos de 225 μm . Para este experimento, primero se inyectó el colorante

azul por 30 minutos y después el colorante amarillo otros 30 minutos, se realizaron dos ciclos por colorante para un total de 2 horas. Como se muestra en la Figura 4.29, el recambio de las soluciones es rápido, alcanzando una meseta desde que se perfunde la nueva solución en 4.5 minutos. Estos resultados nos indican que es posible realizar diferentes estímulos dinámicos dentro de la cámara de cultivo. Para los siguientes experimentos se fijó un tiempo de estímulo o lavado de la cámara de 5 minutos.

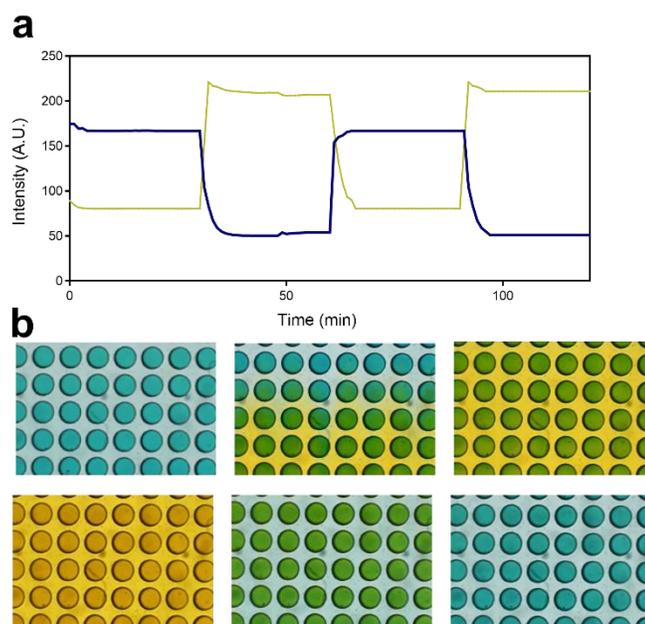


Figura 4.29. Experimento de recambio de las soluciones en la cámara de cultivo. (a) Gráfica de la intensidad de color azul y amarillo al inyectar los colorantes de forma ciclada. (b) Micrografías representativas del cambio de las soluciones en los pozos.

Después de determinar el tiempo de recambio de soluciones en la cámara de cultivo, se caracterizó el ensayo de glucosa en la zona de análisis usando gotas. Se realizó la curva de calibración para la detección de diferentes concentraciones de glucosa (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3 y 12.5 mM). En la Figura

4.30 se esquematizan las entradas usadas para inyectar los reactivos durante estos experimentos.

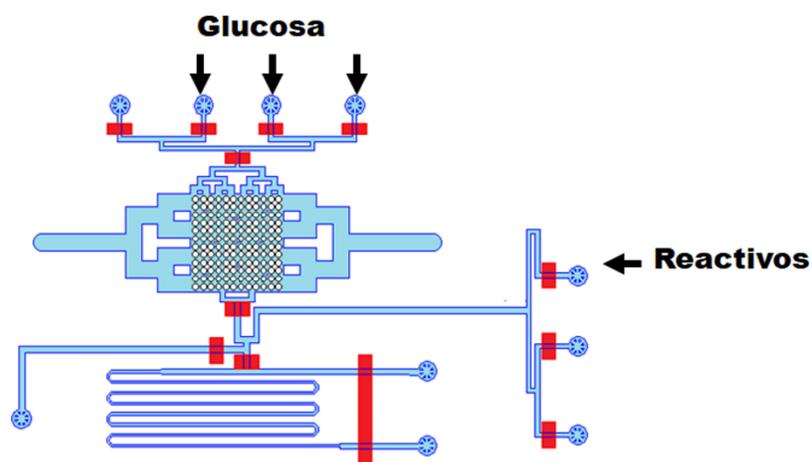


Figura 4.30. Esquema donde se muestra la configuración de las entradas del dispositivo integrado para realizar las curvas de calibración.

Debido a que el dispositivo tiene solo tres entradas para perfundir soluciones, primero se inyectaron las tres concentraciones altas, después las medias y al final las tres concentraciones más bajas.. Después de mezclar las muestras de glucosa con los reactivos, las gotas formadas se incubaron en la serpentina durante 15 minutos para la obtención del color. Como se observa en la Figura 4.31, las gotas presentan un color magenta y la señal es proporcional a la concentración de glucosa. El límite de detección calculado para el ensayo fue de $1.4 \mu\text{M}$ con un rango lineal hasta los 12.5 mM .

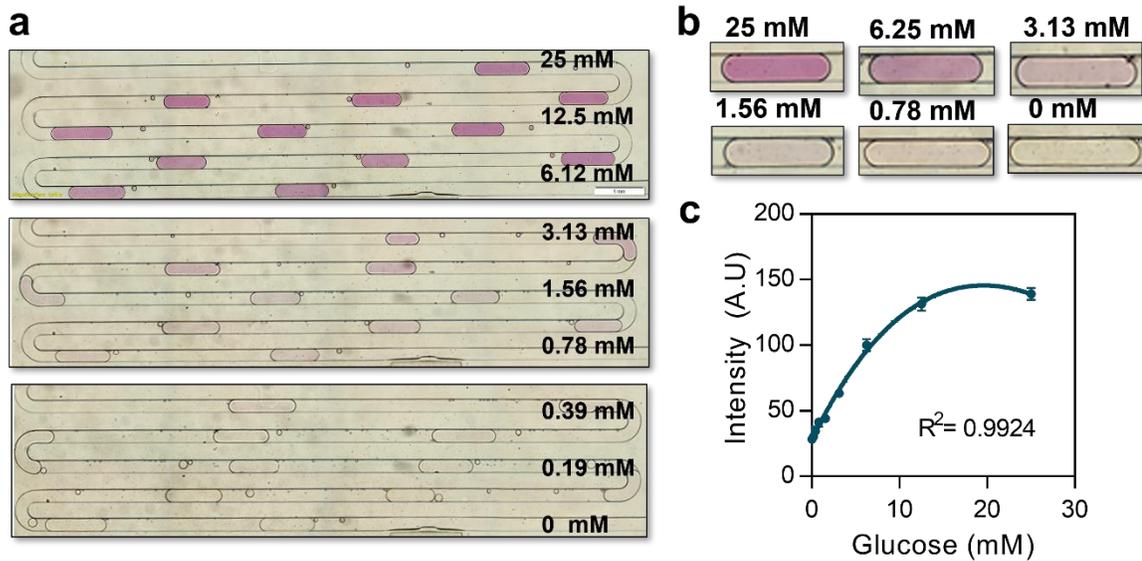


Figura 4.31. Curva de calibración del ensayo colorimétrico para la detección de glucosa en el dispositivo integrado. (a) Micrografías de las gotas en la serpentina, las cuales tienen diferentes concentraciones de glucosa. (b) Micrografías ampliadas de gotas representativas. (c) Curva de calibración para el ensayo de glucosa.

4.1.2.4 Estimulación dinámica con insulina/glucagón

Para demostrar la utilidad del dispositivo integrado con el módulo de cultivo y de análisis basado en gotas, se realizaron experimentos para monitorear la respuesta de los esferoides de hepatocitos en condiciones de estimulación dinámica. En estos experimentos se usó insulina y glucagón para estimular a los hepatocitos y medir los cambios de concentración de glucosa en el medio. La insulina es una hormona sintetizada y secretada por las células beta en los islotes de Langerhans del páncreas [86]. La función de la insulina es permitir la incorporación de la glucosa en la sangre a las células. En el hígado, la insulina incrementa la síntesis de glucógeno, por lo que consumen más glucosa y además suprime la gluconeogénesis hepática [24]. Por otra parte, de manera fisiológica

cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, las células alfa del páncreas producen la hormona glucagón [87]. Esta hormona estimula la producción de glucosa hepática, al promover la degradación de glucógeno en glucosa y activar la gluconeogénesis en los hepatocitos [44]. Se han realizado estudios de estimulación dinámica con estas hormonas para medir los cambios en glucosa en el hígado[88]. Ahora, usando el dispositivo integrado se realizó la estimulación dinámica con hormonas en los esferoides de hepatocitos para mimetizar el ambiente fisiológico. Para los experimentos se expusieron a los esferoides de hepatocitos con medio suplementado ya sea con insulina o glucagón, se alternaron los estímulos con intervalos de 25 minutos durante un total de 200 minutos o 240 minutos, considerando los tiempos de recambio de los estímulos. Cabe mencionar que el tiempo de recambio de cada medio se configuró a 5 minutos y el tiempo de incubación se determinó experimentalmente a 25 minutos.

El consumo de glucosa de los hepatocitos aumentó en presencia de insulina y disminuyó en presencia de glucagón. Ya que como se observa en la Figura 4.32, los niveles de glucosa en el medio condicionado por las células cuando se incubaron con insulina fueron menor y aumentó glucosa con glucagón. Sin embargo, después de dos ciclos, los niveles de glucosa en el medio disminuyeron, tanto al incubar con insulina o con glucagón. Para concluir por qué disminuye la concentración de glucosa, es necesario realizar algunos controles, ya que se puede deber a diferentes razones. Una razón puede ser la disminución de la actividad de las enzimas en las soluciones para la detección de glucosa a partir de las dos horas de su preparación. Para concluir esto, se debe realizar un control donde se perfunda medio, intercambiando alta y baja concentración de glucosa durante los 240 minutos. Otra posible razón son problemas con la estabilidad de las gotas, en los experimentos se usó un aceite perfluorado, HFE 7500, con 1% de surfactante. El aceite HEF 7500 es recomendado en microfluídica basada en gotas para aplicaciones como el encapsulamiento de células, junto con 1 a 3% de surfactante [89]. Por lo que otro posible control, es aumentar la concentración de surfactante, especialmente porque los hepatocitos

secretan moléculas anfipáticas, las cuales pueden encontrarse en una concentración alta, ya que la dilución es mínima al estar la cámara conectada con el módulo de gotas directamente. Por otra parte, antes de realizar los experimentos, los dispositivos se mantienen en la incubadora por tres días para permitir la formación de los esteroides y durante este tiempo las válvulas están desconectadas. Esto provoca que el medio de cultivo entre a todos los canales, incluyendo la serpentina donde se almacenan las gotas. A pesar de que antes del experimento se seca el canal y se trata con Aquapel, es posible que la superficie no sea completamente hidrofóbica, por lo que un control que se tendría que realizar es mantener los dispositivos en la incubadora, conectando la válvula que separa las dos secciones para evitar que se mojen los canales donde se forman y almacenan las gotas. Sin embargo, durante los primeros dos ciclos se obtuvieron los resultados esperados y esto sugiere que puede ser posible usar la plataforma microfluídica desarrollada para imitar entornos fisiológicos del hígado y para monitorizar la dinámica metabólica.

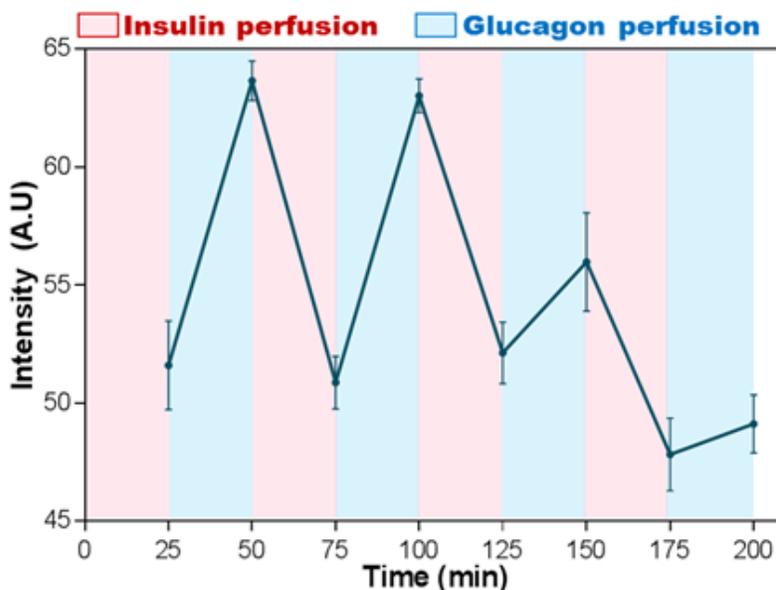


Figura 4.32. Gráfica del monitoreo de los cambios de señal en ensayo de glucosa cuando los esferoides de hepatocitos fueron perfundidos de forma cíclica con insulina y glucagón.

4.2 Sistema microfluídico para el análisis de células individuales

El sistema microfluídico para el análisis de células individuales tiene la capacidad de capturar células para aislarlas junto con microperlas, las cuales están funcionalizadas con anticuerpos para realizar inmunoensayos y detectar proteínas secretadas por las células (Figura 4.33a). Con la finalidad de llegar a poder analizar la heterogeneidad de las células que forman los esferoides de hepatocitos y determinar si mimetizan la zonación hepática. En esta sección, se caracterizó la plataforma microfluídica y se realizaron ensayos de concepto con monocitos aislados de sangre periférica. Se usaron monocitos porque son células primarias de fácil disponibilidad, y en un futuro, el objetivo es usar células primarias (hepatocitos) para analizar la heterogeneidad secretora debida a gradientes de oxígeno.

4.2.1 Características del dispositivo.

El dispositivo microfluídico para el análisis de células individuales emplea trampas hidrodinámicas y válvulas neumáticas. Las trampas hidrodinámicas microfluídicas permiten la manipulación y captura de partículas o células en áreas específicas con tan solo la acción del flujo fluido [90]. Por otro lado, con las microválvulas neumáticas se pueden automatizar ensayos, controlar el flujo de las soluciones dentro de los dispositivos y formar compartimentos aislados para ensayos en paralelo[91,92]. Por lo tanto, el dispositivo desarrollado integra las dos técnicas para aprovechar sus ventajas, ya que usa las trampas hidrodinámicas para capturar microperlas/células y válvulas neumáticas para aislar las cámaras y controlar el flujo de las soluciones/suspensiones. El dispositivo es multicapa, ya que cuenta con capa de control con las microválvulas y una capa de flujo con los microcanales y las trampas. En la Figura 4.33b, se observa una fotografía del dispositivo con los canales de control llenos de

colorante rojo, mientras que los canales de flujo de colorante azul. El dispositivo tiene grupos con tres canales paralelos conectados por medio de canales estrechos, los cuales están localizados junto a las trampas en los bordes del canal central (Figura 4.33a y c). Para poder capturar selectivamente las células y las perlas en las trampas del lado deseado, se emplean las tres válvulas sobre los tres canales de flujo. Por ejemplo, al activar las dos válvulas de los canales laterales (Figura 4.33d), las células, perlas y soluciones solo pasan por el canal central. Sin embargo, cuando se desactiva una válvula sobre algún canal lateral, las soluciones pasan por el canal lateral abierto y por el canal central (Figura 4.33e). En esta condición, células o las perlas no pasan hacia el canal lateral debido a que el canal estrecho que conecta los canales es de $3\ \mu\text{m}$, funcionando como un filtro para que solo pasen las soluciones o partículas de menor tamaño.

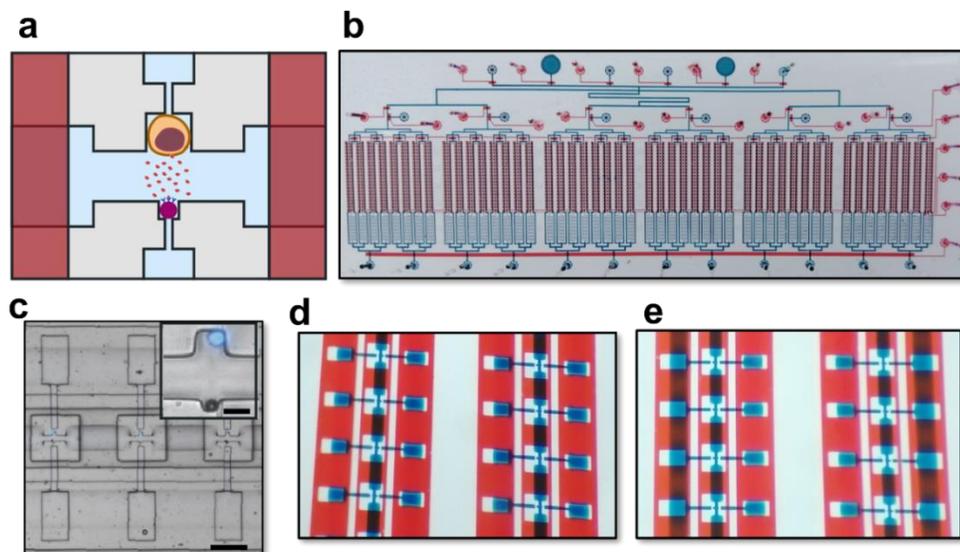


Figura 4.33. Dispositivo microfluídico para el análisis de células individuales. (a) Esquemático de una célula y una microperla funcionalizada con anticuerpos son capturadas y aisladas en una microcámara. (b) Fotografía del dispositivo con los canales de flujo llenos con colorante azul y las líneas de control con rojo. (c) Micrografía representativa con tres cámaras con células y perlas inmobilizadas. Barras de escala=150 y $20\ \mu\text{m}$. (d) Canales laterales bloqueados al activar las válvulas. (e) Canal central y canal lateral abiertos para capturar células.

4.2.2 Diseño del dispositivo.

El sistema microfluídico para el análisis de células individuales está diseñado para la captura de células individuales y de microperlas, las cuales serán usadas para la detección de proteínas. El diseño cuenta con microcanales con trampas hidrodinámicas, además tiene microválvulas para el control del flujo y para el aislamiento de las células (Figura 3.34). El dispositivo consta de una capa de control con las microválvulas y una capa de flujo con los microcanales y las trampas hidrodinámicas. En la capa de flujo hay dos entradas para células y microperlas, las cuales cuentan con filtros para evitar agregados de células y microperlas en los canales. Además, tiene tres entradas para inyectar medio, buffer y anticuerpos de detección, así como una salida para la purga de las soluciones y suspensiones. El dispositivo microfluídico está dividido en seis secciones y cada una tiene una entrada independiente para introducir estímulos diferentes. Además, cada una de las seis secciones se ramifica en ocho canales centrales con 21 trampas hidrodinámicas de cada lado del canal para capturar células de un lado y perlas del otro (para un total de 1008 pares de trampas). Cada trampa está conectada a un canal lateral por medio de un canal estrecho de $3 \times 3 \mu\text{m}$. Los canales estrechos ayudan a capturar células y microperlas en las trampas y que no pasen a los canales laterales. Al final de cada canal central hay una serpentina para aumentar la resistencia hidrodinámica de los canales centrales y en cada sección los canales centrales se bifurcan en dos salidas.

El dispositivo tiene un total de 23 líneas de control con microválvulas para aislar y evitar la contaminación cruzada de las microcámaras, para controlar el flujo fluido y seleccionar la solución que se desea inyectar. Seis líneas de control tienen microválvulas que están sobre las entradas de soluciones, células y perlas. Otras seis válvulas sirven para bloquear o permitir el paso de soluciones a cada sección del dispositivo, además cada sección tiene una válvula para controlar la entrada de los estímulos. También hay una válvula para bloquear las salidas y otra para controlar el paso de soluciones a un canal lateral. Finalmente, el

dispositivo cuenta con tres líneas de control estratégicas, dos para bloquear o abrir los canales laterales y controlar hacia dónde se dirigen las células o perlas y otra sobre el canal central para aislar las cámaras.

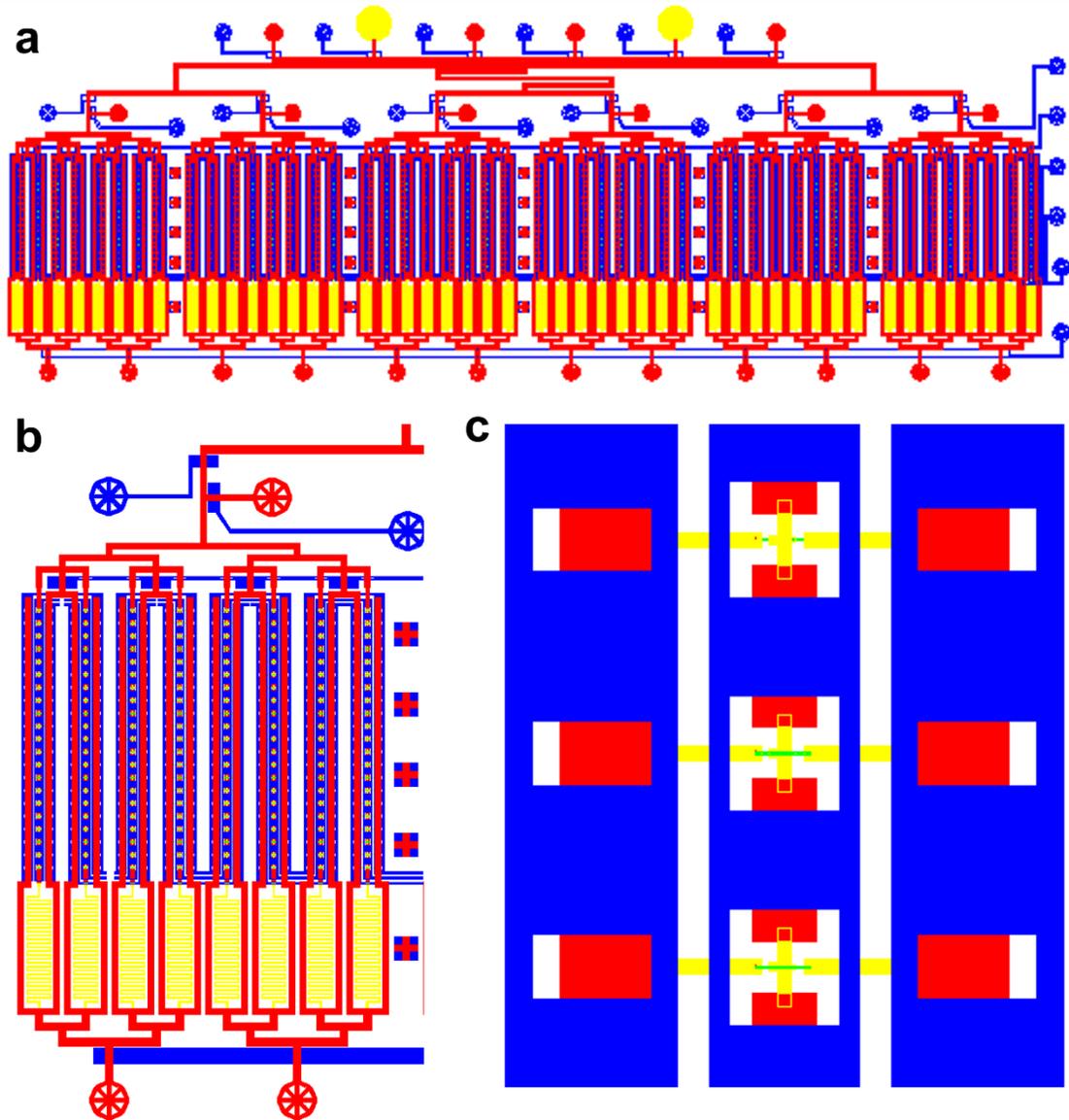


Figura 3.34. (a) Diseño del dispositivo completo mostrando los canales de la capa de control (azul) y la capa de flujo con los canales fabricados con resina positiva (rojo) y con resina negativa (amarillo). (b) Acercamiento de una de las seis secciones del dispositivo formado por los tres canales paralelos ramificados en ocho partes. (c) Área del diseño donde se muestran los tres canales paralelos con trampas y el canal estrecho (verde).

4.2.3 Caracterización de la ocupación de las trampas.

Se caracterizó la ocupación de las trampas usando diferentes flujos volumétricos, donde la ocupación se define como el porcentaje de trampas que fueron ocupadas por células o microperlas. Primero, se determinó experimentalmente el flujo volumétrico a través de cada sección del dispositivo. Para estos experimentos se inyectaron colorantes por la entrada de medio usando diferentes presiones (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 psi) y se midió el volumen desplazado en el tubo conectado a la salida después de cada minuto. Se observó una dependencia lineal entre las presiones aplicadas y los flujos volumétricos que iban de 0 a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figura 4.35a). En los siguientes experimentos se cuantificó el porcentaje de trampas ocupadas por las células a lo largo del tiempo usando tres flujos volumétricos: alto (2 $\mu\text{L}/\text{min}$), moderado (1 $\mu\text{L}/\text{min}$) y bajo (0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$). En estos experimentos se usó una línea celular derivada de humanos de leucemia linfoblástica aguda pre-B (NALM-6), las cuales son células pequeñas y redondas con 10 μm de diámetro en suspensión [93]. Con las tres condiciones se alcanza una meseta rápidamente y a los 10 minutos ya se ocupó el máximo de las trampas (Figura 4.35b). Además, se obtuvieron ocupaciones de 93.8%, 82.5% y 73.2% para los flujos volumétricos de 0,5, 1 y 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente. A pesar de que el porcentaje de trampas ocupadas es mayor al usar 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, en los siguientes experimentos se usó 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, ya que se observó que, con el caudal más alto, algunas células se deformaron y parte de ellas entraron al canal estrecho. Los resultados coinciden con otros estudios en los que han informado que un flujo moderado es el ideal para capturar células individuales en trampas hidrodinámicas, ya que flujos mayores conllevan a la deformación de las células [94,95]. También se evaluó la ocupación de las trampas por las perlas cuando ya se habían capturado las células primero. Al igual que con las células, para inyectar las perlas se usaron los tres flujos volumétricos (0.5, 1, 2 $\mu\text{L}/\text{min}$) durante un máximo de 25 s. Las microperlas se capturaron en menos de 25 s, alcanzando el 93.2% usando 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, 88% para 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y al 80% para 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figura 4.35c).

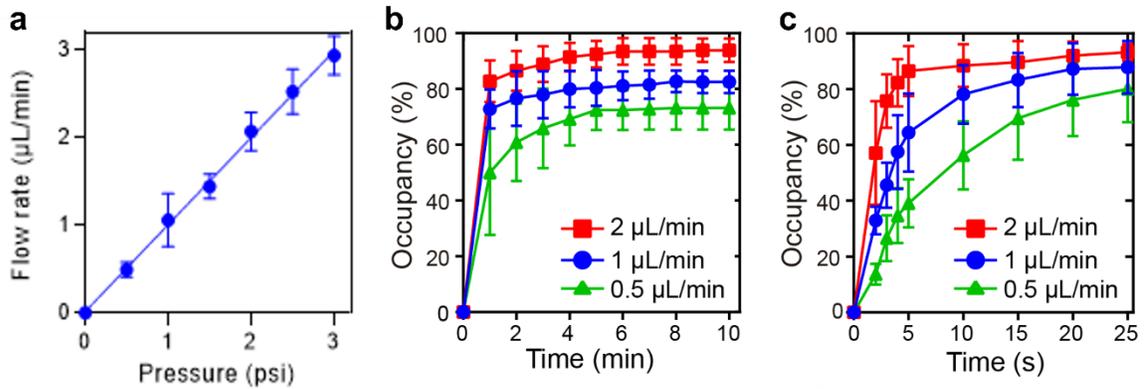


Figura 4.35. Caracterización de la ocupación de las trampas con células o perlas. a) Gráfica de presión contra flujo volumétrico en el dispositivo. (a) Caracterización del atrapamiento de células individuales. b) Caracterización de la captura de perlas.

Debido a la rigidez de las perlas, estas no bloquean completamente al canal estrecho, por lo que el fluido puede seguir pasando, lo que hace que en algunas trampas se capturen más de una microperla. Por lo tanto, se cuantificó el número de perlas por trampa para cada condición y tiempo (Figura 4.36a, b, c). Se observó que el aumento del tiempo de captura y del flujo volumétrico provoca un mayor número de perlas capturadas por trampa, llegando a capturarse en su mayoría 4 y 5 perlas por trampa a los 25 s con 1 y 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Usando los datos de los experimentos anteriores, se cuantificó el número de trampas ocupadas por una célula con 1, 2 o hasta 3 perlas atrapadas para los diferentes flujos volumétricos y tiempos de atrapamiento (Figura 4.36d y e). La mayor ocupación de células y perlas para los tres caudales fue de 42 % con 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 10 s, 45 % con 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 20 s y 56 % con 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 3 s. Con este dispositivo microfluídico se obtienen mayores emparejamientos de células/perlas en comparación con otros sistemas como la captura en gotas o microcámaras, ya que en esos sistemas se obtiene 19-27% y 37%, respectivamente [59–61]. Incluso podría ser que la ocupación del dispositivo sea

mayor al 56 % si se cuantifican las trampas con más perlas, sin embargo, es necesario realizar experimentos para determinar si la sensibilidad disminuye al tener más perlas. Se ha reportado, mediante un modelo numérico, que no hay diferencia significativa en la unión de citocinas a las perlas cuando hay una, dos o tres perlas aisladas en las cámaras [61]. Por esta razón, se cuantificaron las trampas con hasta tres perlas y se usaron estos parámetros en los siguientes experimentos.

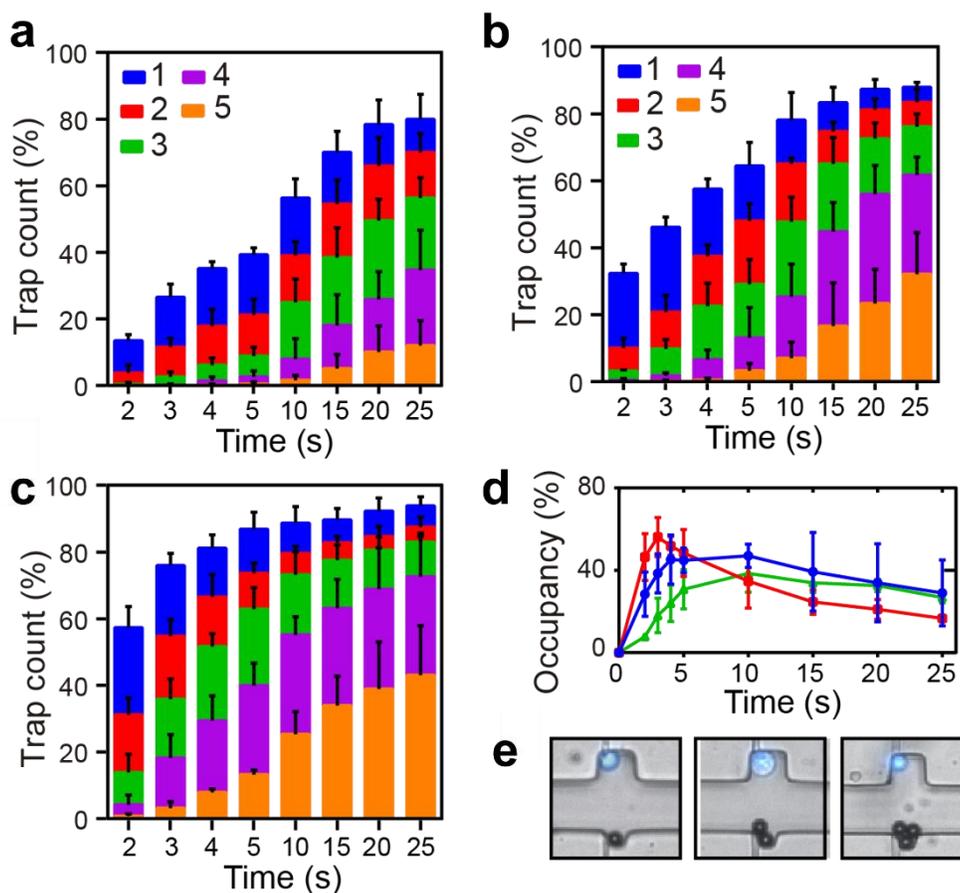


Figura 4.36. Gráficos del aumento del porcentaje de trampas ocupadas por perlas para tres flujos volumétricos: 0.5 (a), 1 (b) y 2 (c) $\mu\text{L}/\text{min}$. (d) Porcentaje de cámaras ocupadas con una sola célula y una, dos o tres perlas para los tres caudales: 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (rojo), 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ (azul), o 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (verde). e) Micrografías representativas de una célula con una, dos y tres perlas.

4.2.4 Curva de calibración contra IL-8 usando las perlas

Se han desarrollado otros sistemas microfluídicos como las gotas [59,60], los micropozos [96] o cámaras aisladas [61] para medir proteínas secretadas por células individuales, pero no permiten cambiar el medio después de aislar a las células. Una de las ventajas del dispositivo para el análisis de células individuales con trampas y válvulas es que se puede recambiar la solución después de capturar células/perlas y aislar las cámaras. Esta ventaja permite, por ejemplo, inyectar los anticuerpos de detección después de incubar las proteínas durante las curvas de calibración. Para realizar esto, se perfunde la solución nueva a través de uno de los canales laterales, luego, se activan las válvulas y se deja que se difundan desde el canal lateral hacia las microcámaras a través del canal estrecho (Figura 4.37). Debido a que las perlas pueden bloquear las trampas y aumentar el tiempo de difusión, se caracterizó el proceso de difusión cuando se atrapan 1, 2 o 3 perlas. Como se muestra en la Figura 4.38a, las perlas no afectan la difusión entre el canal lateral y las cámaras.

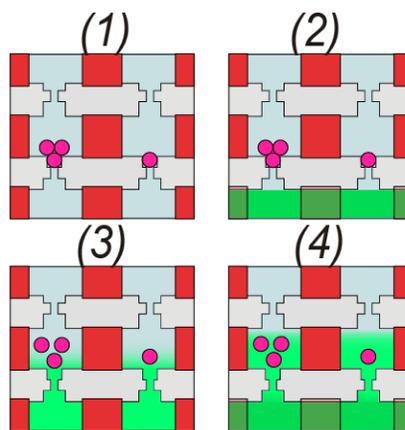


Figura 4.37. Esquema del protocolo para el recambio de soluciones dentro de las microcámaras. 1) Primero se capturan y aíslan las perlas. 2) Se inyecta la solución por el canal lateral conectado a las trampas para las perlas. 3) Se cierran las válvulas del canal lateral. 4) Se vuelve a perfundir la solución y se repite el proceso.

Después, se realizaron inmunoensayos fluorescentes tipo sándwich en las perlas aisladas en las microcámaras. Las curvas de calibración se realizaron contra interleucina 8 (IL-8), la cual es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por monocitos y macrófagos [97]. Para estos experimentos, se capturaron microperlas modificadas con anti-IL-8 en las trampas. Enseguida, se inyectaron por el canal central concentraciones conocidas de IL-8 recombinante que iban entre 0 y 12,5 ng/mL y se incubó durante 1.5 h. Después, usando los canales laterales, se perfundieron los anticuerpos de detección marcados con ficoeritrina y se empleó el protocolo descrito para que difundiesen a las cámaras. Como se observa en la Figura 4.38b y c, las intensidades de la fluorescencia son proporcionales a la concentración de proteína con coeficientes de determinación de $R^2=0.91$, $R^2=0.95$ y $R^2=0.95$ para cada número de perlas por cámara y el LOD fue de 9 pg/mL.

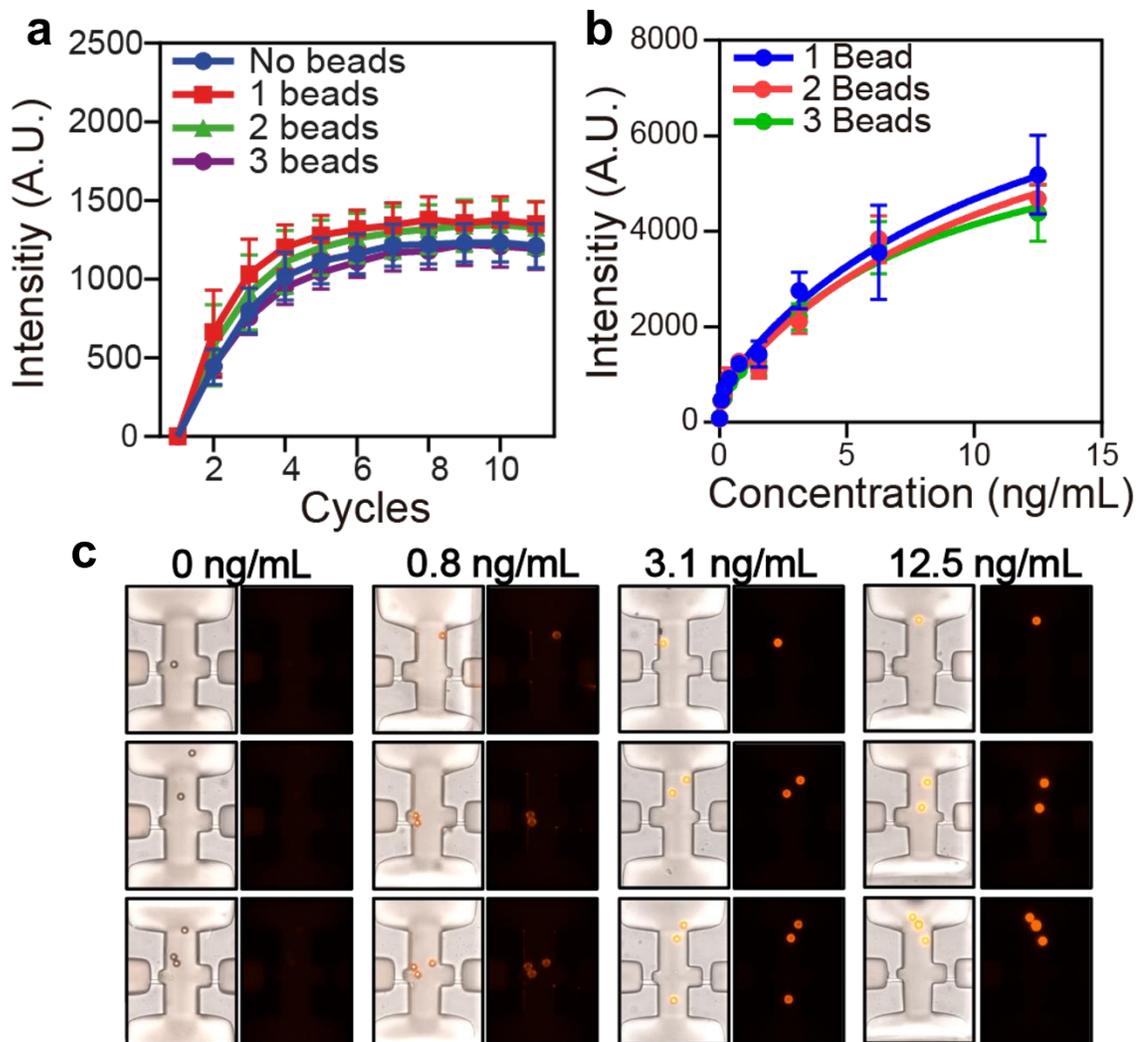


Figura 4.38. Caracterización del intercambio de soluciones y curva de calibración. (a) Gráfica donde se muestran cuando se llenan las cámaras con FITC después de reemplazar el medio en la cámara usando múltiples ciclos de inyección y cuando se capturan diferente número de perlas por trampa. (b) Curva de calibración de IL-8 para diferentes números de perlas por microcámara. (c) Micrografías representativas de perlas en las cámaras diferentes concentraciones de IL-8.

4.2.5 Detección de citocinas secretadas por células individuales

Se realizaron ensayos de secreción de IL-8 en monocitos aislados de sangre periférica y tratados con diferentes concentraciones de lipopolisacárido (LPS). La endotoxina LPS es un componente de la pared celular de las bacterias gram negativas. El LPS es un potente activador de células como monocitos y macrófagos provocando una respuesta inflamatoria y desencadenando la secreción de citocinas/quimiocinas proinflamatorias [98]. Por otra parte, IL-8 es una quimiocina proinflamatoria quimio-atrayente de neutrófilos y es secretada mayormente por macrófagos y monocitos [99,100]. Por lo tanto, para probar la capacidad del dispositivo para analizar células individuales se usó este modelo de inflamación/activación de monocitos para medir la secreción de IL-8. Primero, se analizó la respuesta secretora de monocitos individuales capturándolos en las trampas, en tres secciones del dispositivo se cultivaron con medio más LPS y en las otras tres secciones se usaron como control, células sin el estímulo. Una vez capturadas las células y las perlas, se inyectó por el canal lateral los anticuerpos de detección y medio con o sin estímulo. La metodología de cómo se realizaron estos experimentos se esquematiza en la Figura 4.39. Al realizar un análisis estadístico con la prueba Mann-Whitney, se determinó que hay diferencia significativa en secreción entre los dos grupos ($p=0.0005$). Se observa que en los dos grupos hay células que secretaron alta cantidad de IL-8, sin embargo, hay mayor cantidad de células secretoras en el grupo estimulado (Figura 4.40a).

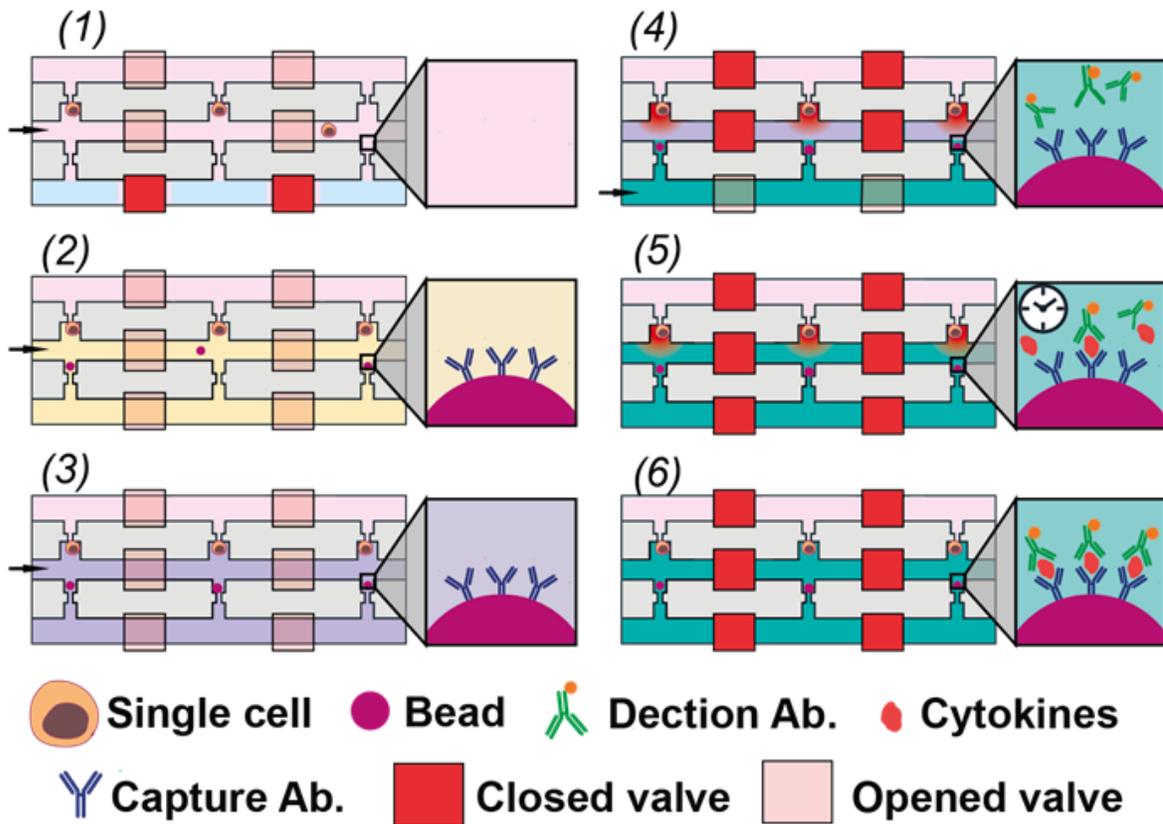


Figura 4.39. Procedimiento para realizar los experimentos de análisis de citocinas secretadas por células individuales. 1) Se inyectan las células y se capturan, 2) se abre la válvula para la captura de perlas, 3) Se lavan los canales, 4) Se inyectan los anticuerpos de detección y los estímulos usando el canal lateral, 5) Se incuba por 24 horas, 6) Se toman micrografías al terminar el ensayo.

Después, para aprovechar la ventaja del dispositivo de poder analizar 6 condiciones en paralelo, se evaluó la respuesta secretora de los monocitos bajo cuatro concentraciones diferentes de LPS (12.5, 25, 50 y 100 µg/mL). Las otras dos secciones se usaron para los controles, uno donde se capturaron las células y perlas, pero no se estimularon con LPS y otra sección donde solo se capturaron las perlas para obtener su señal basal. A todas las secciones se les inyectaron los anticuerpos de detección por el canal lateral. En la figura 4.40b se observa

una secreción heterogénea, además en todas las condiciones donde había células (incluyendo el control sin estímulo) hay diferencia significativa contra el control (sin células). Sin embargo, entre el control con células sin estímulo y células estimuladas, solo hubo diferencia significativa con el grupo estimulado con los 100 µg/mL. Se ha reportado que cuando una población de células (macrófagos derivados de monocitos) se encuentran en población y al ser estimuladas con LPS, el promedio de secreción de citocinas (incluyendo IL-8) es mayor que el promedio de secreción cuando se aíslan y se mide su secreción [101]. Se reporta que esta diferencia se puede deber a la comunicación paracrina, ya que una célula con alto nivel secretor puede inducir a que las células vecinas también secreten altas cantidades de citocinas y al aislar a las células esta comunicación se pierde. Se empleó la misma metodología para medir la secreción de citocinas en células capturadas con el dispositivo. Para estos experimentos, se evaluó la comunicación paracrina estimulando primero las células en una caja Petri durante 4 horas. Se inyectaron esas células a dos secciones del dispositivo, en las otras secciones del dispositivo también se capturaron células no estimuladas y se aislaron (sin comunicación paracrina). Después, se inyectaron los anticuerpos de detección en todas las secciones y en cuatro secciones se inyectó el estímulo para tener el grupo estimulado con comunicación paracrina, el grupo estimulado sin comunicación y un tercer grupo sin estímulo (Figura 4.40c). Se obtuvieron resultados similares a los ya reportados, donde hay mayor secreción en las células estimuladas previamente en población, aunque sigue existiendo heterogeneidad de secreción en los tres grupos, habiendo células que secretan alta cantidad, moderada, baja o nula. Con estos resultados se comprobó que es posible usar el dispositivo para el análisis de células individuales para medir secreción de proteínas.

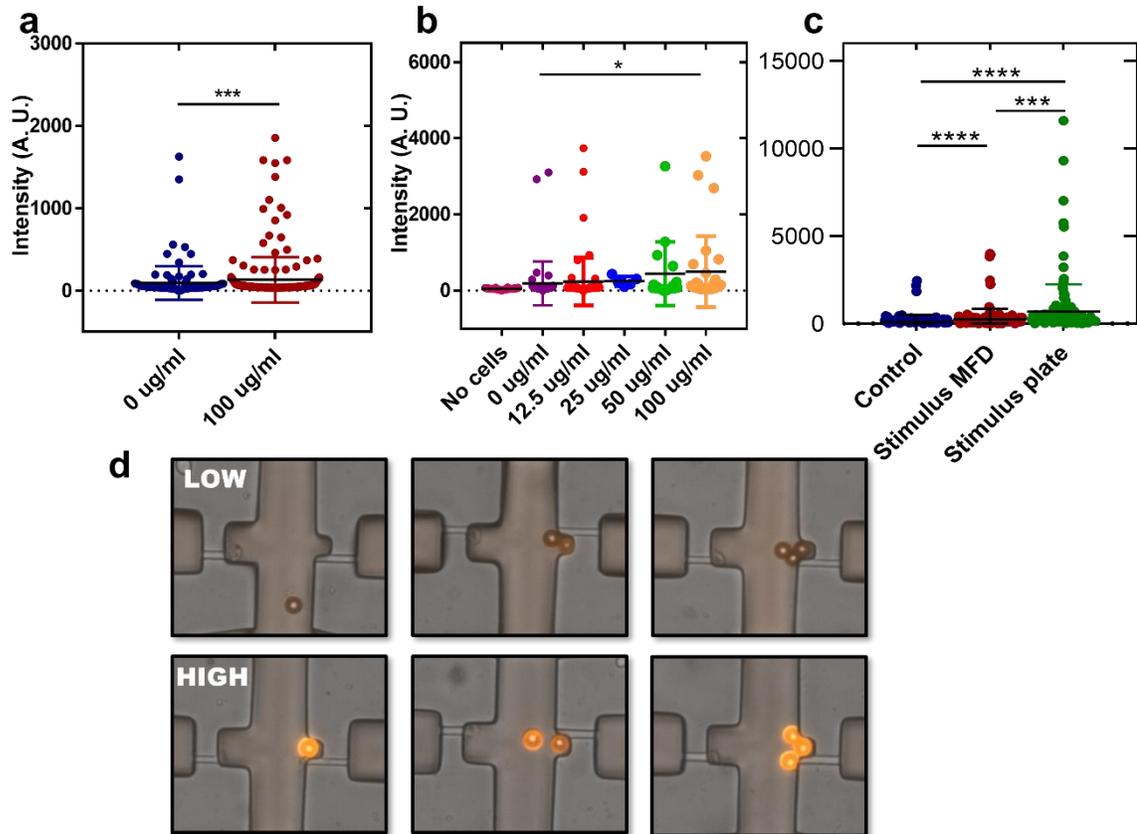


Figura 4.40. Resultados de la secreción de IL-8 por monocitos en el dispositivo con trampas, (a) cuando se tiene dos grupos (control y estimulados con LPS) y (b) bajo diferentes concentraciones de estímulo. (c) Evaluación de la comunicación paracrina, al estimular primero las células en población en una placa y solo en el dispositivo.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollaron sistemas microfluídicos para medir biomarcadores de esferoides de hepatocitos y para analizar células individuales. La primera plataforma microfluídica se conforma por un módulo para formar y cultivar esferoides de hepatocitos de rata primarios y un módulo para medir los biomarcadores, el cual es un dispositivo microfluídico basado en gotas. En este sistema fue factible la incorporación de ensayos bioquímicos colorimétricos enzimáticos para la detección de glucosa, analito de interés en el metabolismo hepático de los carbohidratos. También se realizaron ensayos fluorescentes enzimáticos para la detección de biomarcadores de función hepática (ácidos biliares) y de citotoxicidad (lactato deshidrogenasa). Usando los dos módulos se logró monitorear hasta por 96 horas a los esferoides de hepatocitos expuestos a un tratamiento con palmitato. Con el sistema microfluídico fue posible observar los efectos tóxicos del palmitato al medir los cambios de concentración de los biomarcadores, ya que se observó una disminución del consumo de glucosa y de producción de ácidos biliares, pero incrementó la secreción de lactato deshidrogenasa en lo esferoides tratados.

Por otra parte, se consiguió fabricar un dispositivo microfluídico integrado con el módulo de formación y cultivo de esferoides de hepatocitos primarios y el módulo de análisis basado en gotas. Se evaluó la funcionalidad de los esferoides de hepatocitos primarios de rata midiendo albúmina durante las tres semanas que se mantuvieron en los dispositivos con pozos de diferente altura. Los hepatocitos fueron funcionales durante el periodo de cultivo en todos los dispositivos, sin embargo, se observó que los pozos de 150 μm de altura duran menos días con su forma tridimensional. El área de análisis en el dispositivo microfluídico también se basó en la formación de gotas y se incorporó en ellas un ensayo colorimétrico enzimático para medir glucosa. El sistema permitió medir los cambios de concentración de glucosa en medio condicionado por los

esferoides de hepatocitos que recibieron estímulos dinámicos con insulina y glucagón. Con estos experimentos se mostró la utilidad del sistema para simular estados fisiológicos.

Por otra parte, el sistema microfluídico para análisis de células individuales es capaz de capturar de forma controlada células individuales. Las microválvulas incorporadas al dispositivo logran controlar el flujo fluido dentro del dispositivo para selectivamente atrapar las células o las perlas en las trampas correspondientes, además permiten aislar completamente a las microcámaras. Se capturaron microperlas funcionalizadas con anticuerpos para la detección de proteínas y se logró realizar inmunoensayos en ellas con suficientemente sensibles para medir las citocinas secretadas por células individuales. Además, el diseño del dispositivo permite realizar recambios de medio dentro de las cámaras aisladas con células y perlas, lo cual puede ser favorable para ensayos de larga duración.

6. PERSPECTIVAS

Los sistemas microfluídicos descritos en este trabajo tienen la capacidad de recapitular *in vitro* y de forma más cercana la microestructura del hígado, además permiten el monitoreo de biomarcadores hepáticos. Estas características le dan el potencial para emplearse en áreas como ingeniería de tejidos para el desarrollo y validación de modelos de enfermedades hepáticas o para investigaciones en el desarrollo de fármacos y así evaluar su hepatotoxicidad con modelos de hígado *in vitro*. Sin embargo, una perspectiva sería evaluar si también con este sistema de cultivo se mimetiza la zonación hepática y para evaluarlo se puede emplear el dispositivo para análisis de células individuales. En este caso, es posible recuperar los esferoides dentro del dispositivo, disgregarlos e introducir las células al dispositivo para capturarlas y analizarlas. Se pueden realizar análisis para clasificar y determinar si existen grupos de células que tienen diferentes características secretoras. Además, es necesario incluir pruebas de viabilidad al terminar los ensayos, inyectando por el canal lateral homodímero de etidio y calceína, para discernir entre células muertas y células con bajo perfil secretor de algún metabolito. También se deben incorporar al dispositivo ensayos relacionados con la función hepática, por ejemplo, ensayos para cuantificar la secreción de albúmina, LDH, ALT, ácidos biliares usando perlas funcionalizadas o ensayos enzimáticos para medir glucosa.

Para poder realizar estos estudios también se deben implementar ensayos en el dispositivo para medir glucosa, ácidos biliares o albúmina. Además, hace falta realizar un análisis detallado de la viabilidad de las células después de los ensayos para discernir si las células no secretan algún metabolito por sus características o porque no están vivas. Por otra parte, para mimetizar de forma más cercana la fisiología del hígado, se podría realizar co-cultivos con las demás células de hígado como las células de Ito o las células de Kupffer. Además, por la versatilidad de estos sistemas microfluídicos también se podrían realizar

conexiones con otros módulos donde se cultiven células de otros órganos por ejemplo con los islotes del páncreas. Por otro lado, para realizar estudios farmacológicos sería ideal formar los esferoides con células humanas, por ejemplo, con células madre diferenciadas. Desde el punto de vista ingenieril, tanto los dispositivos para análisis de esferoides como el de células individuales se pueden mejorar al rediseñarlos para tener la capacidad de analizar más biomarcadores. También se pueden incluir canales extra para realizar las curvas de calibración simultáneamente durante los ensayos y hacer análisis cuantitativos. También, es necesario determinar experimentalmente cuál es el número máximo de perlas que se pueden capturar para aumentar la ocupación de las trampas, pero sin que afecte el límite de detección de los ensayos.

7. REFERENCIAS

- [1] Bacon, B. R., O'Grady, J. G., Di Bisceglie, A. M., Lake, J. R., *Comprehensive Clinical Hepatology*. Elsevier Ltd 2006.
- [2] Hansen, J., *Netter's Clinical Anatomy*. 2012.
- [3] Mitra, V., Metcalf, J., *Anaesth. Intensive Care Med*. 2009, 10, 332–333.
- [4] Boyer, J. L., Soroka, C. J., *J. Hepatol*. 2021.
- [5] Øie, C. I., Mönkemöller, V., Hübner, W., Schüttpelz, M., Mao, H., Ahluwalia, B. S., Huser, T. R., McCourt, P., *Nanophotonics* 2018, 7, 575–596.
- [6] Krishna, M., *Clin. Liver Dis*. 2013, 2, 4–7.
- [7] Mescher, A. L., *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. McGraw-Hill Medical 13th ed. New York 2013.
- [8] Kietzmann, T., *Redox Biol*. 2017, 11, 622–630.
- [9] Microcirculation of the liver,
<http://somepomed.org/articulos/contents/mobipreview.htm?32/29/33236>.
- [10] Pradhan-Sundd, T., Monga, S. P., *Gene Expr*. 2019, 19, 69.
- [11] Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., Rautou, P.-E., *J. Hepatol*. 2017, 66, 212–227.
- [12] Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., Nagy, L. E., *Compr. Physiol*. 2013, 3, 785.
- [13] Wheeler, M. D., *Alcohol Res. Heal*. 2003, 27, 300.
- [14] Muriel, P., *Liver Pathophysiology*. Elsevier 2017, pp. 3–22.
- [15] Hautekeete, M. L., Geerts, A., *Virchows Arch*. 1997, 430, 195–207.
- [16] Michalopoulos, G. K., *J. Cell. Physiol*. 2007, 213, 286–300.
- [17] HEPATIC CLEARANCE, <https://slidetodoc.com/lecture-10-hepatic-clearance-outline-hepatic-blood-flow/>.
- [18] Ozougwu, J. C., *Int. J. Res. Pharm. Biosci*. 2017, 4, 13–24.

- [19] Wakim, K. G., *Am. J. Med.* 1954, 16, 256–271.
- [20] Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., Tuma, F., 2018.
- [21] Chiang, J. Y. L., *J. Lipid Res.* 2009, 50, 1955–1966.
- [22] Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc'h, J. Le, Siliart, B., Dumon, H., *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 2008, 92, 272–283.
- [23] Jungermann, K., Katz, N., *Physiol. Rev.* 1989, 69, 708–764.
- [24] Klover, P. J., Mooney, R. A., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004, 36, 753–758.
- [25] Mitra, V., Metcalf, J., *Anaesth. Intensive Care Med.* 2012, 13, 54–55.
- [26] QUISTORFF, B., *Essays Biochem.* 1990, 25, 83–136.
- [27] Tomlinson, L., Hyndman, L., Firman, J. W., Bentley, R., Kyffin, J. A., Webb, S. D., McGinty, S., Sharma, P., *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7, 1–8.
- [28] Gebhardt, R., *Pharmacol. Ther.* 1992, 53, 275–354.
- [29] Huppert, S. S., Iwafuchi-Doi, M., *Molecular Regulation of Mammalian Hepatic Architecture*. Elsevier Inc. 2019.
- [30] Suhail, M., Abdel-Hafiz, H., Ali, A., Fatima, K., Damanhour, G. A., Azhar, E., Chaudhary, A. G. A., Qadri, I., *World J. Gastroenterol. WJG* 2014, 20, 12462.
- [31] Osna, N. A., Donohue Jr, T. M., Kharbanda, K. K., *Alcohol Res. Curr. Rev.* 2017, 38, 147.
- [32] Angulo, P., *N. Engl. J. Med.* 2002, 346, 1221–1231.
- [33] Leise, M. D., Poterucha, J. J., Talwalkar, J. A., Mayo Clinic Proceedings. Elsevier 2014, pp. 95–106.
- [34] Gaskell, H. J., *Development of a Spheroid Model to Investigate Drug-Induced Liver Injury*. The University of Liverpool (United Kingdom) 2016.
- [35] Soldatow, V. Y., LeCluyse, E. L., Griffith, L. G., Rusyn, I., *Toxicol. Res. (Camb)*. 2013, 2, 23–39.
- [36] Guillouzo, A., *Environ. Health Perspect.* 1998, 106, 511–532.
- [37] Deng, J., Wei, W., Chen, Z., Lin, B., Zhao, W., Luo, Y., Zhang, X., *Micromachines* 2019, 10, 676.

- [38] Moravcova, A., Červinková, Z., Kučera, O., Mezera, V., Rychtrmoc, D., Lotkova, H., *Physiol. Res.* 2015, 64.
- [39] Nicolas, C. T., Hickey, R. D., Allen, K. L., Du, Z., Guthman, R. M., Kaiser, R. A., Amiot, B., Bansal, A., Pandey, M. K., Suksanpaisan, L., *Surgery* 2018, 164, 473–481.
- [40] Tostões, R. M., Leite, S. B., Serra, M., Jensen, J., Björquist, P., Carrondo, M. J. T., Brito, C., Alves, P. M., *Hepatology* 2012, 55, 1227–1236.
- [41] Tong, J. Z., De Lagausie, P., Furlan, V., Cresteil, T., Bernard, O., Alvarez, F., *Exp. Cell Res.* 1992, 200, 326–332.
- [42] Chen, H.-L., Wu, H.-L., Fon, C.-C., Chen, P.-J., Lai, M.-Y., Chen, D.-S., *J. Biomed. Sci.* 1998, 5, 435–440.
- [43] Chang, T. T., Hughes-Fulford, M., *Tissue Eng. Part A* 2009, 15, 559–567.
- [44] Farghali, H., Hodis, J., Kutinová-Canová, N., Potměšil, P., Kmoníčková, E., Zídek, Z., *Physiol. Res.* 2008, 57, 569–575.
- [45] Miyamoto, Y., Ikeuchi, M., Noguchi, H., Yagi, T., Hayashi, S., *Cell Med.* 2015, 8, 47–56.
- [46] Haque, A., Gheibi, P., Gao, Y., Foster, E., Son, K. J., You, J., Stybayeva, G., Patel, D., Revzin, A., *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–15.
- [47] Tonon, F., Giobbe, G. G., Zambon, A., Luni, C., Gagliano, O., Floreani, A., Grassi, G., Elvassore, N., *Sci. Rep.* 2019, 9, 1–10.
- [48] Shao, C., Chi, J., Zhang, H., Fan, Q., Zhao, Y., Ye, F., *Adv. Mater. Technol.* 2020, 5, 1–16.
- [49] Vadivelu, R. K., Kamble, H., Shiddiky, M. J. A., Nguyen, N. T., *Micromachines* 2017, 8, 1–23.
- [50] Choi, J. H., Loarca, L., de Hoyos-Vega, J. M., Dadgar, N., Loutharback, K., Shah, V. H., Stybayeva, G., Revzin, A., *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2020, 319, C552–C560.
- [51] Lee, K.-H., Lee, J., Lee, S.-H., *Lab Chip* 2015, 15, 3822–3837.
- [52] Riahi, R., Shaegh, S. A. M., Ghaderi, M., Zhang, Y. S., Shin, S. R., Aleman, J., Massa, S., Kim, D., Dokmeci, M. R., Khademhosseini, A., *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–14.
- [53] Ota, H., Miki, N., *Front Biosci (Elite Ed)* 2013, 5, 37–48.

- [54] Mukomoto, R., Nashimoto, Y., Terai, T., Imaizumi, T., Hiramoto, K., Ino, K., Yokokawa, R., Miura, T., Shiku, H., *Analyst* 2020, *145*, 6342–6348.
- [55] Dishinger, J. F., Reid, K. R., Kennedy, R. T., *Anal. Chem.* 2009, *81*, 3119–3127.
- [56] Li, X., Hu, J., Easley, C. J., *Lab Chip* 2018, *18*, 2926–2935.
- [57] Chen, Z., Chen, J. J., Fan, R., *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2019, *12*, 431–449.
- [58] Junkin, M., Kaestli, A. J., Cheng, Z., Jordi, C., Albayrak, C., Hoffmann, A., Tay, S., *Cell Rep.* 2016, *15*, 411–422.
- [59] Chokkalingam, V., Tel, J., Wimmers, F., Liu, X., Semenov, S., Thiele, J., Figdor, C. G., Huck, W. T. S., *Lab Chip* 2013, *13*, 4740–4744.
- [60] Bounab, Y., Eyer, K., Dixneuf, S., Rybczynska, M., Chauvel, C., Mistretta, M., Tran, T., Aymerich, N., Chenon, G., Llitjos, J. F., Venet, F., Monneret, G., Gillespie, I. A., Cortez, P., Moucadel, V., Pachot, A., Troesch, A., Leissner, P., Textoris, J., Bibette, J., Guyard, C., Baudry, J., Griffiths, A. D., Védrine, C., *Nat. Protoc.* 2020, *15*, 2920–2955.
- [61] Son, K. J., Rahimian, A., Shin, D. S., Siltanen, C., Patel, T., Revzin, A., *Analyst* 2016, *141*, 679–688.
- [62] Ma, C., Fan, R., Ahmad, H., Shi, Q., Comin-Anduix, B., Chodon, T., Koya, R. C., Liu, C. C., Kwong, G. A., Radu, C. G., Ribas, A., Heath, J. R., *Nat. Med.* 2011, *17*, 738–743.
- [63] Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D., Heyman, J. A., *Nat. Protoc.* 2013, *8*, 870–891.
- [64] Cedillo-Alcantar, D. F., Han, Y. D., Choi, J., Garcia-Cordero, J. L., Revzin, A., *Anal. Chem.* 2019, *91*, 5133–5141.
- [65] Unger, M. A., Chou, H. P., Thorsen, T., Scherer, A., Quake, S. R., *Science* (80-.). 2000, *288*, 113–116.
- [66] Teh, S. Y., Lin, R., Hung, L. H., Lee, A. P., *Lab Chip* 2008, *8*, 198–220.
- [67] Whitesides, G. M., *Nature* 2006, *442*, 368–373.
- [68] Tan, J. L., Liu, W., Nelson, C. M., Raghavan, S., Chen, C. S., Ph, D., Al, T. A. N. E. T., 2004, *10*.
- [69] Kuo, C. Te, Chiang, C. L., Huang, R. Y. J., Lee, H., Wo, A. M., *NPG Asia Mater.* 2012, *4*, 1–8.

- [70] Wu, Z., Hjort, K., *Lab Chip* 2009, 9, 1500–1503.
- [71] Luebke-Wheeler, J. L., Nedredal, G., Yee, L., Amiot, B. P., Nyberg, S. L., *Cell Transplant.* 2009, 18, 1281–1287.
- [72] Shen, L., Hillebrand, A., Wang, D. Q. H., Liu, M., *J. Vis. Exp.* 2012, 2–5.
- [73] Dunn, J. C. Y., Yarmush, M. L., Koebe, H. G., Tompkins, R. G., *FASEB J.* 1989, 3, 174–177.
- [74] Chao, E. S., Dunbar, D., Kaminsky, L. S., *Cell Biol. Toxicol.* 1988, 4, 1–11.
- [75] Wolkoff, A. W., Cohen, D. E., *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2003, 284, G175–G179.
- [76] Park, C., Han, Y. D., Kim, H. V., Lee, J., Yoon, H. C., Park, S., *Lab Chip* 2018, 18, 1533–1538.
- [77] Han, Y. D., Chun, H. J., Yoon, H. C., *Biosens. Bioelectron.* 2014, 59, 259–268.
- [78] Jenie, S. N. A., Prieto-Simon, B., Voelcker, N. H., *Biosens. Bioelectron.* 2015, 74, 637–643.
- [79] Li, Z., Cheng, H., Shao, S., Lu, X., Mo, L., Tsang, J., Zeng, P., Guo, Z., Wang, S., Nathanson, D. A., *Angew. Chemie Int. Ed.* 2018, 57, 11554–11558.
- [80] QuantiChrom™ Lactate Dehydrogenase Kit (D2DH-100), 2021, 169, 94545.
- [81] Hofmann, A. F., Hagey, L. R., *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, 65, 2461–2483.
- [82] Dawson, P. A., Lan, T., Rao, A., *J. Lipid Res.* 2009, 50, 2340–2357.
- [83] Barnes, S., Spenny, J. G., *Clin. Chim. acta* 1980, 107, 149–154.
- [84] Starkey, B. J., Marks, V., *Clin. Chim. Acta* 1982, 119, 165–177.
- [85] Hirsova, P., Ibrabim, S. H., Gores, G. J., Malhi, H., *J. Lipid Res.* 2016, 57, 1758–1770.
- [86] Wilcox, G., *Clin. Biochem. Rev.* 2005, 26, 19.
- [87] Kawamori, D., Kurpad, A. J., Hu, J., Liew, C. W., Shih, J. L., Ford, E. L., Herrera, P. L., Polonsky, K. S., McGuinness, O. P., Kulkarni, R. N., *Cell Metab.* 2009, 9, 350–361.
- [88] Komjati, M., Bratusch-Marrain, P., Waldhäusl, W., *Endocrinology* 1986,

118, 312–319.

- [89] Lee, M., Collins, J. W., Aubrecht, D. M., Sperling, R. A., Solomon, L., Ha, J. W., Yi, G. R., Weitz, D. A., Manoharan, V. N., *Lab Chip* 2014, *14*, 509–513.
- [90] Tanyeri, M., Ranka, M., Sittipolkul, N., Schroeder, C. M., *Lab Chip* 2011, *11*, 1786–1794.
- [91] Volpetti, F., Garcia-Cordero, J., Maerkl, S. J., *PLoS One* 2015, *10*, 1–15.
- [92] Junkin, M., Kaestli, A. J., Cheng, Z., Jordi, C., Albayrak, C., Hoffmann, A., Tay, S., *Cell Rep.* 2016, *15*, 411–422.
- [93] Zuba-Surma, E. K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., Dawn, B., Hall, B., Singh, R., Lillard, J. W., Ratajczak, M. Z., *J. Cell. Mol. Med.* 2008, *12*, 292–303.
- [94] Kobel, S., Valero, A., Latt, J., Renaud, P., Lutolf, M., *Lab Chip* 2010, *10*, 857–863.
- [95] Chung, K., Rivet, C. A., Kemp, M. L., Lu, H., *Anal. Chem.* 2011, *83*, 7044–7052.
- [96] Han, Q., Bradshaw, E. M., Nilsson, B., Hafler, D. A., Love, J. C., *Lab Chip* 2010, *10*, 1391–1400.
- [97] Duque, G. A., Descoteaux, A., *Front. Immunol.* 2014, *5*, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00491.
- [98] Tucureanu, M. M., Rebleanu, D., Constantinescu, C. A., Deleanu, M., Voicu, G., Butoi, E., Calin, M., Manduteanu, I., *Int. J. Nanomedicine* 2018, *13*, 63–76.
- [99] Brennan, K., Zheng, J., XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier Inc. 2007, pp. 1–4.
- [100] Rodriguez-Moncayo, R., Jimenez-Valdes, R. J., Gonzalez-Suarez, A. M., Garcia-Cordero, J. L., *ACS Sensors* 2020, *5*, 353–361.
- [101] Xue, Q., Lu, Y., Eisele, M. R., Sulistijo, E. S., Khan, N., Fan, R., Miller-Jensen, K., *Sci. Signal.* 2015, *8*, ra59–ra59.