



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA

EN INGENIERÍA Y TECNOLOGÍAS AVANZADAS

UPIITA

“Formulación y simulación de una matriz extracelular biomimética para el estudio de células de cáncer cervicouterino”

Que para obtener el título de

“Ingeniero en Biónica”

Presenta(n) los(a) alumnos(a):

Valdez Solorio Damian

Asesor(es):

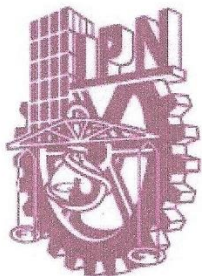
Dra. Lilia Martínez Pérez

Dra. Génesis Karendash González Quijano

Dr. Adrián Martínez Rivas

México, Ciudad de México, a 9 de diciembre de 2021





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA
EN INGENIERÍA Y TECNOLOGÍAS AVANZADAS

UPIITA

“FORMULACIÓN Y SIMULACIÓN DE UNA MATRIZ EXTRACELULAR PARA EL ESTUDIO DE CELULAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO”


Que para obtener el título de


“Ingeniero en Biónica”

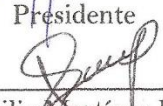
Presenta el alumno:

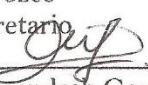
Valdez Solorio Damian


Sinodales


Dr. José de Jesús Silvia Lomelí
Presidente


Dr. Gerardo Alejandro Valentino
Orozco
Secretario


Dra. Lilia Martínez Pérez
Asesora


Dra. Génesis Karendash González
Quijano
Asesora


Dr. Adrián Martínez Rivas
Asesor



México, Ciudad de México, a de 9 de diciembre de 2022



Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional

Presente

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Damian Valdez Solorio (se anexa copia simple de identificación oficial), manifiesto ser autor (a) y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada Formulación y simulación de una matriz extracelular biomimética para el estudio de celulas de cáncer cervicouterino, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales, Plataforma de la Dirección de Bibliotecas del IPN y/o consulta directa en la Coordinación de Biblioteca de la UPIITA "La Tesis" por un periodo de 5 años contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis". Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México, a 02 de Mayo de 2022

Atentamente

Damian Valdez Solorio

Agradecimientos

La gratitud en silencio no sirve de nada...

Este trabajo es un peldaño en mis sueños y capítulo más de mi historia por lo cual agradezco:

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN), por haberme abierto las puertas al conocimiento desde el nivel medio superior y enseñarme que SOY ORGULLOSAMENTE POLITÉCNICO por convicción y no por circunstancia.

A la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería y Tecnologías Avanzada (UPIITA), por su nivel académico, así como la responsabilidad que deja en mis hombros de dignificar a mi casa de estudios.

A cada uno de los profesores de la UPITTA, por compartir sus conocimientos y exigirme a ser un ingeniero de calidad.

A la Dr. Lilia Martínez Pérez, por compartir sus experiencias y conocimientos, palabras de aliento, el tiempo y esfuerzo dedicado en la asesoría de este trabajo.

A la Dra. Génesis K. González y al Dr. Adrián Martínez Rivas, por haber confiado en mí en el desarrollo de este trabajo, la paciencia y dirección de este. Por mostrarme lo apasionante que es el mundo de la investigación.

Y agradezco profundamente a mis padres, por darme la oportunidad de experimentar una de las etapas más apasionantes de mi vida. A Alejandra Solorio Ladino por enseñarme a mantener la calma frente a situaciones estresantes, gracias, mamá. A Ernesto Valdez Santiago por mostrar que no importa el problema siempre hay una solución, gracias, papá. A mis hermanos por sus consejos y bromas en los momentos menos oportunos.

A mi sobrina Nahiromi Moreno Valdez, por mostrarme que no importa lo grave de la situación en que te encuentres siempre existe una manera de salir victorioso.

A mis amigos de la UPIITA, Visuet, Augusto, David, María Fernanda, María Fernanda, Rosalía, Giovanni y Carlos sé que no puedo nombrar a todos, pero gracias, por acompañarme y pasar momentos amenos y ver el tiempo que nos tomó realizar esta meta.

Índice General

Agradecimientos	III
Abreviaturas	IX
Glosario	X
Resumen	XI
Abstract	XI
Hipótesis	XI
Capítulo 1. Introducción	12
Capítulo 2. Planteamiento del problema	13
2.1 Estado del Arte	13
2.2 Justificación	16
2.3 Objetivos	17
2.3.1 Objetivo General	17
2.3.2 Objetivos específicos	17
Capítulo 3. Marco teórico	18
3.1 Cultivos celulares 3D (esferoides)	18
3.2 Biopolímeros	21
3.3 Diseño experimental central compuesto	24
3.4 Dinámica de fluidos computacional	26
3.4.1 Fluidos	28
3.4.2 Navier Stokes	29
3.4.3 Movimiento de células dentro de un fluido	30
3.5 Migración de las células en una matriz extracelular (MEC)	32
3.6 Plataformas microfluídicas	33
3.6.1. Simulaciones de cultivos celulares en plataformas microfluídicas.	37
3.7 Parámetros geométricos	40
3.8 Parámetros fisiológicos	42
3.8.1 Células HeLa	42
3.8.2 pH	42
3.8.3 Temperatura	43
3.8.4 Tensión de corte (shear stress)	43
3.8.5 Consumo de oxígeno	44
3.8.6 Migración de las células	44
3.8.7 Medio de Cultivo	45
Capítulo 4. Desarrollo Experimental	47

4.1 Diseño experimental central compuesto	47
4.2 Diseño de la plataforma microfluídica	51
4.3. Simulación	53
4.3.1 Simulación de la migración celular en las formulaciones de la MEC.	53
4.3.2 Simulación de la MEC en la plataforma	55
4.4 Análisis de resultados	58
4.4.1 Distribución de las células en la plataforma	58
4.4.2 Cambios en la geometría del micropozo	64
4.5 Interpretación de resultados	68
Capítulo 5. Conclusiones	69
Capítulo 6. Recomendaciones para investigaciones futuras.	70
Capítulo 7. Bibliografía	72
Anexos	78
Anexo 1	78
Anexo 2	80
Anexo 3	81
Anexo 4	82
Anexo 5	84

Índice de figuras

Figura 1. La distribución de las células en cuatros instantes de tiempo. _____	15
Figura 2. Motilidad de las células. _____	15
Figura 3. Interacción de las células con la matriz extracelular (MEC). _____	18
Figura 4. Características del esferoide tumoral. _____	19
Figura 5. Imágenes 3D de esferoides HeLa. _____	20
Figura 6. Morfología de las células en el octavo día de cultivo. _____	20
Figura 7. Imágenes TEM (microscopia electrónica de transmisión). _____	22
Figura 8. Microscopía de fluorescencia confocal obtenidas de los hidrogeles C, CM y CM+. _____	23
Figura 9. Redes formadas del alginato. _____	24
Figura 10. Representación gráfica de un diseño central compuesto de 2 y 3 factores. _____	25
Figura 11. Etapas esenciales en CFD _____	26
Figura 12. Tipos de malla. _____	27
Figura 13. Estenosis excéntrica y concéntrica. _____	27
Figura 14. Simulación de una concentración (10 μ g/mL). _____	28
Figura 15. Comportamiento reológico de fluidos: esfuerzo de corte en función de la deformación _____	29
Figura 16. Esquema de fuerzas que experimenta la particulada debido al fluido. _____	30
Figura 17. Diagrama de fuerzas presentes las células en la migración. _____	32
Figura 18. Esquema del dispositivo microfluídico. _____	34
Figura 19. Plataforma microfluídica de emulsión. _____	35
Figura 20. Plataforma microfluídica de Zuchowska. _____	36
Figura 21. Esquema de la plataforma microfluídica. _____	37
Figura 22. Acumulación de células en los micropozos con diferentes velocidades y viscosidades _____	38
Figura 23. La distribución de la velocidad y la línea de corriente del flujo de la plataforma. _____	39
Figura 24. Simulación del consumo de O ₂ y glucosa por el MDT. _____	39
Figura 25. Perfiles de simulación de la tensión de corte en las paredes a dos caudales diferentes 10 μ L/min y 20 μ L/min. _____	40
Figura 26. Plataforma microfluídica. _____	41
Figura 27. Esferoides formados en micropozos de fondo plano y en micropozos de fondo redondo tras tres días de cultivo. _____	41
Figura 28. Imagen de fluorescencia multifotónica de células HeLa. _____	42
Figura 29. Células HeLa bajo LSS (Laminar shear stresses). _____	44
Figura 30. Los flujos intersticiales promovieron la disociación de los esferoides tumorales en cultivo. _____	45
Figura 31. Diagrama de Pareto del diseño central compuesto _____	49
Figura 32. Superficie de respuesta de la concentración de la mezcla _____	49
Figura 33. Grafica de contornos de la concentración _____	50
Figura 34. Sistema de control de un dispositivo microfluídico. _____	51
Figura 35. Plataforma microfluídica planos ver anexo 5. Medidas en milímetros _____	52
Figura 36. Numeración de los micropozos en la plataforma Medidas en milímetros _____	52
Figura 37. Simulación de la migración de las células en las tres formulaciones de la MEC _____	54
Figura 38. Vista 3D de la simulación de la migración a través de la MEC. _____	55
Figura 39. Malla de la plataforma microfluídica con 776598 elementos _____	56
Figura 40. Malla generada por COMSOL Multiphysics 5.5 para el análisis de fluido _____	57

Figura 41. Malla generada por COMSOL Mutltipysics 5.5 para el análisis de fluido	57
Figura 42. Simulación del movimiento de células con un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.	58
Figura 43. Simulación del movimiento de células con un caudal de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.	59
Figura 44. Simulación del movimiento de células con un caudal de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.	59
Figura 45. Histograma del número de células por micropozo en los tres caudales propuestos en la MEC 2.	60
Figura 46. Histograma del número de células por micropozo en los tres caudales propuestos en la MEC 3.	60
Figura 47. Tensión de corte en las paredes por el ingreso de la MEC	62
Figura 48. Simulación de DMEM con un caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.	63
Figura 49. Histograma del número de células por micropozo en dos profundidades con un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.	64
Figura 50. Simulación de DMEM con un caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.	66
Figura 51. Plataforma final. a) Vista 3D b) Acotaciones de las medidas en milímetros	67
Figura 52. Plataforma sugerida.	70
Figura 53. Medidas de la plataforma propuesta en milímetros.	71
Figura 54. Vistas de la plataforma acotado en milímetros	85

Índice de tablas

Tabla 1. Características de diseños experimentales [37]	24
Tabla 2. Valores de la constante λ dado el número de factores k [37].	25
Tabla 3. Características del DMEM 11995040 de Gibco™ [71]	46
Tabla 4. Niveles máximos y mínimos de las concentraciones de biopolímeros	47
Tabla 5. Diseño de experimento	48
Tabla 6. Formulación de MECs seleccionadas	50
Tabla 7 Dimensiones de la plataforma microfluídica	52
Tabla 8. Media y desviación estándar de la distancia de migración	55
Tabla 9. Variables estadísticas	61
Tabla 10. Análisis ANOVA	61
Tabla 11. Variables estadísticas	64
Tabla 12. Análisis ANOVA	65
Tabla 13. Formulaciones de matrices extracelulares basadas en biopolímeros	78
Tabla 14. Propiedades del PDMS.	80
Tabla 15. Simulaciones realizadas en plataformas microfluídicas.	81
Tabla 16. Características geométricas de plataformas microfluídicas basadas en micropozos.	82

Abreviaturas

CaCu: Cáncer cervicouterino.

CFD: Dinámica de fluidos computacional o CFD (Computational Fluid Dynamic)

DCC: Diseño central compuesto.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

MEC: Matriz extracelular.

MSR: Metodología de superficie de respuesta.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PDMS: Polidimetilsiloxano.

pH: Potencial de hidrogeno.

TEM: Microscopia electrónica de transmisión.

%(v/v): Unidad de concentración, la proporción de volumen de soluto y volumen de disolvente.

%(p/v): Unidad de concentración, la proporción del peso de soluto y volumen de disolvente.

μm: micrómetro 1×10^{-6} m.

%(p/p): Unidad de concentración, la proporción del peso del soluto y el peso del disolvente.

Glosario

Biopolímero: Son polímeros naturales producidos por organismo vivos.

Coefficiente de difusión: Es el número que representa la facilidad de un soluto se mueve en un disolvente.

Esféroides: Agregaciones tridimensionales perfectamente redondas de células que están compuesta de múltiples células.

In vivo: En cultivo celular es el estudio o experimentación de las células que se realiza en el tejido de un organismo vivo.

In vitro: En cultivo celular es el estudio o experimentación de las células que se realiza fuera del tejido de un organismo vivo, es realizado comúnmente en botellas o cajas de Petri.

MEC: Soporte mecánico para facilitar su organización y proliferación, así como la interacción de células.

Número de Reynolds: Número adimensional que determina si un fluido tiene un comportamiento laminar o turbulentos.

Organ-on-a-Chip: Dispositivo microfluídico para el cultivo de células, tejidos y órganos que contiene microcanales y otras microestructuras donde se pueden recrear características similares a las que se presentan un estudio *in vivo*.

Plataforma microfluídica: Dispositivo a escalas micrométricas donde circulan fluidos con fines de investigación en diferentes áreas.

Biomacromoléculas: Moléculas orgánicas de gran peso molecular formada de monómeros.

Micropozos: Estructura utilizada para el cultivo de células con forma cilíndrica y un base redondeada o plana.

Microcanales: Estructura con dimensiones micrométricas por donde fluyen los fluidos.

Micropatrones: Diseños de estructuras repetidas en escalas nanométricas y micrométricas.

Cáncer Cervicouterino: Un tipo de cáncer que se produce en las células de cuello uterino la parte inferior del útero.

HeLa: Línea celular para cultivo de cáncer cervicouterino de una paciente de nombre Henrietta Lacks.

Microfluídica: Ciencia multidisciplinaria que estudia el comportamiento de los fluidos a escalas micrométricas.

Isotropic scattering: Condición de pared en el software COMSOL Multiphysics 5.5 donde las partículas rebotan contra una pared isotrópicamente en direcciones aleatoria y su energía cinética se conserva.

Disappear: Condición de pared en el software COMSOL Multiphysics 5.5 donde las partículas que tocan la pared no se muestran más.

Viscosidad dinámica: Es una medida de la resistencia a la fluencia de un fluido.

Resumen

Los cultivos celulares en 3D son una herramienta indispensable en el estudio de los mecanismos biomoleculares y biofísicos que pueden ser utilizados para la comprensión y el tratamiento de diferentes patologías en humanos, como el cáncer. Asimismo, el uso de software de simulación basado en el análisis numérico como COMSOL Multiphysics ha tomado gran relevancia para la fabricación de dispositivos microfluídicos donde se pueden realizar cultivos 3D para implementar Organs-on-chips (OOC), para imitar un entorno tumoral generado por esferoides. En este trabajo se determinó la concentración de biopolímeros como el colágeno tipo I y Matrigel para formular una matriz extracelular para el cultivo de células HeLa y la estimación de su viscosidad dinámica, junto con el diseño de una plataforma microfluídica en polidimetilsiloxano (PDMS). El diseño del dispositivo se realizó en SolidWorks, y después, utilizando COMSOL Multiphysics, se evaluaron parámetros como el flujo y la tensión de corte, para determinar cómo afectan estas variables al cultivo celular y la relevancia de la geometría de la plataforma. Este trabajo representa una base para el desarrollo de Organs-on-chips (OOC), así como aplicaciones en ingeniería de tejidos y tratamientos terapéuticos para el cáncer cervicouterino.

Palabras clave: Cultivo celular 3D, plataforma microfluídica, COMSOL, Cultivo celular HeLa, Matriz extracelular

Abstract

3D cell cultures are an indispensable tool in the study of biomolecular and biophysical mechanisms and can be used for the understanding and treatment of different pathologies in humans, such as cancer. Likewise, the use of simulation software based on numerical analysis such as COMSOL Multiphysics has taken great relevance for the fabrication of microfluidic devices where 3D cultures can be made to implement Organs-on-chips (OOC), to mimic a tumour environment generated by spheroids. In this work, the concentration of biopolymers such as collagen type I and Matrigel to formulate an extracellular matrix for HeLa cell culture and the estimation of their dynamic viscosity were determined, along with the design of a microfluidic platform in polydimethylsiloxane (PDMS). The design of the device was performed in SolidWorks, and then, using COMSOL Multiphysics, parameters such as flow and shear stress were evaluated to determine how these variables affect cell culture and the relevance of the platform geometry. This work represents a basis for the development of Organs-on-chips (OOC), as well as applications in tissue engineering and therapeutic treatments for cervical cancer.

Keywords: 3D Cell culture, microfluidic device, COMSOL, Hela culture, Extracellular Matrix

Hipótesis

Es posible formular matrices extracelulares para estudios de cultivos celulares basados en la simulación y análisis de sus propiedades morfológicas y comportamiento fluido.

Capítulo 1. Introducción

Los cultivos celulares *in vitro* han sido comúnmente usados en diferentes aplicaciones biomédicas como en la biología, la distribución de fármacos o la medicina regenerativa; los cultivos más usados son aquellos basados en capas 2D de polímeros o platos de vidrio, permiten el estudio de algunas funciones celulares y algunos componentes de un microambiente, sin embargo, las células se encuentran en un ambiente bidimensional que no es natural por lo cual, no se observan las interacciones que ocurren en ambientes nativos [1]. Una solución a esta problemática son los cultivos celulares 3D los cuales permiten crear ambientes biomiméticos en donde las células presentan interacciones similares a un ambiente nativo [2].

Un ejemplo es un microambiente tumoral, el cual es un medio intrincado y dinámico que contiene células de soporte, vasos sanguíneos y una matriz extracelular (MEC) lo que genera una combinación de señales químicas, físicas y biológicas que regulan la progresión de células cancerígenas o no cancerígenas, como la rigidez de la MEC [3]. La estructura de MEC no es estática, las células secretan componentes lo cual, permite un ambiente dinámico, entre las propiedades físicas que modula en las células son la adhesión celular, la proliferación y el ciclo celular [1]. Una aproximación para desarrollar un ambiente tumoral son los hidrogeles, los cuales son redes reticuladas de polímeros y pueden ser fabricados de materiales naturales y sintéticos según sea el caso, estos presentan propiedades como la viscoelasticidad, degradación y adhesión de células a red reticulada. Este tipo de materiales se han usado para el estudio del crecimiento de cáncer y metástasis [3].

El colágeno es uno componentes estructurales de la matriz extracelular, se puede encontrar en el tejido conectivo pero es común en la dermis, los tendones y los huesos [4] al igual que el Matrigel, el cual es una matriz extracelular natural que contiene elementos como laminina, colágeno IV y la entactina que permiten un ambiente para el cultivo celular [5].

La tecnología microfluídica conjunto con cultivos celulares 3D ha proporciona una nueva herramienta para el estudio de fármacos, aplicaciones biomédicas, análisis de toxicidad, tratamientos entre otras debido a las dimensiones que se pueden fabricar que asemejan a las estructuras encontradas en la naturaleza, se pueden crear gradientes químicos con pequeñas cantidades de reactivos y son fabricados en polímeros que son permeables a gases como oxígeno o dióxido de carbono que son necesarios para la proliferación de las células. Entre los polímeros para la fabricación de plataformas o dispositivos microfluídicos se encuentra el PDMS (polidimetilsiloxano) ya que es permeable a gases y al ser transparente permite las observaciones a través de microscopía [6].

De igual modo la simulación es una herramienta utilizada hoy en día en campos de estudio de como la biología o la medicina, debido a que permite la reducción de costos y tiempo que requieren estudiar los efectos de variables experimentales, esta herramienta se ha utilizado en el estudio de plataformas microfluídicas para el análisis de los diseños de las plataformas, el ingreso de las células, la distribución de fármacos y las variables que le afectan, y de esta modo optimizar la plataforma diseñada [7].

Capítulo 2. Planteamiento del problema

En los cultivos celulares 3D se facilita la comunicación entre células lo que hace que cada célula esté en contacto con células vecinas como en un ambiente *in vivo*, en tanto que en los cultivos 2D esto no está presente [6], otro de los limitantes de este tipo de cultivo es que no todos los tipos de células pueden adherirse y crecer en sustratos artificiales [8] mientras que los cultivos 3D ofrecen una compresión morfológica más aplicable del entorno celular [6], ya que estos incrementan la habilidad de mimetizar considerablemente el ambiente *in vivo* [2] por que la motilidad de las células es más compleja que en cultivos 2D. El uso de biopolímeros en la formulación de matrices extracelulares (MEC) retienen algunas funciones fisiológicas [9], como es el contenido de agua que permite un fácil transporte de oxígeno, nutrientes y desechos [10], además de que biopolímeros como el colágeno proporciona sitios de adhesión celular generando así interacciones célula-célula y célula-matriz [3]. Así mismo los sistemas microfluídicos junto con los cultivos celulares, permiten un microambiente dinámico para el cultivo de estas células, permitiendo que las células desarrollen características presentes en un sistema *in vivo*. Entre los materiales más utilizado en la fabricación de estos sistemas es el PDMS presenta permeabilidad a los gases como lo es el oxígeno el cual es indispensable para la supervivencia de las células [11]. Por lo tanto, en este trabajo se propondrá la formulación de MEC para simular una matriz extracelular de biopolímeros como base para el cultivo celular 3D de la línea celular HeLa, que funcione como soporte para la proliferación de este tipo de células generando un ambiente más aproximado al ambiente *in vivo*, las cuales serán probadas empleando el software especializado para microfluídica (COMSOL multiphysics).

2.1 Estado del Arte

El cultivo celular es una alternativa al uso de modelos animales y es una parte integral de los estudios en la investigación biomédica, que incluyen bioquímica, biología farmacocinética, así como ingeniería de tejidos [6]. Un ejemplo son los cultivos celulares 2D los cuales se han utilizado como modelos *in vitro* que se realizan en superficies planas como son cajas Petri, micropozos, y ahora micropatrones que ayudan a controlar la forma del cultivo. Sin embargo, en estos estudios 2D, la actividad celular puede variar considerablemente a una respuesta *in vivo*; para superar esta deficiencia se han hecho algunas propuestas para la implementación de cultivos celulares 3D, los cuales, hasta el momento, han tenido un impacto significativo en la proliferación, diferenciación y respuestas mecánicas de las células. En este sentido, K. Duval et al., 2016, observó que las células no solo deben inhibir la fuerza de tracción de la MEC si no la de las células vecinas [2]. De acuerdo con algunos reportes, los cultivos celulares 3D difieren bastante de los cultivos convencionales 2D en la interacción y mecánica celulares; de las características principales de los cultivos 3D es su capacidad de imitar el entorno *in vivo* por medio de elementos como la MEC [2] y algunos microcanales o membranas que pueden ser incorporadas al ambiente micrométrico con técnicas de microfabricación [12].

Los cultivos 2D han contribuido significativamente en el entendimiento de la biología celular, pero tiene limitaciones debido al crecimiento en sustratos 2D que no cuentan con la estructura que se presenta en un entorno *in vivo* y no todas las células epiteliales pueden adherirse y crecer en sustratos artificiales. Por lo cual los cultivo 3D se han desarrollado, debido a la arquitectura que permite mimetizar la matriz extracelular *in vivo* además de lograr que los cultivos expresen características más realistas en un entorno *in vivo* tales como migración y adherirse a las fibras de matriz extracelular. Los materiales que se utilizan con mayor frecuencia para la fabricación de esta son

materiales que se producen de manera natural como colágeno, fibrina, agarosa, laminina y gelatina así como materiales sintéticos como poli óxido de etileno (PED) o poli etilenglicol (PEG) [8].

Adicionalmente, la tecnología microfluídica ha crecido desde principios de 1990 con aplicaciones en los campos de la química, física, biología y especialmente en la investigación de células y sus interacciones debido a que permite una mejor manipulación y monitoreo [9] y ha surgido como alternativas a los modelos tradicionales de cultivo celular, combinando el cultivo celular con sistemas de flujo que imitan las condiciones y funcionalidades fisiológicamente relevantes de los órganos [12].

Recientemente, se han utilizado matrices a base de gel y sin gel para diversas aplicaciones en el campo de la biología para aplicaciones en regeneración tisular [6], como en el estudio de Choi et al., 2014 quienes desarrollaron un hidrogel de quitosano, el cual es un biopolímero que acompañado de colágeno tipo II y sulfato de condroitina, demostró que la MEC mejoró las propiedades mecánicas y celulares, el cual se empleó también para promover la regeneración del cartílago [13]. Por otra parte, el estudio realizado por M. Gargotti et al., 2018 del cultivo de células HeLa en colágeno cola de Rata Tipo I en tres diferentes concentraciones (1.5, 2 y 2.5 mg/mL) y a su vez se realizó un cultivo 2D, a fin de comparar la viabilidad de las células, donde se encontró que la células HeLa cultivadas en el colágeno mostraron ligeros aumentos de células en fases G2 y M correspondientes al inicio de la mitosis y la mitosis respectivamente en comparación con las células en el cultivo 2D [8].

La utilización de hidrogeles recientemente se ha vuelto popular para ofrecer a las células un microambiente 3D fisiológicamente más biocompatible. La composición de estos, determinan el éxito de los cultivos celulares 3D y estos a su vez dependerán de las necesidades y tipo de células a estudiar [2]. Así mismo, el proceso de miniaturización de los cultivos celulares con ayuda de la microfabricación puede sentar las bases para optimizar los estudios de cultivos celulares de interés biomédico, haciendo uso de microarquitecturas prediseñadas en sustratos biocompatibles para facilitar el estudio de células a un nivel más detallado que coadyuven en el desarrollo de sistemas como los Organs-on-chips, los cuales son dispositivos de cultivo de células en plataformas microfluídicas dispuestas para simular la fisiología a nivel de los órganos el cual es uno de los objetivos finales de los cultivos celulares 3D [9].

Entre los análisis que se realizan en plataformas microfluídicas se utiliza la dinámica de fluidos computacional o CFD (Computational Fluid Dynamic) la cual es una técnica de análisis numérico que emplea modelos y fórmulas para el análisis de sistemas fluidos y otros fenómenos asociados, también se puede utilizar en análisis de transferencia de calor y reacciones químicas. Esta técnica se ha convertido en una herramienta esencial en el diseño y optimización de productos, procesos y aplicaciones en ingeniería como mezcladores, estudios en la dispersión de contaminantes, análisis biomédicos entre otros [14]. Entre las ventajas que se presentan al utilizar esta herramienta, se puede resaltar la reducción de tiempo y costos en proyectos, debido a que se pueden realizar análisis de varias geometrías de un prototipo antes de fabricarlo, además, se pueden hacer predicciones de flujo donde puede ser complejo realizar medidas experimentales [14].

La simulación es una herramienta útil en el diseño de este tipo de plataformas, dada la flexibilidad que presenta para evaluar parámetros relevantes en esta, tal como lo desarrollo M. A. Hajari et al., 2021 donde diseñó una plataforma para el cultivo de los esferoides tumorales, realizando un análisis de las variables de velocidad de flujo, la trayectoria de las células de tumor cerebral (U-87) con un diámetro de $10\mu\text{m}$, la viscosidad del medio y la tensión de corte generada sobre los esferoides. En la figura 1 se muestra la distribución de las células en cuatro tiempos diferentes con una densidad de 5×10^6 células/ml, la viscosidad del medio se consideró de 0.0073 Pa.s con una velocidad de 120 $\mu\text{l}/\text{min}$ [7].

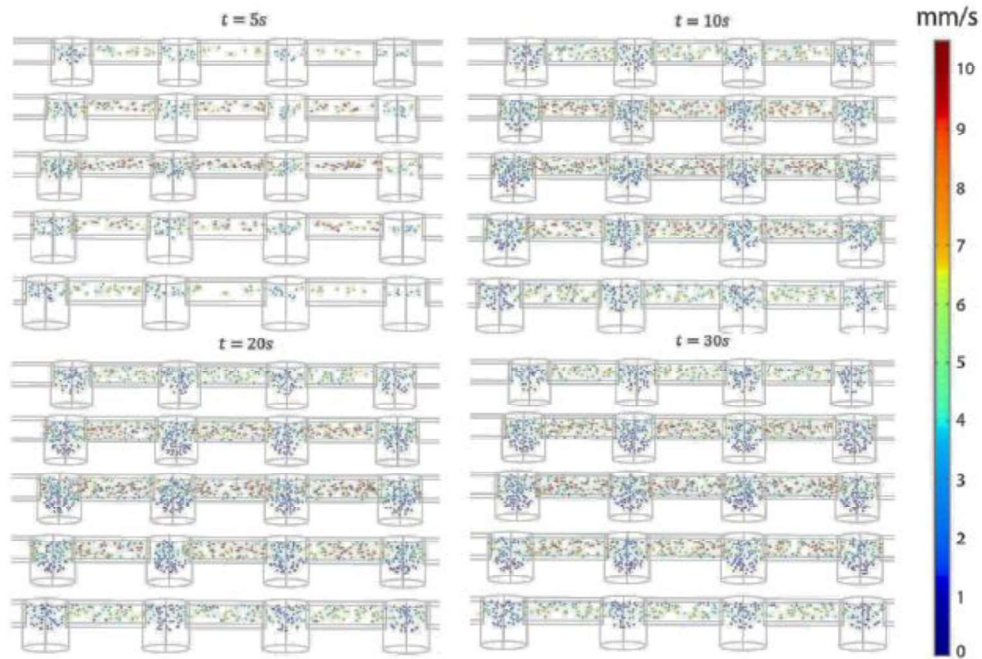


Figura 1. La distribución de las células en cuatros instantes de tiempo después de una carga de células[7].

Por otro lado, el enfoque de la simulación en cultivos celulares se encuentra la migración de las células, un ejemplo de esta es la simulación realizada por Gonçalves y Garcia-Aznar, 2021 donde realizo una simulación de células NCI-H1299 (células de carcinoma de pulmón) en una matriz extracelular para estimar la motilidad de las células en una matriz de colágeno (colágeno bovino tipo I) con tres concentraciones diferentes lo cual genero tres viscosidades diferentes (Figura 2) donde se observa que la simulación no tiene un comportamiento diferente a la experimental [15].

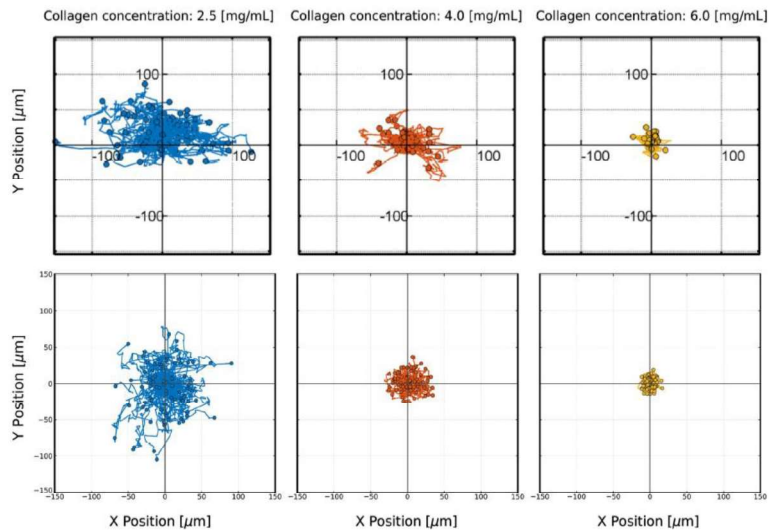


Figura 2. Motilidad de las células Arriba trayectorias obtenidas experimentalmente. Abajo trayectorias obtenidas por simulación [15].

2.2 Justificación

Los cultivos celulares 2D han sido usados para estudios *in vitro* de manera tradicional ya que son sencillos y eficientes, sin embargo, el comportamiento celular varía notoriamente en un entorno *in vivo* por lo cual el desarrollo de cultivos celulares 3D que asemejen este entorno pueden proporcionar resultados más aproximados al comportamiento celular real *in vivo* [2]. Para lograr un cultivo celular 3D primero se necesita crear la matriz extracelular (MEC) que pueden ser constituidas por polímeros naturales o sintéticos, la cual permite emular entornos *in vivo* como lo son ambientes tumorales [16]. Además, de que se pueden realizar estudios reproducibles y controlados de las respuestas de las células para diversos estudios como la evaluación de citotoxicidad o ciertas patologías [17]. Por otra parte, el cáncer cervicouterino (CaCu), es la segunda causa de cáncer más común en México y la tercera causa de muerte en todo el mundo. Constituye el 9% (529,800) del total de nuevos casos de cáncer y el 8% (275,100) del total de muertes de mujeres por cáncer en el 2008. Afecta a mujeres con desventaja económica, social y cultural y, por ende, es mucho más común en países en vías de desarrollo donde ocurre el 85%. En contraste en países desarrollados ocurre únicamente el 3.6% de nuevos casos [18]. Por lo anterior, los cultivos 3D cobran mayor relevancia en los estudios biomédicos y parte fundamental de estos cultivos es la formulación de una matriz extracelular que mimetice el entorno *in vivo* para el desarrollo de un cultivo celular 3D que en combinación con herramientas microfluídicas que puede proporcionar un modelo micrométrico de estudio para células de cáncer cervicouterino, por lo anterior es necesario hacer una formulación de MEC que garantice un mejor cultivo de los modelos de estudio en este caso para células HeLa

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Formular una matriz extracelular (MEC) con biopolímeros naturales como base en el cultivo tridimensional (3D), empleando una plataforma microfluídica para el análisis de sus propiedades morfológicas y comportamiento

2.3.2 Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones de los biopolímeros tales como colágeno, gelatina, quitosano y alginato para las formulaciones preliminares de la matriz extracelular de acuerdo con la revisión bibliográfica para determinar las variables del diseño experimental.
- Establecer los parámetros geométricos, biológicos y fisiológicos importantes para la simulación del ambiente in vivo de las células HeLa de acuerdo con la bibliografía consultada para fijar el diseño de la plataforma microfluídica de prueba.
- Elaborar el diseño de una plataforma microfluídica que sirva de soporte para la matriz extracelular con ayuda de softwares de diseño como SolidWorks y COMSOL Multiphysics para determinar los parámetros físicos relevantes como flujo y presión.
- Optimizar la formulación de la MEC empleando los parámetros geométricos y fluidicos en la plataforma COMSOL Multiphysics
- Realizar la simulación de flujo, presión y esfuerzo de corte de la plataforma microfluídica diseñada en conjunto con la propuesta de la formulación de la MEC optimizada.
- Ajustar las condiciones del modelo microfluídico en conjunto con la formulación de MEC seleccionada para proponer las condiciones óptimas para un cultivo 3D de células HeLa de acuerdo con los resultados de la simulación.
- Analizar los resultados obtenidos para la propuesta final del ambiente mimetizado como un modelo para proponer un cultivo celular 3D de las células HeLa.

Capítulo 3. Marco teórico

3.1 Cultivos celulares 3D (esferoides)

Los cultivos celulares 3D permiten una organización celular de un ambiente mimético por medio de una matriz extracelular (figura 3), que es clave ya que actúa como un soporte mecánico para facilitar su organización y proliferación, así como la interacción con otros tipos de células en el caso de los co-cultivos. Esta puede ser formulada con colágeno, elastina, glicoproteínas y polisacáridos, los cuales pueden formar geles con diferentes características fisicoquímicas y biológicas, como la resistencia mecánica, el transporte de nutrientes los cuales pueden regularse modificando la densidad de reticulación y mediante la adaptación con diversas moléculas como ligandos de adhesión o sitios de degradación [3].

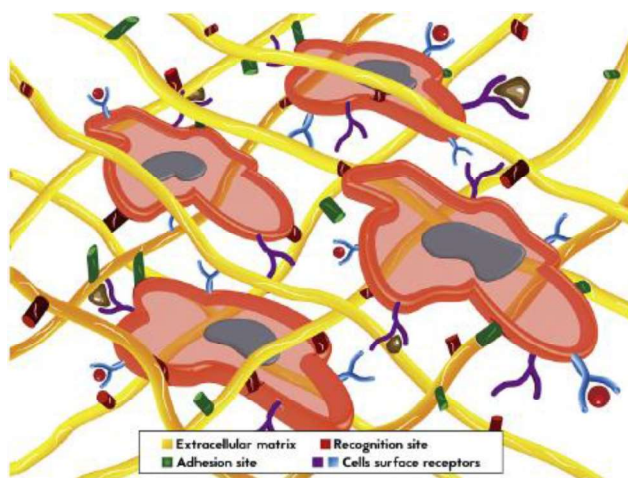


Figura 3. Interacción de las células con la matriz extracelular (MEC)[19].

La matriz extracelular juega un papel fundamental para asegurar un crecimiento, diferenciación y señalización de célula a célula, como menciona Saedi Garakani et al., 2020 [20], quien fabricó una MEC formulada con agarosa y quitosano con características biomiméticas para cartílago nasal; esta MEC mejoró la adhesión y proliferación celular de las células madre mesenquimales debido a la interacción célula-matriz [20].

Los cultivos celulares 3D en los cuales se incluyen esferoides, organoides o incluso tejidos humanos han demostrado tener mejor desempeño debido a la diversidad fisicoquímica, las interacciones célula-célula y célula-matriz comparado con los cultivos tradicionales 2D [7].

El término esferoide se refiere a agregaciones tridimensionales perfectamente redondas de células que están compuesta de múltiples células (epiteliales, mesenquimales, endoteliales, etc.). La compacidad de estos esferoides les permite tener características análogas a tumores *in vivo* dentro de estas se encuentra, el establecer una tasa en el gradiente de proliferación generando tres capas las cuales son [21]:

- *Capa de proliferación.* Una capa rápida de proliferación que comprende de cuatro a cinco estratos celulares exteriores ($60 \pm 10\mu\text{m}$ espesor), la cual mimetiza sitios adyacentes a los capilares inducidos por la angiogénesis
- *Capa inactiva.* Una capa intermedia inactiva e inerte
- *Núcleo necrótico.* Un núcleo hipóxico y necrótico que asemeja a sitios en tumores que se encuentran alejados de capilares sanguíneos (Normalmente aparecen en esferoides de gran tamaño con diámetros mayores de $500 \mu\text{m}$).

El intercambio de gases, nutrientes y fármacos en los esferoides se ve afectado debido a la permeabilidad limitada. Esto genera gradientes pronunciados y fisiológicamente relevantes particularmente [21], de nutrientes, metabolitos, catabolitos y oxígeno a lo largo del esferoide. A su vez las células presentes en el esferoide se encuentran en un arreglo concéntrico [22]. Así como movimientos celulares debido a la quimiotaxis en similitud a un tumor in vivo. Un ambiente ácido existe en el núcleo de esferoides de gran tamaño debido a algunas actividades anaeróbicas y en la producción de ácido láctico. De igual manera las células en cultivadas en esferoides pueden formar co-cultivo con diferentes tipos de células (Figura 4 D) [21].

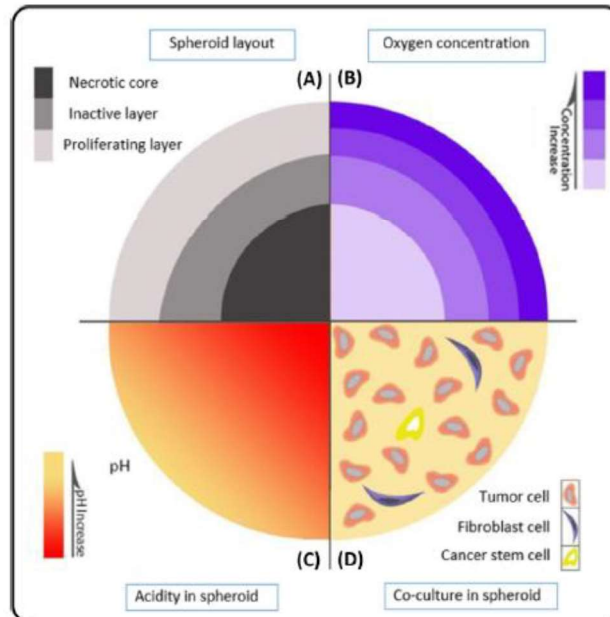


Figura 4. Características del esferoide tumoral. (A) Las tres capas celulares; (B) Gradiente de concentración de oxígeno; (C) Gradiente de pH que muestra la existencia de un ambiente ácido debido a las actividades anaeróbicas; (D) Muestra las células y una MEC circundante en un esferoide tumoral co-cultivado [21].

Algunos de los modelos tumorales que se han desarrollado para el cultivo de la línea celular HeLa han sido. Los esferoides desarrollados por Ma et al., 2012 plantando una suspensión del medio de cultivo con las células en un plato de 96 micropozos con fondo plano en donde se colocaron diferentes concentraciones de células generando diferentes tamaños los cuales mostraron una similitud en el aspecto nodular tumoral avascular in vivo y contiene un centro necrótico (figura 5). Con el uso de microscopía multifotónica 3D junto con la citometría de flujo convencional y las técnicas histológicas, notaron que el centro necrótico fue degradándose mientras el medio de cultivo estaba en contacto con la capa más externa (capa de proliferación) se asemejan a la células tumorales solidas in vivo cercanas a capilares ricos en nutrientes [23]. Así como los esferoides desarrollados en una plataforma microfluídica dinámica por técnica de emulsión por Wang et al., 2014 tomando

biopolímeros tales como el alginato y matrigel para generar una matriz extracelular fabricando así esferoides de un tamaño uniforme de $254 \pm 15.3 \mu\text{m}$ y con mayor resistencia a fármacos como el Vincristine, un fármaco antitumoral, comparándolo con un cultivo celular 2D [24].

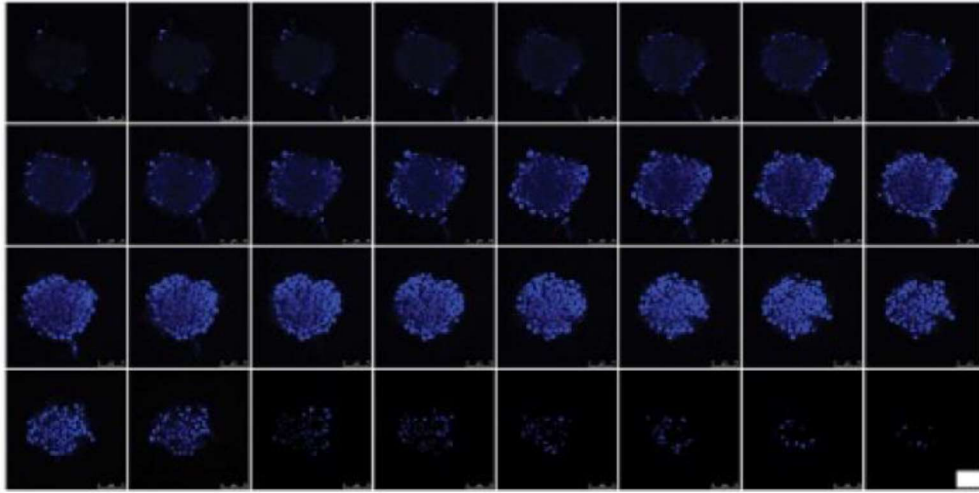


Figura 5. Imágenes 3D de esferoides HeLa. Las imágenes de barrido tomográfico se tomaron cada 5 mm de sección desde la parte superior a la inferior de un esferoide intacto[23].

Aunque los esferoides no son el único modelo de cultivo 3D, existen modelos que son impresiones 3D con el uso de biopolímeros como sustrato de impresión, tal como el modelo tumoral que desarrollo Zhao et al., 2014 los biopolímeros que se utilizaron fueron gelatina, alginato y fibrinógeno generando una red tridimensional para el cultivo. Se observó la formación de estructuras tumorales, esferoides redondos con superficies lisas y conexiones estrechas de células dentro del hidrogel 3D, mientras que las células cultivadas en placas de cultivo de tejidos 2D mostraron una morfología plana y alargada que no se asemeja a la morfología in vivo (figura 6)[16].

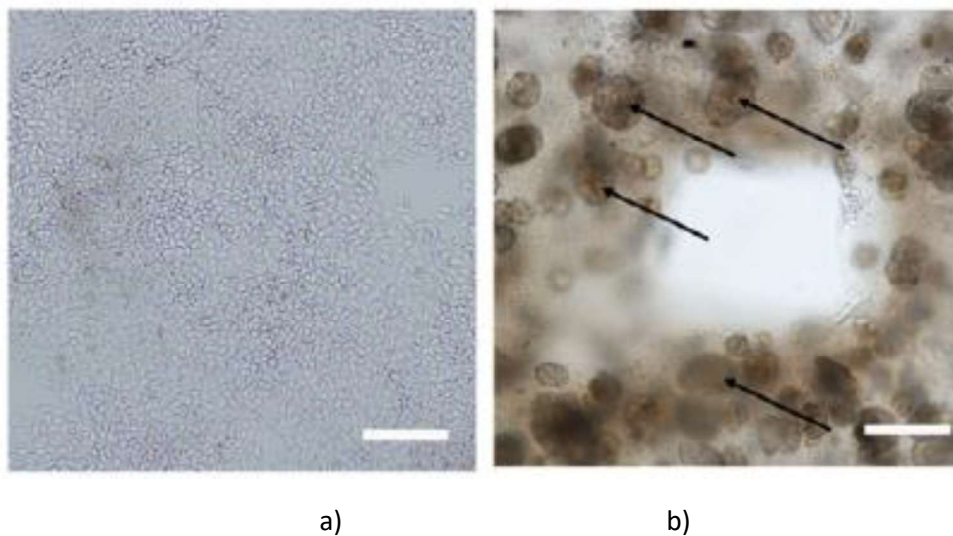


Figura 6. Morfología de las células en el octavo día de cultivo A) cultivo 2D b) cultivo 3D. Escala de la barra de $200 \mu\text{m}$ [16].

3.2 Biopolímeros

En tejido natural, la matriz extracelular (MEC) es el mayor componente del microambiente celular, no solo provee estructura y apoyo mecánico, si no también juega un papel en la regulación del comportamiento y función celular [25]. Los hidrogeles son el material preferido para desarrollar este tipo de matrices [9], además de que estos hidrogeles se combinan con células tumorales para la construcción de ambientes biomiméticos para el estudio de cáncer [3] debido a que permiten el aumento de las de las interacciones célula – célula y célula – matriz lo cual es una de las características básicas para la mimetización de un tejido para la formación de sitios tumorales avasculares y o regiones micro metastásicas in vivo y por lo tanto son muy útiles como modelo para estudiar los fenómenos biológicos de tumores [26].

En la naturaleza estos componentes se pueden extraer de diversas fuentes y pueden dividirse de acuerdo con sus características, la estructura química y composición. Existen tres principales clases de biopolímeros clasificados de acuerdo con la unidad de monómeros y la estructura de estos [27]:

- Polinucleótidos: estos son polímeros largos compuestos de 13 o más monómeros
- Polipéptidos: estos son polímeros cortos de aminoácidos.
- Polisacáridos: son estructuras de carbohidratos poliméricos linealmente

Los hidrogeles basados en biopolímeros consisten en espacios intersticiales y repetidos en redes reticuladas la cuales pueden alterar la forma y el volumen como respuesta a estímulos circundantes. Estos estímulos comprenden la carga eléctrica del solvente, pH, carga iónica, carga magnética del medio y la temperatura. Los hidrogeles debido a su naturaleza hidrofílica son capaces de mostrar atributos similares a tejidos vivos como máxima hidratación mostrando una rápida recuperación de la deformación. El mecanismo de transporte de fármacos o nutrientes es la permeabilidad del hidrogel y esta depende del tipo de polímero debido a porosidad que presenta[28].

La reproducibilidad de fabricación de estos hidrogeles es variable lo que conduce a la porosidad, resistencia mecánica y degradación [28] por lo cual en la tabla 13 (Anexo 1) se muestran algunas formulaciones y líneas celulares para la cuales fueron realizadas. Los biopolímeros con frecuencia en cultivos 3D son el colágeno tipo I, matrigel y alginato como se muestra en la tabla 13 (Anexo 1). Por cual son elegidos para el desarrollo de la formulación de la matriz extracelular.

Debido a las características que presentan estos las cuales de describen a continuación:

Colágeno tipo I

El colágeno es uno de los principales componentes estructurales de las matrices extracelulares, este se puede encontrar en los tejidos conectivos y órganos internos, aunque se encuentra con mayor frecuencia en la dermis, los tendones y huesos. El colágeno tipo I es un heterodímero compuesto de dos cadenas alfa 1 y alfa 2 que forma espontáneamente un andamio triple hélice a un pH neutro y 37 °C. Es ideal como sustrato para el cultivo de líneas celulares como hepatocitos, fibroblastos, ganglios espinales entre otras [29]. Este biopolímero forma redes para la adición de las células (figura 7) Song et al., 2020 formulo un hidrogel de colágeno tipo I cola de rata para el cultivo de la línea celular HO-8910PM, por medio de microscopia electrónica de transmisión se observó la red de nanofibras de un tamaño de 11.12 ± 0.5 nm [4].

El colágeno comercial tipo 1 50201 de ibidi® presenta un pH de 3.8 ± 0.4 , una densidad relativa de 1.01 g/cm^3 y una viscosidad aproximada de 1 a $30 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ [30]. Otro colágeno tipo I comercial por ThermoFisher modelo A1048301 presenta características similares como un pH de 3.5 [31]

Matrigel

El Matrigel, es una matriz extracelular natural que permite optimizar la arquitectura de los esferoides, así como la función y comportamiento celular [32]. Al igual que el colágeno, el Matrigel genera una red de fibras (figura 7) del estudio realizado por Song et al.,2020 se generaron nanofibras de un tamaño $8.5 \pm 1.25 \text{ nm}$ [4].

Existen algunos productos comerciales de Matrigel como el Matrigel® de Corning® 356234 el cual está formulado con estrato de membrana de tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que gelifica a temperatura ambiente lo que permite formar una auténtica membrana basal. Además, contiene laminina (~60%), colágeno IV (~30%), la entactina (~8%). Al igual que factores de crecimiento, colagenasas, activadores de plasminógeno. Esta matriz extracelular presenta un pH: 7.2 ± 0.2 y una rigidez de 70 Pa a 4.4mg/mL [5].

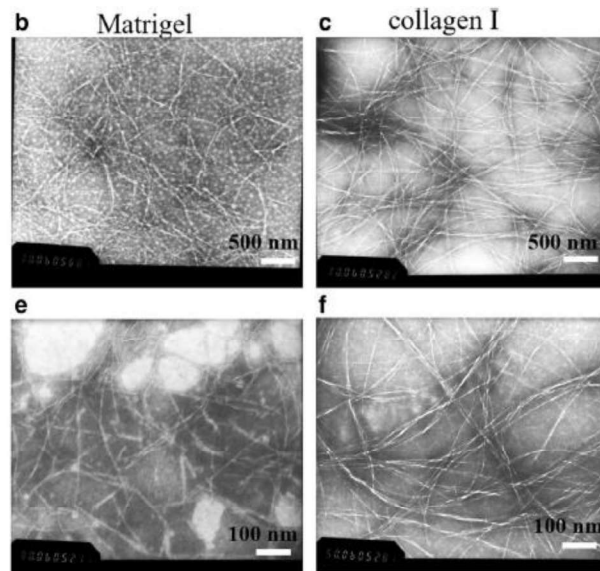


Figura 7. Imágenes TEM (microscopía electrónica de transmisión) con tinción negativa mostraron la morfología de las nanofibras [4].

El estudio de la mezcla de biopolímeros para la generación de un MEC ha llevado a Anguiano et al., 2020 a realizar dos formulaciones de colágeno y Matrigel con concentraciones distintas (figura 8), C (2mg/mL sin Matrigel), CM (2mg/mL de colágeno y 2mg/mL de Matrigel) y CM+ (2mg/mL de colágeno y 4mg/mL de Matrigel) donde se reporta que la matriz CM es la más apta para el cultivo de la línea celular H1299 correspondiente a cáncer de pulmón, ya que permite la expresión de integrinas y la actividad de las metaloproteinasas [33].

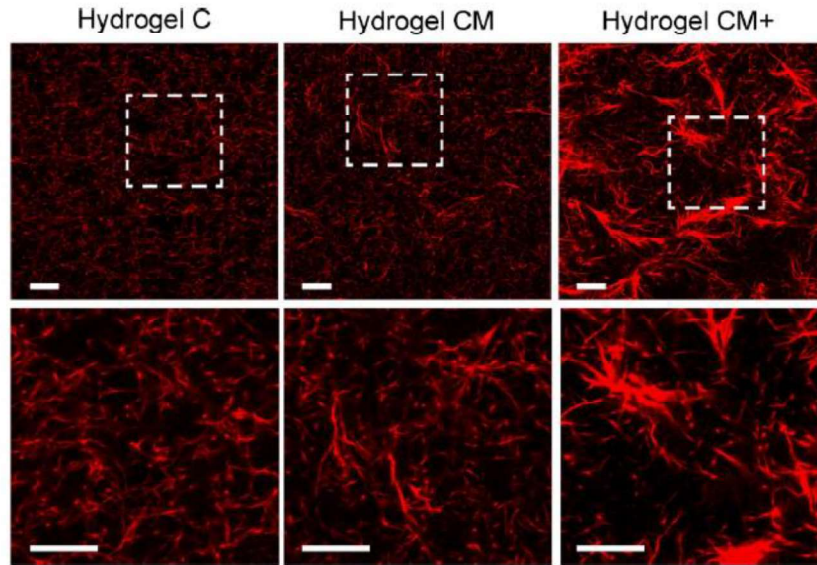


Figura 8. Microscopía de fluorescencia confocal obtenidas de los hidrogeles C, CM y CM+ marcados con TAMRA. Los recuadros blancos muestran áreas representativas ampliadas (Escala barra = 10 μm) [33].

Alginato

Los alginatos están en el grupo de los polisacáridos naturales que pueden ser extraídos de algas pardas o producidos por bacterias. En general, los hidrogeles de alginato se pueden formar por reticulación química y física, son altamente versátiles y si bien las células no pueden interactuar específicamente con las redes de alginato, existen algunas técnicas para facilitar la adhesión celular como el injerto de “bioactivos” como péptidos adhesivos como la integrina[25]. El alginato (sigma; W201502) Presenta un pH de 5 a 8 y una viscosidad de 0.005 a 0.04 Pa·s. [34] otro alginato que se utiliza debido a su baja viscosidad es (sigma; A0682) el cual presenta una viscosidad de 0.004 a 0.12 Pa·s [35].

Un ejemplo de un hidrogel de alginato y elastina formulado en una proporción de 2:1 por Silva et al., 2018 para el cultivo de fibroblastos dérmicos humanos, se observó por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus singlas en inglés) que el hidrogel es poroso (figura 9) lo que permite la difusión de oxígeno y nutrientes. Un análisis realizado para determinar las propiedades mecánicas de la formulación mostró que existía una reducción en las propiedades viscoelásticas debido a la degradación, la cual estaba más presente en el hidrogel de alginato con elastina [36].

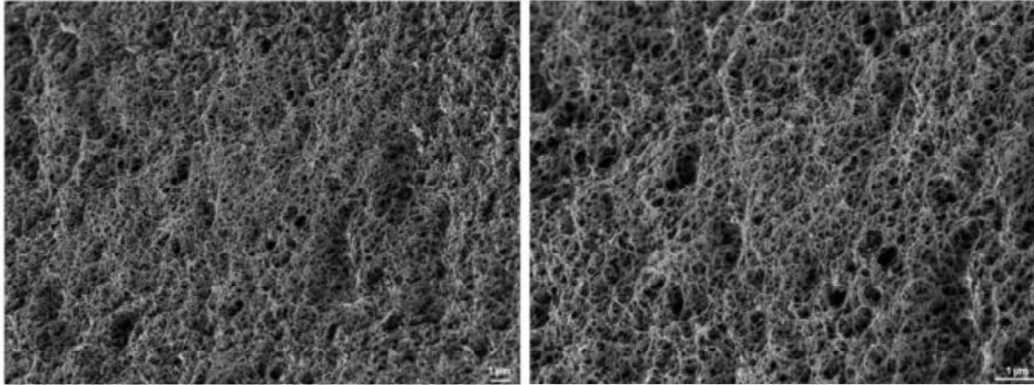


Figura 9. Redes formadas del alginato. Imagen de la izquierda hidrogel de alginato e imagen de la derecha alginato con elastina [36].

3.3 Diseño experimental central compuesto

El diseño de experimentos es esencial para la planificación de un experimento de manera que las conclusiones que se obtengan sean relevantes y estas sean alcanzadas de forma eficiente, económica y reproducible. Los experimentos con factores completos en arreglos están ajustados para determinar la extensión en la cual muestra un cambio en la respuesta y notar que factor provoca este cambio, así como el nivel de este. El diseño central compuesto (DCC) o diseño de composición central es muy utilizado debido a su gran flexibilidad: ya que se puede construir a partir de otros tipos de diseños como, diseños factoriales o fraccionarios. Este diseño se compone de tres puntos [37]:

- Una parte factorial
- n_0 puntos o repeticiones al centro del diseño
- Dos puntos sobre cada eje a una distancia alfa del origen. Estos puntos se les denomina porción axial, la manera en la que se ensamblan estos se puede ver en la figura 10.

Con k factores el número total de corridas experimentales que está determinado por la siguiente expresión $N = 2^k + 2k + n_0$. El número de corridas al centro y la distancia de los puntos axiales deben escogerse de manera adecuada, dependiendo de las propiedades que se quieren medir en el diseño experimental central compuesto, en la siguiente tabla 1 se muestra cómo se calculan los puntos alfa [37].

Tabla 1. Características de diseños experimentales [37]

Tipo de diseño	Descripción	Modelo matemático para la obtención de alfa y valor de alfa
Rotable	Los puntos α se colocan a una distancia única para todos los puntos haciendo que la varianza de la respuesta sean la misma para todos. Donde F es el numero de puntos de la parte factorial.	$\alpha = \sqrt[4]{F}$

Ortogonal	Los puntos α se colocan a una distancia axial lo que asegura que todos los términos sean ortogonales.	$\alpha = \sqrt[4]{\frac{(\sqrt{2k + n_0 + F} - \sqrt{F})^2 F}{4}}$
Rotable y ortogonal	Para alcanzar las dos propiedades anteriores. Se tienen que cumplir las dos relaciones	$\alpha = \sqrt[4]{F} \quad y \quad n_0 \approx 4\sqrt{F} + 4 - F$
Rotable y de precisión uniforme	En este diseño se toma en cuenta que la varianza debe ser constante además de que se deben cumplir las 2 relaciones, donde λ_4 es un valor constante (tabla 2)	$\alpha = \sqrt[4]{F} \quad y \quad n_0 = \lambda_4(\sqrt{F} + 2) - F - 2k$

Tabla 2. Valores de la constante λ dado el número de factores k [37].

k	2	3	4	5	6	7	8
λ_4	0.7844	0.8385	0.8704	0.8918	0.9070	0.9184	0.9274

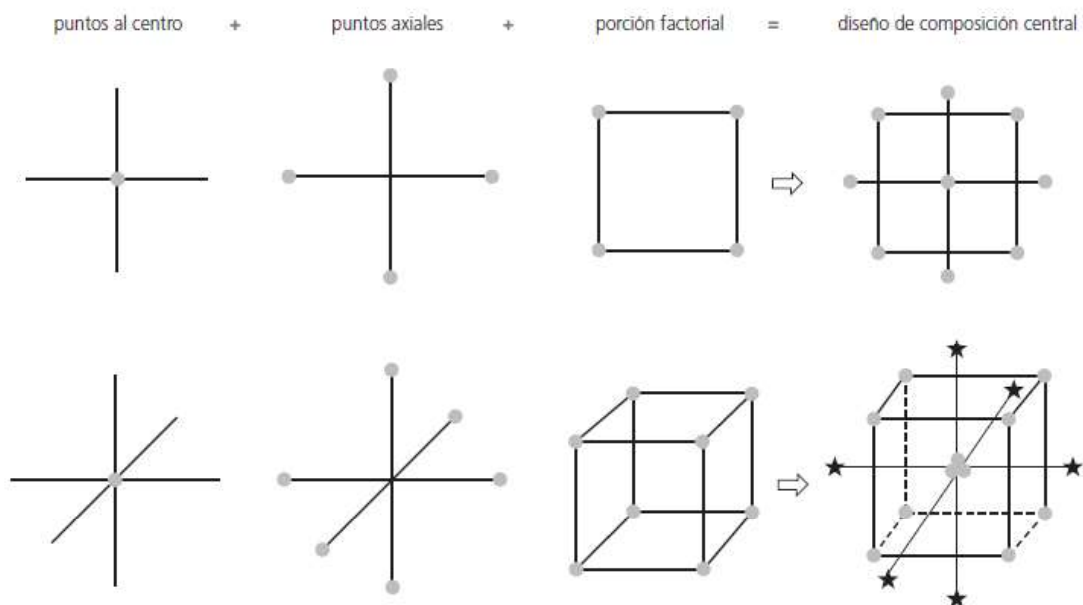


Figura 10. Representación gráfica de un diseño central compuesto de 2 y 3 factores [37].

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una estrategia experimental y de análisis que permite resolver y encontrar las condiciones de operaciones óptimas de un proceso. Para genera un diseño experimental tienen que existir algunas propiedades deseables que se cumplan en la MSR [37]:

1. Generación de una distribución satisfactoria de los puntos experimentales sobre la región experimental.
2. El diseño debe requerir un número mínimo de corridas experimentales.
3. El diseño debe permitir que otros diseños de orden mayor se construyan a partir de él.
4. El experimento debe permitir la detección de la falta de ajuste, para lo cual se requieren repeticiones al menos del centro del diseño.

5. El diseño debe proporcionar un estimado de la varianza del error, lo cual se logra con repeticiones del punto central.

Esta metodología fue utilizada por Bardajee et al., 2016 para la optimización de la extracción de rodamina en medios acuosos por medio de un hidrogel nanocompuesto de plata, donde este diseño de experimentación permitió descubrir que la cantidad de absorbencia y el tiempo de extracción, sabiendo que factor y en qué nivel tenía un efecto significativo [38].

Otro ejemplo del uso de esta metodología para el desarrollo de un hidrogel transdérmico etosomal con carvedilol para un efecto antihipertensivo desarrollado por P. R. Amarachinta et al., 2021, donde con el uso de diseño central compuesto (DCC) tomando como variables de entrada la concentración de lípidos, etanol y glicol de propileno y variables de salida el tamaño del vehículo, el porcentaje del fármaco y el fármaco remanente en hidrogel de este modo se determinó que una concentración alta de etanol mejora la difusión de fármaco en la piel [39].

3.4 Dinámica de fluidos computacional

Como se mencionó anteriormente la dinámica de fluidos computacional es una técnica que permite estudiar el comportamiento de los fluidos. Independiente del código computacional existen tres etapas esenciales en el uso de dinámica de fluidos computacional (figura 11) [14].



Figura 11. Etapas esenciales en CFD [14]

Uno de los elementos claves en el uso de la dinámica de fluidos computacional es la malla o el mallado ya que esta influye en el resultado de la simulación. Las mallas se pueden clasificar en estructurada o no estructurada (figuras 12), en el caso de la estructurada se caracteriza por el uso de geometrías como rectángulos, hexaedros o paralelepípedos, una de las principales ventajas es la ortogonalidad entre los elementos de la malla, esta es comúnmente usada en geometrías definidas. Por otra parte, la malla no estructurada se caracteriza por el uso de geometría del elemento prismático, tetraédrico o poliédrica

y esta permite mayor flexibilidad en el uso de geometrías complejas de los modelos, así como la utilización de recursos computacionales [14].

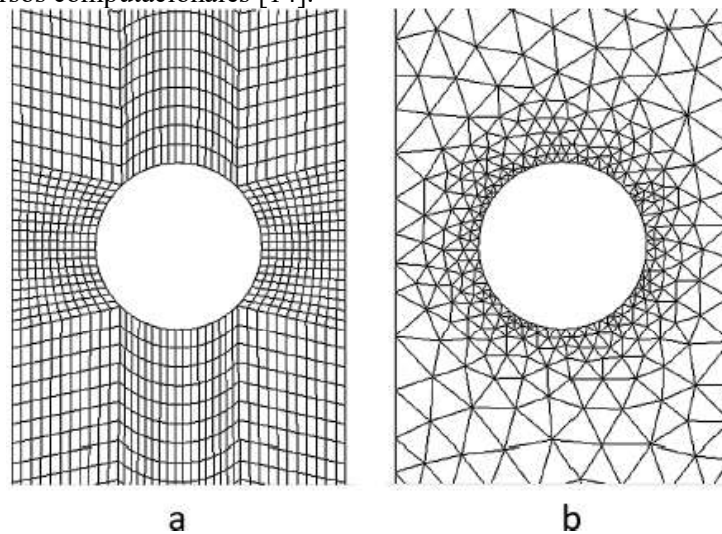


Figura 12. Tipos de malla: (a) malla estructurada de elementos hexaédricos; (b) malla no estructurada tetraédrica [14].

COMSOL Multiphysics es un software de simulación de elemento finito con múltiples aplicaciones debido a que se pueden agregar diferentes ramas de la física, química, mecánica y biología en un solo modelo. Las simulaciones con este software proporcionan un enfoque diferente en este complejo proceso, factores como la geometría del canal, el radio del canal, la velocidad de flujo, la forma, la densidad del flujo juegan un papel importante en el tamaño de los elementos a probar y la interacción que pueden tener con las células y los componentes del sistema de cultivo [40].

Un ejemplo de la utilización de CFD en el ámbito biomédico, es la investigación desarrollada por Zhao et al., 2021 donde se desarrolla un modelo de estenosis excéntrica y concéntrica, para la evaluación de la tensión que presentan las paredes de los vasos sanguíneos debido al flujo de sangre (figura 13), además del costo computacional que requiere este tipo de simulaciones es alto por lo cual los autores mostraron que tomar la sangre como un fluido newtoniano es una buena aproximación para entender la tensión que sufren las paredes de los vasos y reduce el costo computacional [41].

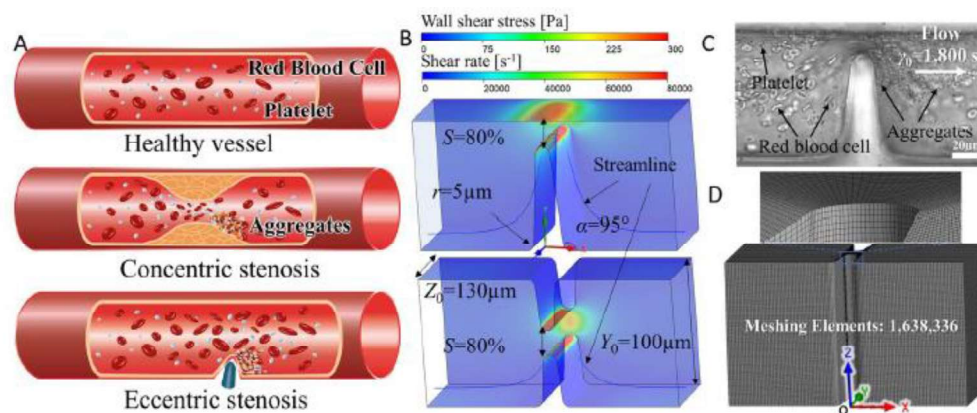


Figura 13. Estenosis excéntrica y concéntrica. A) Vaso sanguíneo sano, estenosis excéntrica, estenosis concéntrica B) Mapas de contorno CFD en los canales microfluídicos de estenosis excéntrica y concéntrica C) Imagen de microscopía de contraste diferencial de biomecánica D) Esquema de mado de volúmenes finitos de ANSYS para el modelo de estenosis concéntrica. Todo el canal microfluídico se mado en 1,638,336 hexaédricos [41].

Por otra parte, el trabajo realizado por Truong et al., 2016 donde se realiza análisis del gradiente de difusión del factor de crecimiento epidérmico que funciona como un quimioatrayente en una plataforma microfluidica para la línea celular de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), donde se observa la distribución de la concentración a través del tiempo (figura 14) y de forma experimental se comprueba la movilidad de las células [42].

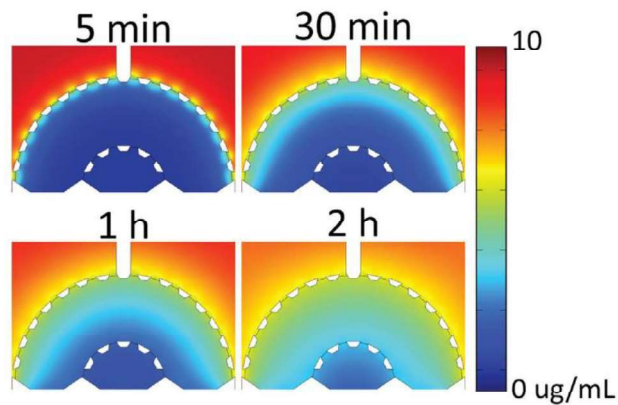


Figura 14. Simulación de una concentración ($10 \mu \text{g/mL}$) a través del dispositivo demuestra el perfil de gradiente de concentración en el tiempo [42].

3.4.1 Fluidos

El comportamiento del fluido bajo la acción de fuerzas esta estudiado por la mecánica de fluidos, sin embargo, el comportamiento viscoso de los fluidos está determinado por la reología que estudia el flujo y deformación de los materiales [43].

Los fluidos los podemos clasificar en; fluidos no newtonianos y newtonianos (figura 15) estos se convierten en una parte fundamental de la investigación de los dispositivos microfluidicos debido a la fiabilidad y las aplicaciones en biomedicina y biotecnología. La generación de gotas o esferoides con tamaños modificables se ha utilizado en aplicaciones como distribución de fármacos y transporte de nanopartículas, sin embargo, controlar el tamaño y distribución requiere de optimización de condiciones de flujo e interacciones con el microambiente de prueba [44].

Los fluidos newtonianos, se definen como los fluidos para los que los esfuerzos de corte son linealmente proporcionales al cambio de deformación, entre los fluidos newtonianos más comunes se encuentran el agua, aire, queroseno, gasolina y aquellos líquidos que tengan una base de aceite, mientras que los fluidos no newtonianos son donde los esfuerzos de corte no se relacionan linealmente con el cambio en la deformación ejemplos de estos son la sangre, pastas y polímeros. Algunos de los fluidos no newtonianos reciben el nombre de fluidos de adelgazamiento por corte debido a que mientras más deformación presente el fluido, menos viscoso se vuelve un ejemplo es la pintura. Por otro lado los fluidos de engrosamiento por corte presentan un comportamiento opuesto entre más deformación presente más viscosos se vuelve, un ejemplo es la arena movediza por ultimo los fluidos plásticos de Bingham estos necesitan de un esfuerzo finito para comenzar a fluir como en el caso del dentífrico o pasta de dientes [45].

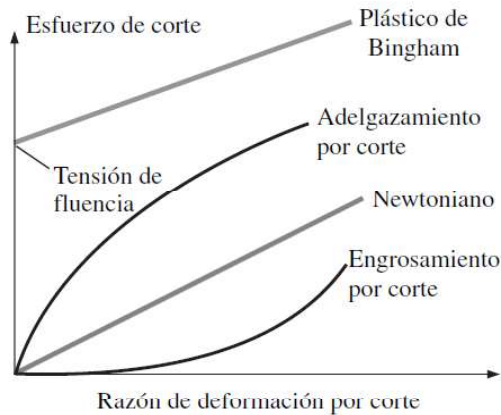


Figura 15. Comportamiento reológico de fluidos: esfuerzo de corte en función de la deformación [45].

Un parámetro importante en los fluidos es la viscosidad, la cual es una propiedad de los fluidos que se puede entender como la resistencia interna de un fluido al movimiento, esta depende de la temperatura, así como de la presión que se le aplique a pesar de que la contribución de esta es menor. Por lo cual para los líquidos la viscosidad dinámica es independiente de la presión y suele despreciarse su contribución, la generación de la viscosidad en los líquidos se debe a la cohesión de las moléculas [45].

Un ejemplo de la relación entre estas variables se muestra en el estudio realizado por M. A. Hajari et al., 2021 que se mencionó previamente donde con la utilización de un medio de cultivo el cual se consideró como un fluido newtoniano cuya viscosidad que presenta es de $0.78 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Se evaluó en una plataforma microfluídica a base de micropozos la distribución de células en esta se encontró que no fue uniforme debido a la baja viscosidad y al aumentar el flujo incrementa la tensión de corte que sufren las células. Y se encontró que con una viscosidad de $2.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ se puede obtener una distribución uniforme con un flujo promedio [7].

La viscosidad de un fluido newtoniano se ve reflejada en el esfuerzo de corte que experimenta debido a un gradiente de velocidad descrito por un ecuación 1 que muestra una relación lineal [45].

$$\tau = \mu \frac{du}{dx} \quad (1)$$

Donde μ es la viscosidad, τ es el esfuerzo de corte y $\frac{du}{dx}$ es la relación que muestra el cambio de velocidad del fluido [45].

El comportamiento de del flujo de fluidos está determinado por medio de la ecuación de Navier-Stokes que se describe en la sección 3.4.2 considerando que es un fluido incompresible y newtoniano [45].

3.4.2 Navier Stokes

El comportamiento de fluidos incompresibles dentro de plataformas microfluídicas y fuera de ellas se describe por medio de la ecuación de Navier-Stokes donde fue derivada entre 1827 y 1845. Esta ecuación representa la conservación de masa y momento [46]. Esta ecuación se ha utilizado para entender el comportamiento en plataformas microfluídicas como la diseñada por Behroodi et al., 2020, donde se observaron los perfiles de velocidad a través de esta [47].

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} = -\nabla P + \mu \nabla^2 u + \rho g \quad (2)$$

$$\rho \nabla \cdot u = 0 \quad (3)$$

Donde ρ es la densidad del fluido, u es la velocidad del fluido, P es la presión del fluido, μ es la viscosidad del fluido. El termino $\rho \frac{\partial u}{\partial t}$ describe la inercia que sufre el fluido, ∇P las fuerzas que son provocadas por la presión en las que se encuentra el fluido, $\mu \nabla^2 u$ describe los esfuerzos de corte que se presenta en las direcciones que está siendo el fluido y el termino ρg describe la contribución de la gravedad del fluido [48].

La ecuación 3 es conocida como la ecuación de la continuidad, donde se describe que el fluido tiene una divergencia de cero: la cantidad de flujo que entra es la misma que sales y se aplica a fluidos compresible e incompresibles. Esta ecuación permite desarrollar la ecuación de Navier-Stokes [48].

3.4.3 Movimiento de células dentro de un fluido

La distribución de las células dentro de un fluido puede aproximarse por medio del modelo de Euler-Lagrange, este modelo se ha aplicado para determinar el movimiento de las células en un fluido como lo reporta M. A. Hajari et al., 2021, donde simuló el movimiento de las células en una plataforma microfluídica considerando las células como esferas sólidas, la parte de Euler del modelo esta descrita por la ecuación de flujo de Navier-Stokes que se mencionó previamente [7]. La parte descrita por Lagrange es el movimiento de las células que se describe por la siguiente ecuación

$$m_p \frac{d\vec{u}_p}{dt} = \vec{F}_{Dr} + \vec{F}_{Gr} + \vec{F}_{Br} + \vec{F}_s \quad (4)$$

Donde \vec{F}_{Dr} , \vec{F}_{Gr} , \vec{F}_{Br} y \vec{F}_s se refiere a la fuerza de arrastre, fuerza gravitacional, fuerza browniana y fuerza de sustentación de Saffman (Figura 16), m_p es la masa de la partícula [7]. A pesar de que la fuerza de flotabilidad está presente en la movilidad de las partículas, no se considera en esta aproximación su aportación en escalas pequeñas no es significativa[49].

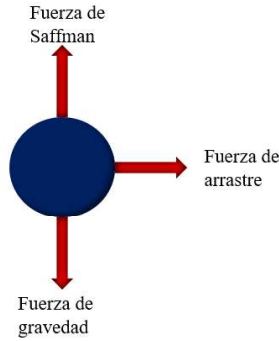


Figura 16. Esquema de fuerzas que experimenta la particulada debido al fluido.

La fuerza de arrastre de partículas en una fase continua se determina con el modelo de fuerza de arrastre de Schiller-Naumann [7]. Los modelos de fuerza de arrastre son utilizados para obtener información sobre los cambios de momento de las partículas sufren entre las fases de los fluidos, el modelo de Schieller-Naumann se utiliza en partículas sólidas en uno o más fases [50].

$$\vec{F}_{Dr} = \frac{1}{\tau_p} m_p (\vec{u}_f - \vec{u}_p) \quad (5)$$

Donde m_p representa la masa de la partícula, \vec{u}_f velocidad del fluido, \vec{u}_p velocidad de la partícula y τ_p tiempo de repuesta que se calcula de la siguiente manera [7].

$$\tau_p = \frac{4\rho_p d_p^2}{3\mu C_d Re_r} \quad (6)$$

Re_r es el numero relativo de Reynolds este describe el comportamiento entre las partículas y el fluido y C_d es el coeficiente de arrastre y se definen como [7]:

$$Re_r = \frac{\rho_f |\vec{u}_p - \vec{u}_f| d_p}{\mu_f} \quad (7)$$

$$C_d = \frac{24}{Re_r} (1 + 0.15 Re_r^{0.687}) \quad (8)$$

d_p es el diámetro de la partícula, μ_f es la viscosidad de dinámica del fluido, ρ_f la densidad del fluido, u_p es la velocidad de la partícula y u_f es la velocidad del fluido. Y la fuerza gravitacional se calcula como [7].

$$\vec{F}_{Gr} = m_p g \frac{(\rho_p - \rho_f)}{\rho_p} \quad (9)$$

Donde m_p es la masa de la partícula, g es la gravedad, ρ_p es la densidad de la partícula y ρ_f es la densidad del fluido.

El movimiento estocástico de las partículas ocurre debido a las colisiones constantes entre las partículas y las moléculas alrededor debido a la flujo, se considera como el movimiento Browniano el cual es modelado por el ruido blanco gaussiano aleatorio [7], el cual se describe por la siguiente expresión

$$\vec{F}_{Br} = \xi \sqrt{\frac{12\pi K_B \mu T r_p}{\Delta t}} \quad (10)$$

Donde ξ es el número aleatorio gaussiano con media cero independiente de la varianza unitaria, r_p es el radio de la partícula, T es la temperatura, K_B es la constante de Boltzmann y Δt el paso de la simulación [7].

Cuando las partículas viajan por medio de un fluido la fuerza de arrastre hace que dirijan en la dirección del fluido, pero existe una fuerza que hace que las partículas regresen a su posición de equilibrio y esta es la fuerza de sustentación. La fuerza de sustentación de Saffman es aquella donde se ejerce fuerza sobre la partícula haciendo que retroceda provocando así un giro en la partícula [49]. Esta fuerza se tomó en cuenta en la simulación de distribución de nanopartículas y células de oro en una plataforma microfluídica fabricada por Hajari et al., 2021 [7].

Está definida como:

$$\vec{F}_s = -81.2 L_v r_p^2 \sqrt{\mu \rho_f \frac{|\vec{u}_f - \vec{u}_p|}{|L_v|}} \quad (11)$$

$$L_v = (\vec{u}_f - \vec{u}_p) \times [\nabla \times (\vec{u}_f - \vec{u}_p)] \quad (12)$$

Donde 81.2 es una constante, ρ_f la densidad del fluido, r_p es el radio de la partícula, u_p es la velocidad de la partícula y u_f es la velocidad del fluido.

La deposición de las células en micropozos depende de la velocidad, la viscosidad y la densidad del fluido [21]. La viscosidad del fluido está relacionado directamente con la tensión de corte que sufren las células [51], Las fuerzas que experimentan (gravedad y fuerza arrastre) las células en un fluidos son proporcionales a una cierta viscosidad y flujo [7].

3.5 Migración de las células en una matriz extracelular (MEC)

La migración de las células a través de una matriz extracelular está regulada por la densidad y viscosidad de la que esta formulada, en cultivos 3D además de regular la migración de las células también modifica la arquitectura de la MEC [15].

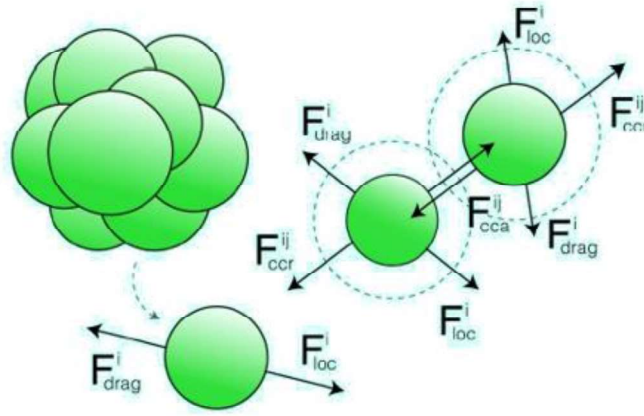


Figura 17. Diagrama de fuerzas presentes las células en la migración [15].

En la figura 17 se muestra un diagrama de las fuerzas que están presentes en la célula dentro de la matriz extracelular. Tomando en consideración como afectan las fuerzas se genera la siguiente ecuación [15].

$$0 \approx \sum_{j \in N(i)} (F_{cca}^{ij} + F_{ccr}^{ij}) + F_{drag}^i + F_{loc}^i \quad (13)$$

Se puede considerar la ecuación en equilibrio tomando como un sistema sobre amortiguado como lo realizo Gonçalves y Garcia-Aznar, 2021. Donde F_{cca}^{ij} es fuerza de atracción, F_{ccr}^{ij} es la fuerza de repulsión, F_{drag}^i es la fuerza de disipación (la adhesión a la MEC) y F_{loc}^i es la fuerza de locomoción [15].

La fuerza de disipación se define como:

$$F_{drag}^i = -\mu V_i \quad (14)$$

Donde V_i es la velocidad de la célula y μ representa la viscosidad de la MEC, considerando que la densidad de la MEC y la viscosidad dinámica permanecen uniformes podemos sustituir la ecuación 14 en la ecuación 13 que nos permite estimar la velocidad de las células [15]:

$$V_i = \frac{1}{\mu} (\sum_{j \in N(i)} (F_{cca}^{ij} + F_{ccr}^{ij}) + F_{loc}^i) \quad (15)$$

Para el desarrollo de este trabajo se considera la motilidad de una sola célula por lo cual las fuerzas de atracción y repulsión se consideran cero facilitando el cálculo de la velocidad ya que solo depende de la viscosidad de la MEC.

$$V_i = \frac{F_{loc}^i}{\mu} \quad (16)$$

3.6 Plataformas microfluídicas

Los avances en sistemas microfluídicos han contribuido en la investigación, desarrollo y formación de esferoides. De las ventajas significativas de sistemas microfluídicos incluyen proporcionar mezclas controladas, concentraciones de químicos, menor consumo de reactivos, perfusión continua, control preciso de la presión y tensión de corte sobre las células. Una característica notable de los sistemas microfluídicos es que las células pueden ser cultivadas en un microambiente dinámico como en un entorno tisular [21] y con tensión de corte fisiológico sobre tejidos y superficies para mimetizar un ambiente [7].

Dentro de las tecnologías de microfabricación, los dispositivos microfluídicos basados en la encapsulación de las células por esferoides en hidrogeles tridimensionales han obtenidos mayor atención debido a las ventajas que ofrecen [24, 52] :

1. Generación rápida y de alto rendimiento de los esferoides de hidrogel cargadas con células que permite reducir la mano de obra.
2. El cultivo de células miniaturizadas en esferoides permite un transporte eficiente de oxígeno, nutrientes y metabolitos para asegurar la viabilidad de las células.
3. La matriz de hidrogel con diferente permeabilidad puede ser usada para ajustar la propiedad del esferoide de hidrogel para proteger a las células de una respuesta inmunológica del huésped.
4. Pequeñas muestras de volumen conducen a una gran eficiencia en reactivos químicos
5. Alto rendimiento en la síntesis de especies biológicas y medicamentos.
6. Preciso control y monitoreo de las muestras.

Dentro de las plataformas microfluídicas el flujo puede ser laminar o turbulento. El flujo laminar es caracterizado por ser constante y suave mientras que en el flujo turbulento se generan vórtices y fluctuaciones en el flujo [52]. Uno de los factores importantes en el diseño de una plataforma microfluídica es la difusión la cual es definida como el proceso de la dispersión de las moléculas de la región de alta concentración a una de menor concentración por el movimiento Browniano dando como resultado la mezcla gradual de los fluidos, lo cual es un factor importante en la administración de fármacos y/o nanopartículas para un tratamiento directo [52].

Los dispositivos microfluídicos de flujo continuo que forman y cultivan esferoides en el mismo dispositivo se les conoce como chips microfluídicos de formación de esferoides (μ SFC) aunque existen una gran variedad se pueden dividir en dos principales categorías [21]:

- 1) Los que utilizan técnicas basadas en emulsión
- 2) Los que utilizan micropozos o microestructuras en forma de U

Dentro de las técnicas basadas en emulsiones, los generadores de esferoides han sido objeto de estudio debido a la uniformidad y el tamaño de los esferoides producidos, así como su funcionamiento continuo de alto rendimiento [21].

En esta técnica se han utilizado diferentes líquidos para encapsulación de las células, así como diferentes configuraciones para lograrlo. Algunas de estas son

- Células en una suspensión oleosa, células en hidrogel y aceite.
- Células en suspensión, aceite y medio de cultivo.
- Células en suspensión, en hidrogel y medio de cultivo.

Una de las configuraciones usadas con frecuencia es la de células en suspensión, hidrogel y medio de cultivo debido a que mejora la uniformidad de los esferoides y atrapa a las células dentro de esferoide más fácilmente según lo que reportan K. Alessandri et al., 2013 y L. Yu et al., 2015 [21].

El alginato es uno de los hidrogeles que se usa con frecuencia en estas técnicas y se ha encontrado que las concentraciones ideales están en el rango de 1.5%(v/v) a 2%(v/v) ya que permite la formación de esferoides, no obstante, el usar solo alginato hace que se comprometa la proliferación celular y las interacciones célula-célula, esto se puede solucionar con la adición de otros hidrogeles como el Matrigel o colágenos ya que estos permiten mejora la mimetización del ambiente in vivo [21].

Uno de los factores claves para la formación de esferoides uniformes es la velocidad del flujo ya que con esta los diámetros son ajustados así como la tensión de corte que pueden sufrir las células en el dispositivo microfluídico [21]. Algunos diseños que se han aplicado para trabajar con esferoides y modelos celulares se mencionan a continuación:

Li et al., 2018 diseñaron un cultivo celular 3D de la línea celular MDA-MB-231 basado en técnica de emulsión soportado en una plataforma microfluídica fabricada en PDMS que cuenta con 4 entradas, un serpentín cuyo propósito es amortiguar las fluctuaciones causadas por la bomba y una salida (Figura 18) en la cual se generan esferoides formados de alginato/calcio-EDTA [32]. Para la determinación de la velocidad de flujo de la fase acuosa y de la fase oleosa para la formación del esferoide se realizó una simulación en COMSOL, tomado al alginato como fase acuosa y como fase oleosa se utilizó aceite de carbono fluorado [32].

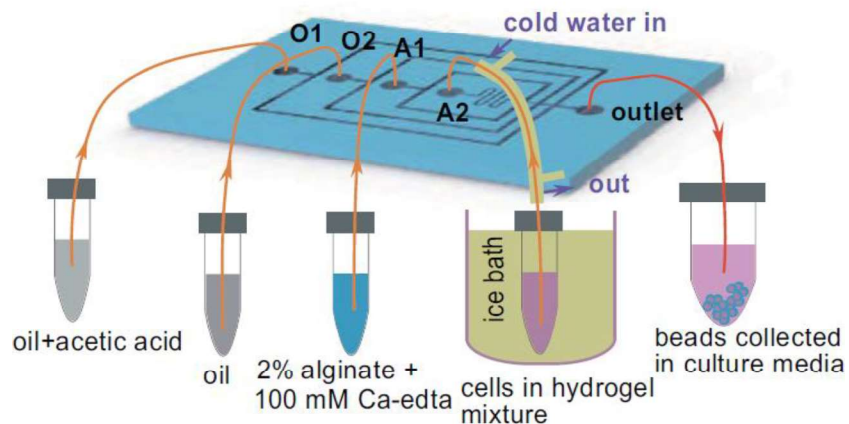


Figura 18. Esquema del dispositivo microfluídico [32].

Otro ejemplo fue hecho por Wang et al., 2014, que propusieron una plataforma microfluídica fabricada de PDMS para el cultivo de células HeLa por técnica de emulsión, en la cual se generaron esferoides de alginato y Matrigel, esta tiene un diseño de 5 entradas con la siguiente configuración: una donde se ingresa la solución de Matrigel y células, otras dos donde se agregan el alginato y por último una donde de ingresa el aceite para generar la fase oleosa y una salida (figura 19), el serpentín tiene el objetivo generar una dispersión celular y con el matrigel [24]. La formación de esferoides se da por la dinámica de la plataforma y los fluidos que son ingresado a un flujo constante. Se encontró que la mezcla de estos dos biopolímeros en proporciones 1:1 formo esferoides de tamaño regular de $254 \pm 15.3 \mu\text{m}$ [24].

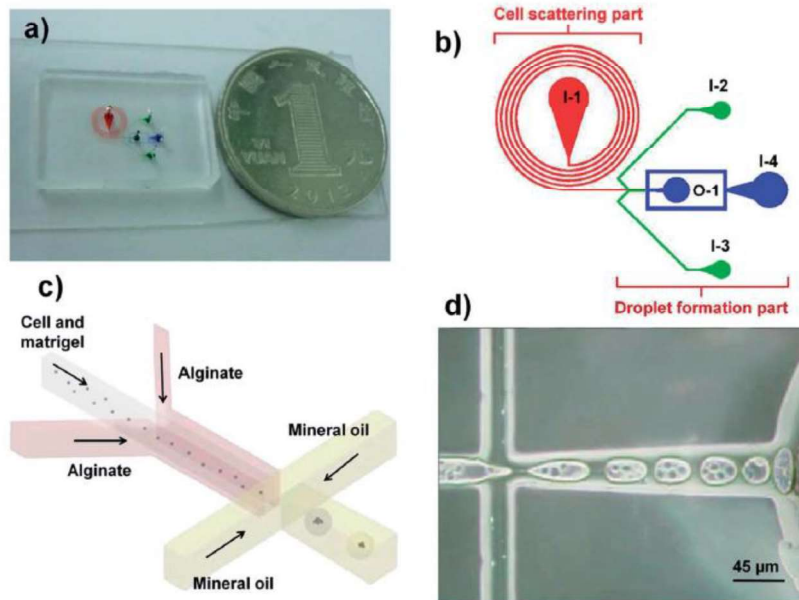


Figura 19. Plataforma microfluídica de emulsión (a) una vista general del dispositivo microfluídico con referencia a una moneda; (b) una vista esquemática del sistema de micro canales: I-1, I-2, I-3 e I-4 son las entradas de las células, los flujos de alginato, alginato y aceite mineral, respectivamente, y O-1 es la salida; (c) esquema del flujo (d) imágenes típicas que muestran células encapsuladas en gotitas de hidrogel mezcladas [24].

Por otra parte, las plataformas microfluídicas con microestructuras en forma de U o con micropozos están diseñadas para la formación de esferoides en periodos cortos y con diámetros uniformes y controlables [21]. Las plataformas basadas en micropozos son más utilizadas debido a la simplicidad y su fácil operación, estas necesitan un número de micropozos y de micro canales o una red de micro canales para la entrega de nutrientes. El diseño de estas estructuras ayudan en la generación de los esferoides en un corto tiempos y con diámetros uniformes [21]. En el desarrollo de este trabajo se presenta una plataforma microfluídica basada en micropozos por las características previamente mencionadas.

Una parte esencial de este diseño son el número de micropozos y los micro canales para la entrega de nutrientes a través del medio de cultivo, estos deben ser diseñados en una manera para prevenir el escape de los esferoides, así como el evitar la obstrucción de los canales. Una de las principales razones es por la densidad de células, en las células en suspensión, usualmente la densidad de encuentra entre 10^5 a 10^7 células/mL [21].

Adicionalmente, el flujo es una variable que debe tomarse en cuenta en los diseños de este tipo de dispositivos microfluídicos, ya que es el medio de intercambio de nutrientes y desechos y este puede provocar niveles de tensión de corte mayor a la tolerada por las células provocando así la muerte celular [21].

Los diseños de plataformas microfluídicas basadas en micropozos han sido utilizadas más que cualquier otra técnica debido a su simplicidad y fácil uso [21]. Algunos de los diseños ya realizados se mencionan a continuación:

Zuchowska et al., 2017 diseñaron una plataforma microfluídica basada en micropozos y fabricada en PDMS en la cual se cultivaron las líneas celulares A549 y MRC-5 correspondientes a cáncer de pulmón [53]. Los micropozos cuentan con una forma de U para prevenir la adhesión celular con la superficie y mejorar la formación de esferoides, con dos diámetros diferentes de 350 μm y de 500 μm (figura 20) [53]. Esta geometría fue escogida para proveer un espacio aislado para la formación del esferoide y reducir la tensión de corte causado por el flujo del medio. Se encontró que los micropozos con una profundidad de 500 μm formaron esferoides con mayor eficiencia, además, para mejorar las interacciones célula-célula de A549 agregaron colágeno a la suspensión del medio y observaron un aumento en las esfericidad que del cultivo que no lo agregaron, además que los factores que influyen en la formación de los esferoides son, la geometría, la profundidad del micropozo, la línea celular y la velocidad de flujo [53].

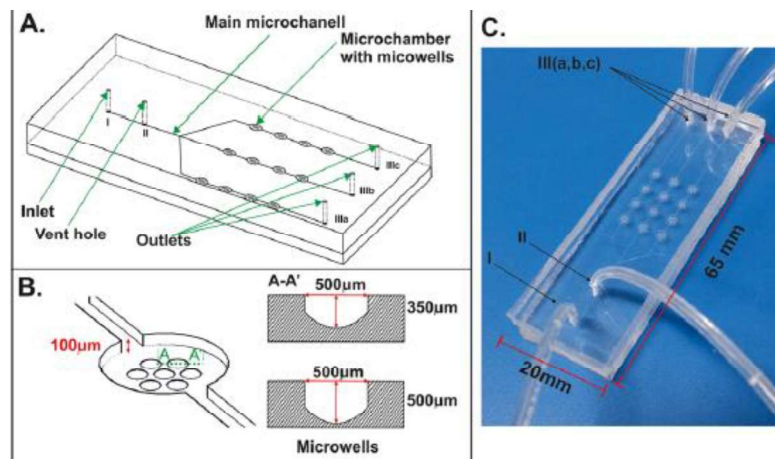


Figura 20. Plataforma microfluídica de Zuchowska A) Diagrama del sistema microfluídica utilizado para los cultivos de esferoides de las líneas celulares A549 y MRC-5. B) La microcámara con la sección transversal de dos micropozos diferentes. C) Plataforma microfluídica fabricada [53].

Por otra parte, K. Kwapiszewska et al., 2014 modelaron un plataforma microfluídica basa en micropozos para el cultivo de las líneas celulares HT-29 y Hep-G2, esta cuenta con dos entradas y una salida, además hacen uso de un generador de gradiente de concentración (GGC) el cual tiene como objetivo proveer una distribución de las células, cuenta con un arreglo de 4 por 3 micro cámaras que contienen 18 micropozos cada una, estos tiene una profundidad de 150 μm y un fondo redondeado de 200 μm de radio (figura 21) [54].

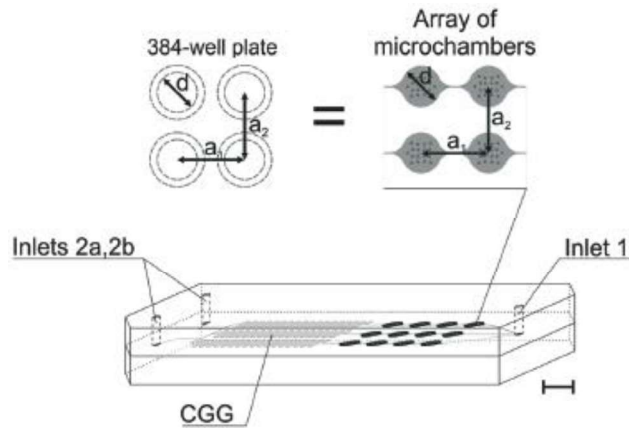


Figura 21. Esquema de la plataforma microfluídica, así como la distribución de las microcámaras que contienen 18 micropozos [54].

3.6.1. Simulaciones de cultivos celulares en plataformas microfluídicas.

El uso de una herramienta como lo es la simulación en el análisis de cultivos celulares en plataformas microfluídicas permite evaluar diferentes factores. Entre los factores que se evalúan en la simulación de cultivos celulares en plataformas de micropozos son el número de células que se depositan en los micropozos como en trabajo realizado por M. A. Hajari et al., 2021 donde se analizó el número de células depositadas en los micropozos de acuerdo a la viscosidad (0.0073 Pa.s, 0.0025 Pa.s y 0.00078 Pa.s) y la velocidad del medio (40 $\mu\text{l}/\text{min}$, 80 $\mu\text{l}/\text{min}$ y 120 $\mu\text{l}/\text{min}$) generando los histogramas que se muestran en la figura 22, donde se observa que a una viscosidad de 0.00078 Pa.s la deposición de las células es irregular y no normalizada mientras que a la viscosidad de 0.0073 Pa.s se logra una distribución normal en los micropozos y una mayor número de células depositadas [7].

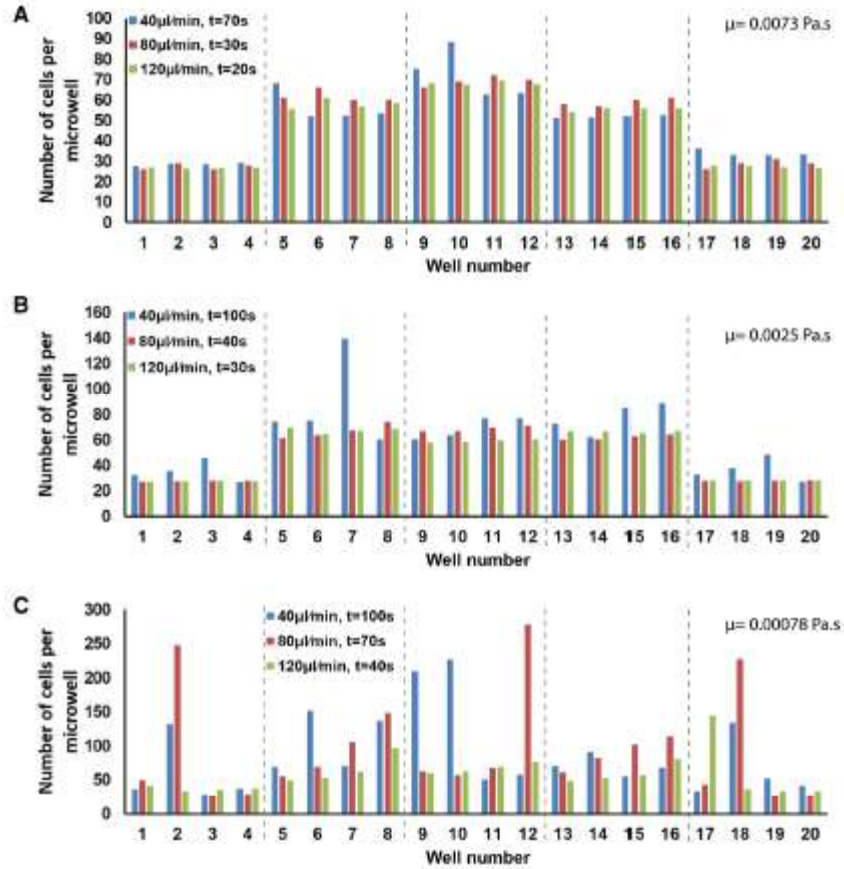


Figura 22. Acumulación de células en los micropozos con diferentes velocidades y viscosidades a) 0.0073 Pa.s b) 0.0025 Pa.s c) 0.00078 Pa.s [7]

Por otra parte, el análisis del flujo y velocidades del medio en dos plataformas microfluídicas fabricadas por Behroodi et al., 2020, encontraron que la velocidad del flujo es uniforme y es independiente de la profundidad del micropozo además de que la velocidad es menor en los micropozos que en las partes superiores lo que favorece la deposición de las células y la formación de esferoides. Adicionalmente se realizó un análisis de flujo en el micropozo como se muestra en la figura 23 en diferentes profundidades donde se observa que al aumentar la profundidad del micropozo la velocidad del flujo disminuye lo que favorece la adhesión celular pero a su vez se genera un flujo secundario, el cual dificulta el intercambio de nutrientes y oxígeno por lo cual se reporta que la profundidad ideal es 300 μm ya que en esta no se genera el flujo secundario [47].

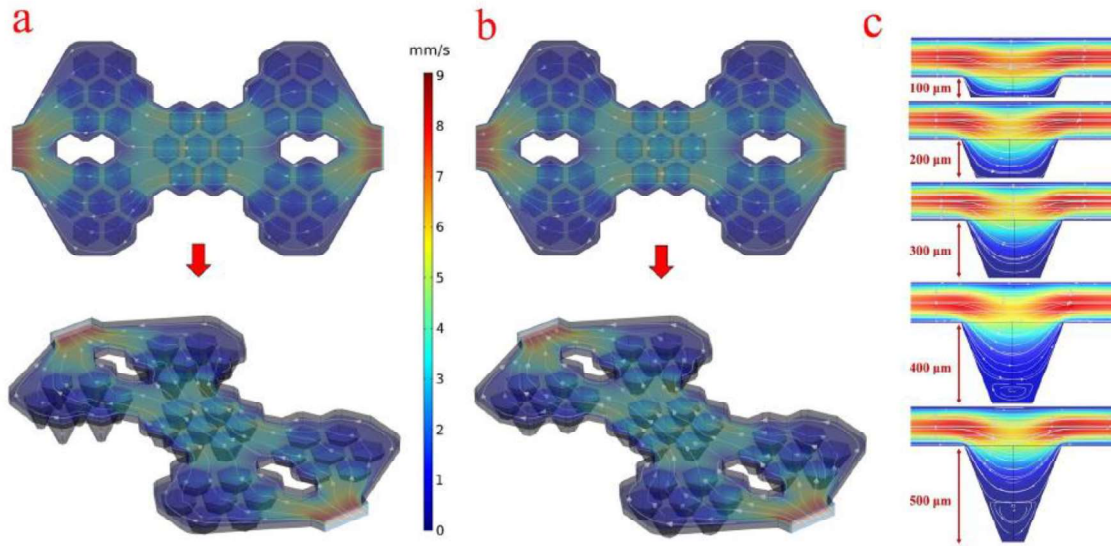


Figura 23. La distribución de la velocidad y la línea de corriente del flujo de la plataforma con una profundidad de 300 μm y la sección transversal de la distribución de la velocidad y la línea de corriente del flujo de fluido dentro de los micropozos [47]

La difusión es uno de los principales métodos de transporte *in vivo* entre los capilares y el tejido circundante, este mecanismo se puede observar en las plataformas microfluídicas a través de los micropozos y de los canales para el intercambio de gases, nutrientes como glucosa y desechos. El análisis de difusión de oxígeno y glucosa reportado por M. Astolfi et al., 2016 donde en la figura 24 se puede observar la disminución de la concentración de la glucosa en el medio en dos periodos de tiempo 24 hrs y 48 hrs, el análisis se realizó siguiendo el modelo de Michaelis–Menten [55].

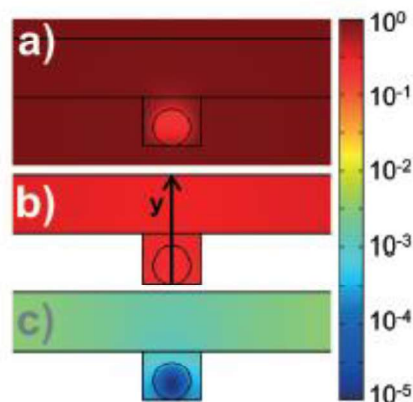


Figura 24. Simulación del consumo de O_2 y glucosa por el MDT de tamaño promedio 381 μm que muestra una vista transversal de la distribución del O_2 a) glucosa de 24h b) glucosa después de 48 h c) glucosa a través del sistema [55].

Algunos otros trabajos, se han realizado por medio de simulación para el estudio de fenómenos que afectan en el crecimiento celular como el intercambio de oxígeno y tensión de corte debido al flujo las cuales se muestran con más detalle en la en la tabla 15 (Anexo 3) según la bibliográfica consultada.

3.7 Parámetros geométricos

Uno de los materiales más utilizados para la construcción de estos dispositivos microfluídicos es el polidimetilsiloxano (PDMS) [11] debido a su biocompatibilidad ya que no provoca efectos indeseables en organismos biológicos [56]. Además tiene una alta permeabilidad a gases [11], y ha mostrado ser un gran material como sustrato ya que permite la formación de esferoides y perfusión de larga duración en cultivos celulares con el mínimo de adhesión celular [21]. Entre otras características con las que cuenta son la transparencia, el PDMS es transparente en el ancho de banda de 240 a 1100 nm siendo compatible con métodos de observación ópticos [56]. Algunas de las propiedades físicas y químicas de PDMS se muestran en la tabla 14 que se encuentra en el (Anexo 2) [57].

En el diseño geométrico de una plataforma microfluídica, es un factor relevante debido a que influye en la formación de esferoides y el número de esferoides que se pretenden formar. Las dimensiones que tengan su canal o canales, interconexiones, entre otros. Así mismo, si están basadas en micropozos, el número del micropozo, la forma y la geometría de estos, así como su distribución que influiría en el resultado del modelo de estudio.

El diseño Zuchowska et al., 2017 que previamente se mencionó, es una plataforma microfluídica contiene micropozos con dos profundidades una de 300 μm y una de 500 μm , en este estudio, lo micropozos de 500 μm mostrando mejores resultados ya que se formaron esferoides más compactos que en la profundidad de 300 μm , además, se generó una tensión de corte en las paredes del micro canal por la velocidad del flujo, y este fue proporcional a la velocidad de flujo (figura 25). La tensión generada afectó la agregación de las células lo cual que puede causar muerte celular y evitar la formación esferoides [53].

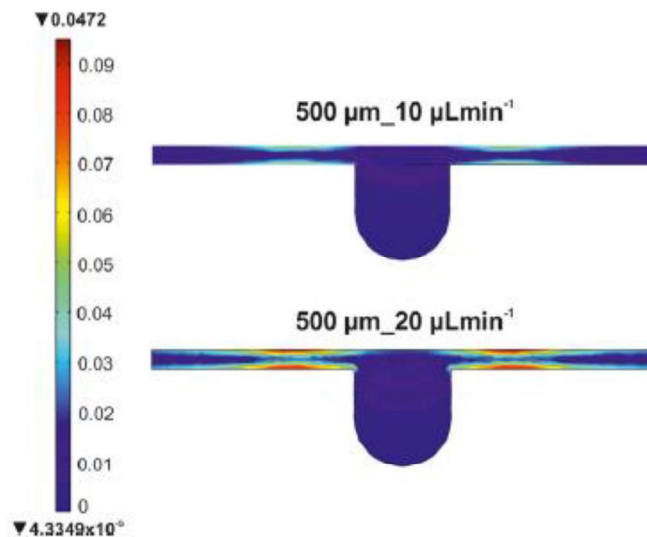


Figura 25. Perfiles de simulación de la tensión de corte en las paredes a dos caudales diferentes 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ [53].

Por otra parte L.-D. Ma et al., 2018 fabricaron una plataforma microfluídica en forma de serpiente para el cultivo esferoides de hepatocitos, este diseño cuenta con 1080 micropozos que tiene una forma de V en un arreglo de panal, con profundidad de 300 μm y 400 μm [58]. La forma de V permite una

distribución más uniforme y agregación de las células para la generación de los esferoides [47]. Se analizó la tensión de corte en el micropozo y se observó que al aumentar la profundidad del micropozo de 200 a 400 se reducía esta tensión debido al flujo. En el caso de la concentración de oxígeno, esta disminuía al incrementar la profundidad del micropozo [58].

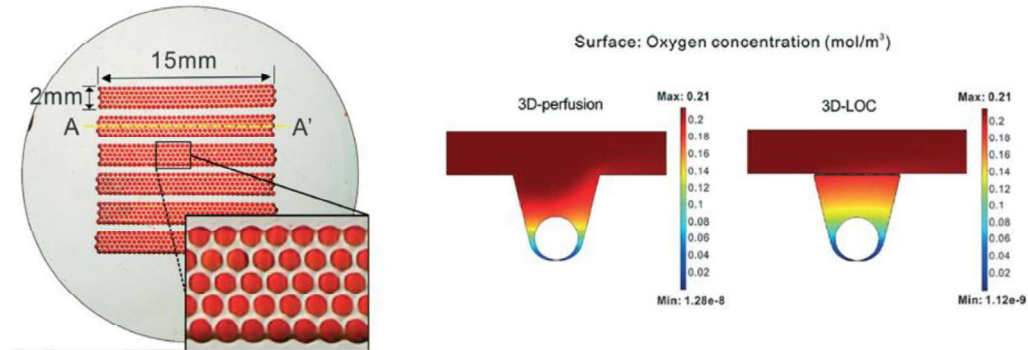


Figura 26. Plataforma microfluidica. Izquierda patrón de micropozos tenía 6 regiones rectangulares (cada región tenía unas dimensiones de 15×2 mm, 180 micropozos cóncavas), derecha mapas de colores del consumo de oxígeno por perfusión continua y el consumo de oxígeno por una membrana [58].

Como se ha reportado, el fondo del micropozo desempeña un rol importante ya que permitirá que se puedan generar esferoides con una forma uniforme y que se genere solo un esferoide por micropozo, por lo cual Ruppen et al., 2015 diseñaron dos plataformas microfluidicas con la diferencia en el fondo de micropozo plano o redondeado, en el estudio se observó que en los micropozos con el fondo plano, existe mayor incidencia de 2 a 3 esferoides por micropozo en cambio en los de fondo redondeado, predomina un esferoide por micropozo como se muestra en la figura 27 [59].

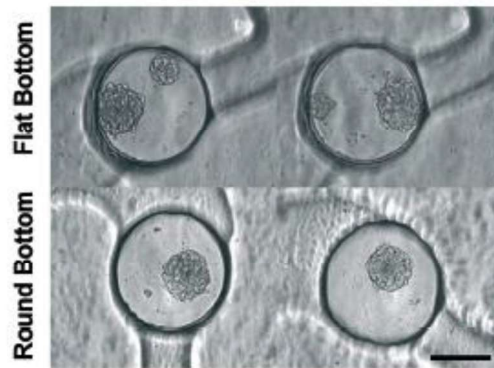


Figura 27. Esferoides formados en micropozos de fondo plano y en micropozos de fondo redondo tras tres días de cultivo. La barra de escala corresponde a $250 \mu\text{m}$ [59]

De acuerdo con la bibliografía consultada, se realizó un compilado de características geométricas de plataformas basadas en micropozos de diversos autores que se encuentra en la tabla 16 (Anexo 4).

3.8 Parámetros fisiológicos

3.8.1 Células HeLa

Las células HeLa fueron la primera línea celular establecida para cultivo celular y desde entonces esta se ha convertido en una de las líneas más utilizadas en la investigación. Esta línea celular es originaria de un tumor de cáncer cervicouterino de una paciente de nombre Henrietta Lacks [60], el cual fue tratado por medio de las técnicas presentes en el año de 1950 como radioterapia local en el radio intrauterino y radioterapia con rayos X, sin embargo, el tumor hizo metástasis hasta que falleció el 4 de octubre de 1951 [61].

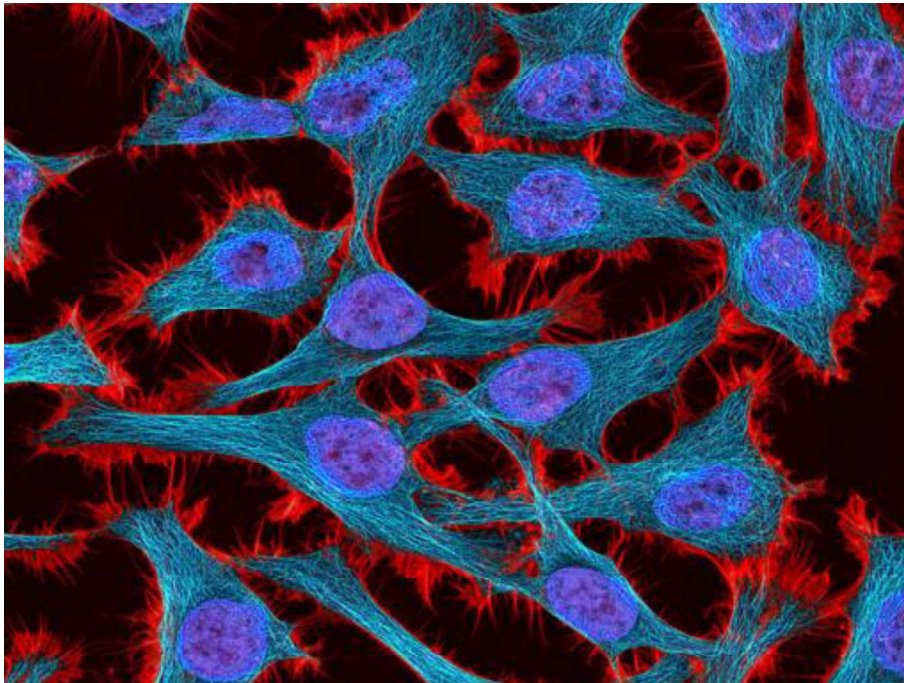


Figura 28. Imagen de fluorescencia multifotónica de células HeLa teñidas con la toxina de unión a actina faloidina (rojo), microtúbulos (cian) y núcleos celulares (azul). Trabajo financiado por los NIH en el Centro Nacional de Investigación en Microscopía e Imagen [62].

El diámetro aproximado de las células HeLa, cuando estas crecen en entornos donde existen flujos que las presionan unas con otras es de $20\ \mu\text{m}$ [63].

En cultivos celulares las células deben tener un microambiente que sea óptimo para la supervivencia celular, entre las características fisiológicas se encuentran el pH, la temperatura del cultivo, la difusión de O_2 , consumo de oxígeno. A continuación se describe brevemente los más relevantes [64].

3.8.2 pH

El pH es una variable importante en el cultivo de diferentes líneas celulares, el pH donde la mayoría de las líneas celulares crecen adecuadamente se encuentran en el rango de 7.0 a 7.4. Aunque algunas células epidérmicas se han logrado mantener en un pH de 5.5 [64].

El pH adecuado de para las células HeLa se encuentra entre 6.7 a 7.4 por debajo de estos valores el ambiente se vuelve tóxico como lo reporta Trebinska-Stryjewska et al., 2020 [65].

3.8.3 Temperatura

La temperatura óptima para un cultivo celular depende de la temperatura del organismo nativo de la línea celular, en el caso de líneas celulares de origen humano se recomienda una temperatura de 37°C o cercano al calor del cuerpo y se mantienen en niveles de temperatura bajas para evitar sobrecalentamiento [64]. Un estudio realizado por A. Bettaieb et al., 2015 donde se realiza el análisis de dos cultivos celulares de la línea celular HeLa a temperatura de 40°C y otro a 37°C durante tres horas, no mostraron cambios significativos en la viabilidad del cultivo, sin embargo, al aumentar la temperatura a 43°C, las células cultivadas a 40°C demostraron desarrollar una resistencia a la temperatura ya que la tasa de supervivencia fue mayor que a las cultivadas a 37°C. Algunas características afectadas fue un aumento en los niveles de calcio lo que puede provocar una activación del sistema proteolítico dependiente de calcio, el cual se encarga de modulación de la degradación de las proteínas en las células[66].

3.8.4 Tensión de corte (shear stress)

Las células endoteliales experimentan una tensión de corte debido al flujo de sangre. Esta tensión es considerada un factor dominante en la expresión de genes, función y estructura. La tensión normal que se ha encontrado en las arterias grande y alejadas de las ramas se encuentra en el rango de 2 a 4 Pa, estos valores dependen del estado de vasoconstricción, la red arterial y las variaciones individuales y se ha encontrado que las venas experimentan tensiones de corte alrededor de 0.1 a 0.6 Pa [67].

La tensión de corte es una magnitud importante en el diseño de sistemas microfluídicos, ya que altas tensiones pueden provocar muerte celular, los diferentes tipos de células tienen rangos de tolerancias a la tensión de corte, entre los valores de tensión máximas permisibles para células cancerígenas son aproximados de 0.5 a 1 Pa [7]. Por encima de este valor las células son consideradas dañadas por la tensión la cual afecta el fenotipo, puede inducir apoptosis, inhibir la proliferación o remover células adherentes [51].

Un estudio realizado por Das et al., 2018 muestra que al aplicar tensiones de corte provocadas por un flujo laminar en células HeLa en valores 2 Pa o mayores producen autofagia la cual es un proceso homeostático de las células, provocando que la célula obtenga energía de organelos dañados o proteínas no utilizables durante periodos de inanición (figura 29) [68].

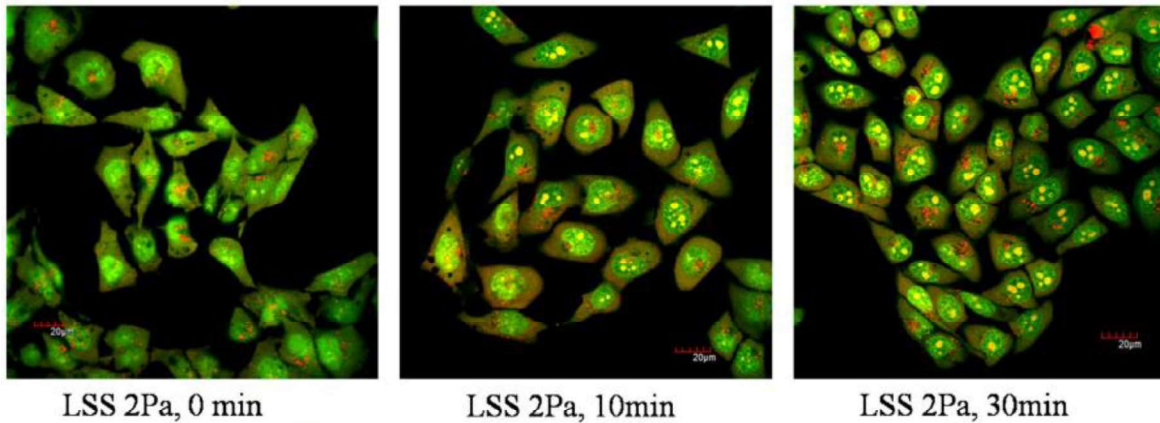


Figura 29. Células HeLa bajo LSS (Laminar shear stress) de 2Pa por diferentes periodos de tiempo, donde el color amarillo son los autofagosomas y los puntos rojos son autolisomas [68].

3.8.5 Consumo de oxígeno

El oxígeno es uno de los elementos con abundancia en la corteza terrestre y es uno de los tres elementos más comunes en el universo, el alótropo más estable del oxígeno es el dióxido de oxígeno O_2 . Actualmente el dióxido de oxígeno es el 21% de la atmósfera terrestre [69].

La utilización de oxígeno para procesos biológicos por células depende del tipo de célula, la función a desarrollar y el estado biológico. Un ejemplo de esto es la utilización de oxígeno por un hepatocito el cual es relativamente grande en comparación a una célula sanguínea que no contiene mitocondria y depende exclusivamente de la glucólisis para sus necesidades energéticas [69].

El uso de oxígeno de las células depende del intercambio entre los espacios intracelular y extracelular por lo cual existen diferentes tasas de consumo de oxígeno dependiendo del tejido, así como línea celular. En el caso de las células A549 (cáncer del epitelio alveolar) es de $27 \frac{atmol}{cell*s}$ mientras que para las células HeLa es de $12.5 \frac{atmol}{cell*s}$ donde atmol son $(10^{-18}mol)$ lo cual es menor que las células A549 [69].

Por otra parte, es importante es la difusión del oxígeno del material donde el cultivo celular va ser soportado ya que al ser un sistema sin perfusión continua debe permitir el intercambio de gases con facilidad por lo cual el PDMS es un material idóneo ya que su constante de difusión de oxígeno es mayor que la del agua esta va desde $3.25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a $7.88 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ la cual es más alta que la del agua que va desde $1.80 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 20°C hasta $3.25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 40°C [51].

3.8.6 Migración de las células

En cultivos 3D, factores como la dureza y la arquitectura de las matrices extracelulares regulan la migración de las células. En matrices con una alta densidad de fibras y que también presenta pequeños tamaños de poros pueden regular el nivel de confinamiento, a esta característica es asociada a una motilidad de las células restringida. Tomando en cuenta la naturaleza de la composición de MEC es un complicado replicarla in vivo de forma fiel, sin embargo, experimentos han permitido entender

como la MEC regula la migración a través de modelos simplificados como el desarrollado I. G. Gonçalves y J. M. Garcia-Aznar., 2020 donde las matrices con alta densidad pueden suprimir el crecimiento debido a que ejercen fuerzas de compresión sobre las células, lo cual provoca tumores más pequeños que los cultivados en matrices de baja densidad [15].

La migración celular a través de un matriz extracelular se ve favorecida por medio de flujos demostró Huang et al., 2020 de manera experimental donde se observó que la velocidad aumenta en un 30 % debido a la presencia del flujo, así mismo, promueve la disociación de los esferoides como se muestra en la figura 30 [70].

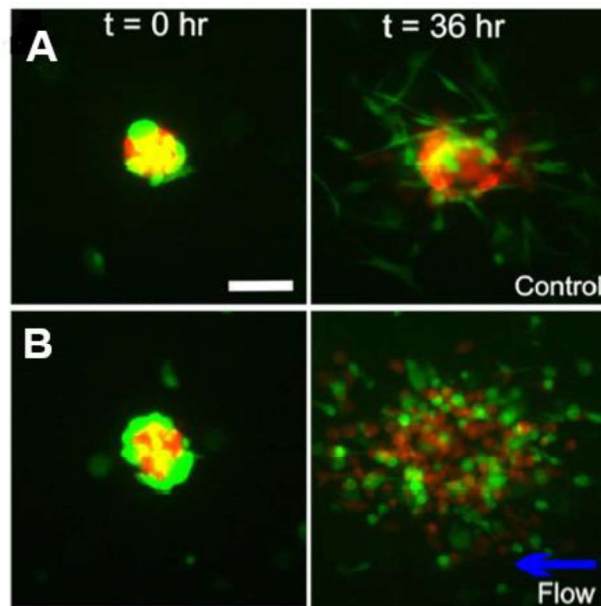


Figura 30. Los flujos intersticiales promovieron la disociación de los esferoides tumorales en cultivo. Micrografías de esferoides tumorales de co-cultivo incrustados en matrices de colágeno de 1,5 mg/mL a $t = 0$ horas (panel izquierdo) y $t = 36$ horas (panel derecho) en ausencia (A) y presencia (B) del flujo. Verde: Células MDA MB-231 que expresan EGFP. Rojo: Células MCF-10A que expresan variantes de dTomato. La barra de escala es de $100 \mu\text{m}$ [70].

3.8.7 Medio de Cultivo

El medio de cultivo o suero debe contener fuentes de aminoácidos, glucosa y metabolitos intermedios que pueden ser simples o complejos para el desarrollo de la línea celular [64] por lo cual, el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* es un elemento importante por considerar ya que en él se encuentran los nutrientes para el cultivo celular, este medio es uno de los más utilizados por sus características como se puede observar en la tabla 3. Un ejemplo de este es la formulación hecha por ThermoFisher la cual se utiliza para fomentar el crecimiento de células de mamíferos. Algunas de las células cultivadas exitosamente son fibroblastos, neuronas al igual que líneas celulares como HeLa, Cos-7, entre otras [71]. Además del uso de Suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10% el cual contiene factores de crecimiento que permite a las células proliferar. Una de las formulaciones más populares es la distribuida por Sigma-Aldrich la cual se utiliza en cultivos celulares de la líneas HeLa, Cos1 y Cos7 [72]. Como se ha mencionado anteriormente, la viscosidad es un factor relevante en la utilización de plataformas microfluídicas, por ese motivo el conocer la viscosidad del medio de cultivo con 10 % de suero fetal bovino es relevante. La viscosidad fue determinado por Poon et al., 2020 donde lo considero como un fluido newtoniano, presión

atmosférica y a una temperatura 37 °C, donde la densidad es de $1009 \pm 0.003 \frac{kg}{m^3}$ y la viscosidad de $0.930 \pm 0.034 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ [73]

Tabla 3. Características del DMEM 11995040 de Gibco™ [71]

	Contiene	Valor
pH	-	6-7
D-Glucosa	Si	4500mg/L
Piruvato sódico	Si	110mg/L
Rojo de fenol	Si	15mg/L
L-glutamina	Si	584 mg/L
HEPES	No	-

Capítulo 4. Desarrollo Experimental

4.1 Diseño experimental central compuesto

De la tabla 13 que se encuentra en Anexo 1 se obtuvieron los niveles mínimos y máximos de concentración para la elaboración del diseño experimental central compuesto (tabla 4). Tomando solo colágeno tipo I cola de rata y Matrigel dado que estos dos hidrogeles son utilizados en plataformas microfluídicas de micropozos y no necesitan otro reactivo para generar esferoides a diferencia del alginato que utiliza iones de calcio para su reticulación.

Tabla 4. Niveles máximos y mínimos de las concentraciones de biopolímeros

	Colágeno tipo I cola de rata (mg/mL)	Matrigel (mg/mL)	Viscosidad estimada (mPa s)
Nivel máximo	9	5	38
Nivel mínimo	1.5	1.25	11.7

Para obtener una formulación idónea se propuso un diseño central compuesto: se establecieron las concentraciones de los biopolímeros con, mayor relevancia, tomando como variable de respuesta la viscosidad estimada según la bibliografía consultada.

El protocolo para el desarrollo de la matriz extracelular fue propuesto por Anguiano et al., 2020 de manera experimental como se describe brevemente, primero se realizó la preparación del hidrogel. El colágeno tipo I de cola de rata (BD Biosciences) con agua desionizada y solución tamponada de fosfato (PBS,10X, ajustando el pH con NaOH 0.5 N; posteriormente, se mezcló la formulación de colágeno a una temperatura a 4 °C con la concentración de Matrigel para obtener la formulación final del trabajo [33].

En este trabajo, se propuso el uso del software STATGRAFICS XVI.I Centurion con el cual se implementó un diseño experimental central compuesto con tipo ortogonal ya que permite evaluar de forma independiente la interacción de los factores en la respuesta del experimento y estimar resultados de manera teórica.

Tomando dos factores para el diseño del experimento, los cuales fueron la concentración del Colágeno tipo I y Matrigel (Tabla 4) y como variable de salida la viscosidad dinámica estimada, como se ha mencionado anteriormente esta variable de la formulación de la MEC influye en la migración de las células y en la formación de los esferoides. Para el desarrollo de este trabajo se realizaron algunas consideraciones como tomar al Matrigel y colágeno como fluidos newtonianos, ya que el trabajo desarrollado por Zhano et al., 2020 se diseñó un modelo microfluídico de estenosis para entender la hemodinámica de la sangre, tomando a la sangre como un fluido no newtoniano y newtoniano, los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en la simulación de ambos tipos de fluidos, además de que la simulación de un fluido newtoniano reduce el gasto computacional [41].

La estimación de la viscosidad dinámica de forma analítica se realizó por medio de la ley de Stokes de viscosidad la cual se describe por la siguiente ecuación [74]:

$$\mu = \frac{2}{9} \cdot \frac{r^2 g (\rho_e - \rho_f)}{v} \quad (15)$$

Donde r : es el radio de la esfera, g : la aceleración de la gravedad, ρ_f : la densidad del fluido, ρ_e : la densidad de la esfera, v : la velocidad de la esfera. Este método fue utilizado por Imai et al., 2015, en el cálculo de la viscosidad de una MEC de Matrigel para el cultivo de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y estudiar su morfología [75].

Al utilizar esta expresión se tienen que hacer varias consideraciones las cuales son, que el número de Reynolds debe ser menor a 1 (lo cual indica un flujo laminar), ser un fluido newtoniano, la velocidad de la esfera se consideró un promedio de las velocidades de flujo que se utilizan en plataformas microfluídicas de micropozos de $6.16 \times 10^{-5} m/s$ además se propuso el radio de la esfera de $500 \mu m^2$ debido al diámetro de un viscosímetro capilar gravitacional como el que utilizó Y. Li et al., 2014 para la medición de viscosidad de un gel de colágeno en diferentes concentraciones [76] y una densidad relativa $2.7 kg/m^3$ correspondiente al aluminio, este último es escogido ya que tiene una densidad similar a las esferas que se utilizan en viscosímetros de cuerpo libre como el viscosímetro de caída de bolas Hoppler VSCO ball, FUNGILAB® el cual se utiliza el principio de la ley de Stokes y se utiliza en industrias cosméticas y farmacéuticas principalmente [77].

Las viscosidades estimadas junto con las concentraciones de cada biopolímero se pueden ver en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño de experimento

Número de experimento	Colágeno (mg/mL)	Matrigel (mg/mL)	Viscosidad estimada (mPa·s)
1	5.25	0.749181	2.65
2	1.5	1.25	11.7
3	5.25	5.50082	23.7
4	1.5	5	4.87
5	9	1.25	21.5
6	0.498362	3.125	7.86
7	10.0016	3.125	34.2
8	9	5	38
9	5.25	3.125	13.2
10	5.25	3.125	13.2
11	5.25	3.125	13.2
12	5.25	3.125	13.2
13	5.25	3.125	13.2

Con los datos obtenidos del diseño experimental, se obtuvo el diagrama de Pareto (Figura 31) donde cada barra del diagrama indica la significancia que tiene ese factor y las interacciones en las variables de respuesta (viscosidad dinámica), de acuerdo con el diagrama las barras que sobrepasan el valor crítico (línea azul) tienen relevancia significativa, siendo el colágeno tipo I el que afecta en mayor medida la viscosidad de la formulación, posterior el Matrigel y por último las interacciones de colágeno con colágeno y colágeno con Matrigel, mientras que la interacción del Matrigel con Matrigel no tiene relevancia significativa. Además, del diseño se obtuvo el coeficiente R^2 que tiene un valor de

95.03% lo cual indica que el modelo que se describe por la ecuación 17 se ajusta a la variabilidad de los datos.

$$\text{Viscosidad} = 14.60 - 3.659x_1 - 2.227x_2 + 0.370x_1^2 + 0.830x_1x_2 + 0.090x_2^2 \quad (17)$$

Donde x_1 es el Colágeno y x_2 el Matrigel

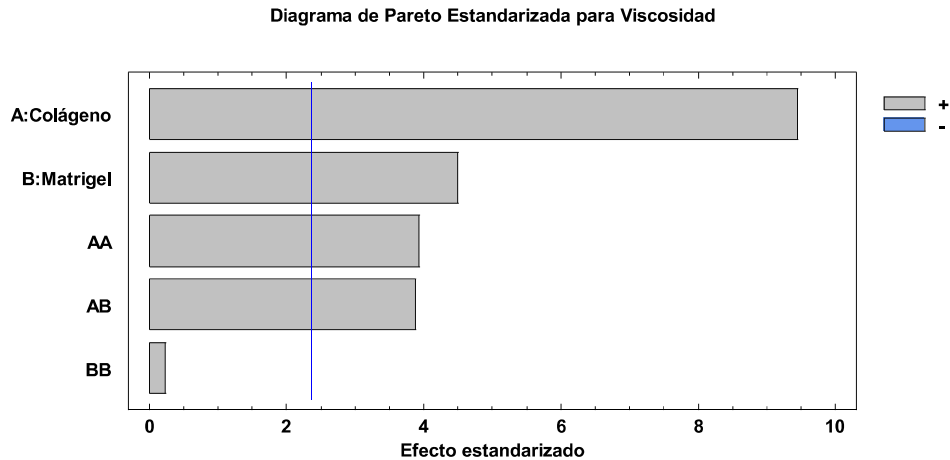


Figura 31. Diagrama de Pareto del diseño central compuesto

Del diseño experimental se obtuvo la superficie de respuesta (Figura 32) que nos muestra el comportamiento de los datos dentro del límite del experimento, aquí se observa que existe una tendencia al aumentar la viscosidad, si se aumentan las concentraciones de los biopolímeros, a pesar de que se muestra el comportamiento de los datos es un poco complicado de analizar por lo cual se recurrió a la gráfica de contorneos (Figura 33) en esta se observa con mayor facilidad los valores dentro del límite del experimento, ya que se puede observar una cresta no muy definida. El área delimitada por el rectángulo de color cian es nuestra área de trabajo.

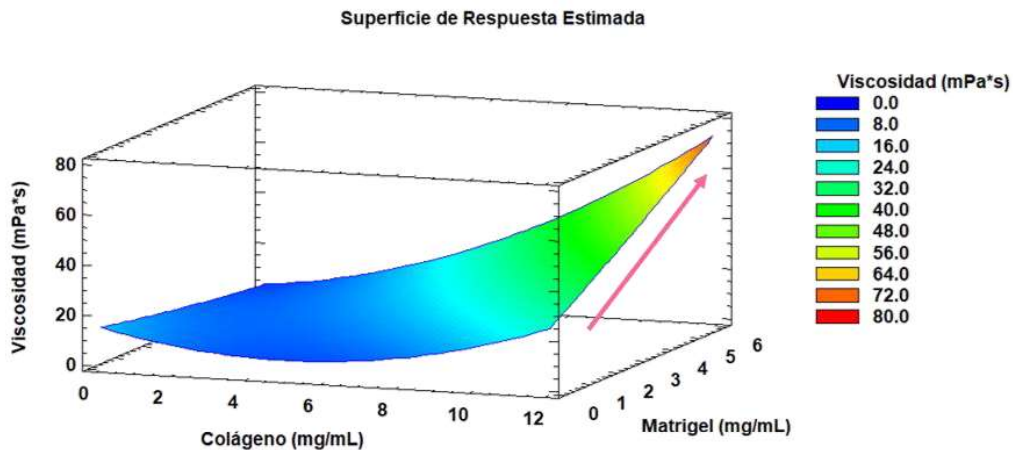


Figura 32. Superficie de respuesta de la concentración de la mezcla

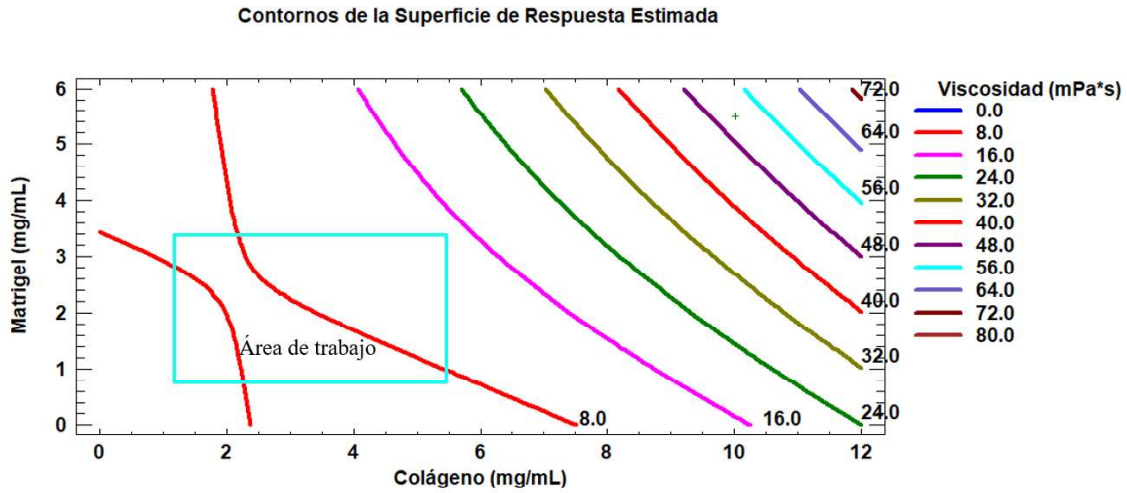


Figura 33. Gráfica de contornos de la concentración

De las 13 corridas experimentales obtenidas del diseño experimental central compuesto se seleccionaron tres formulaciones de la MEC dentro el área de trabajo determinada (Tabla 6) donde es importante notar que existen reportes de viscosidades dinámicas para MECs de colágeno obtenidas experimentalmente a 25°C, las cuales oscilan desde 32 mPa·s a una concentración de 3 mg/mL, 358 mPa·s para una concentración de 6mg/mL y de 1425 mPa·s para una concentración de 10 mg/mL, sin embargo, no hay datos de viscosidades dinámicas con las características de un cultivo celular complejo para mezclas de biopolímeros [78]. Por esta razón, el diseño experimental es de gran ayuda para lograr esa estimación. Además, se realizó la estimación de la viscosidad dinámica de la MEC considerando solo el colágeno como componente; 22.6 mPa·s para una concentración de 5.25 mg/mL y 10.6 mPa·s para una concentración de 1.5 mg/mL, cabe destacar que la viscosidad dinámica puede variar debido a la absorción de agua y las condiciones en las que se realice el hidrogel.

Tabla 6. Formulación de MECs seleccionadas

Número de MEC	Colágeno (mg/mL)	Matrigel (mg/mL)	Viscosidad estimada (mPa·s)	Densidad estimada (mg/mL)
1	5.25	0.749181	2.62	2.99
2	1.5	1.25	11.7	1.375
3	5.25	3.125	13.2	4.87

La formulación de la MEC debe cumplir con características como; un pH entre 6.7 a 7.4, estar en una temperatura de 37 C° ya ingresada en la plataforma, que está al ingresar a una plataforma microfluídica no genere tensiones de corte mayor a 0.6 Pa y que permita la migración de las células para que células HeLa se desarrollen de manera apropiada.

Entre los factores importantes para la formulación de la MEC, es la migración de las células, debido a que si la formulación permite la migración con facilidad debido a su viscosidad puede que los esferoides no se formen, a la par de la simulación de la migración se diseñó una plataforma microfluídica que servirá de soporte para la formación de esferoides en material de PDMS

4.2 Diseño de la plataforma microfluidica

Tomando en consideración las características geométricas de la tabla 16 del anexo 4 se diseñó una plataforma microfluidica de un solo canal con un altura de 200 μm para reducir la tensión debido al flujo en las paredes según lo reportado por Zuchowska et al., 2017 donde el flujo en el microcanal que conecta con la cámara debido a que la velocidad de flujo es proporcional a la tensión en las paredes del microcanal [53]. La profundidad de los micropozos de 350 μm fue elegida debido a los resultados que presentaron Behroodi et al., 2020 donde a profundidades mayores de 300 μm se colectaban mayor cantidad de células y se reducía la posibilidad de que las células escaparan del micropozo [47]. Además, los micropozos se diseñaron con una forma de V con un ángulo de 15° y un fondo redondeado donde se pretende formar los esferoides de las células.

El ingreso de la MEC con las células en la plataforma por medio de la entrada que tiene 1.25mm de diámetro al igual que la salida, esta dimensión fue elegida ya que es recurrente en plataformas microfluidicas como las diseñadas por Behroodi et al., 2020, y M. E. Dolega et al., 2015 y los tubos de equipos FLUIGENT los cuales se especializan en dispositivos microfluidicas tiene un diámetro entre 0.80 mm a 1.5mm. El control de flujo de estos equipos se puede realizar de dos formas, una es con el uso de un sensor de flujo o por medio del cálculo de presión que el equipo aplica al reservorio del fluido y a las células, para saber la presión para un flujo específico se puede usar la calculadora que se encuentra en la página web de FLUIGENT(<https://www.fluigent.com/microfluidic-calculator/flow-rate-pressure-calculator/>) [47, 79, 80]. En la figura 34 se puede observar el diagrama de una aplicación de microfluidica con el equipo FLUIGENT LINE-UP.

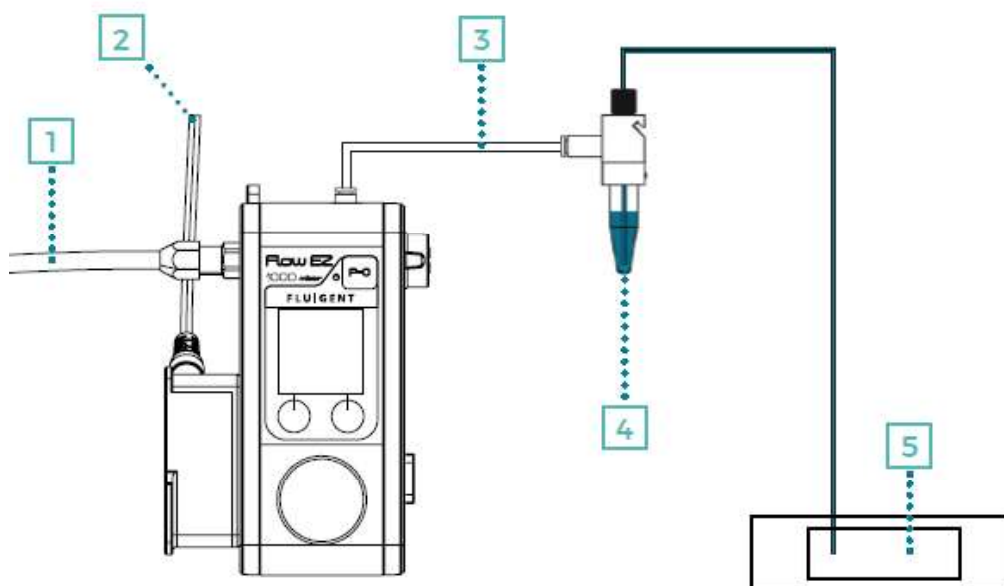


Figura 34. Sistema de control de un dispositivo microfluidico. 1. Entrada de aire 2. Fuente de alimentación 3. Regulador de la presión. 4. Reservorio de células. 5. Dispositivo microfluidico [81].

La plataforma (Figura 35) se diseñó con el uso del software SolidWorks 2019, así mismo en la tabla 7 se encuentran las dimensiones geométricas de la plataforma, las cuales comprenden una separación de 100 μm entre los micropozos, los cuales tienen diámetros de 400 μm , así como el grosor del canal es de 200 μm y el grosor de la entrada y salida son de 300 μm .

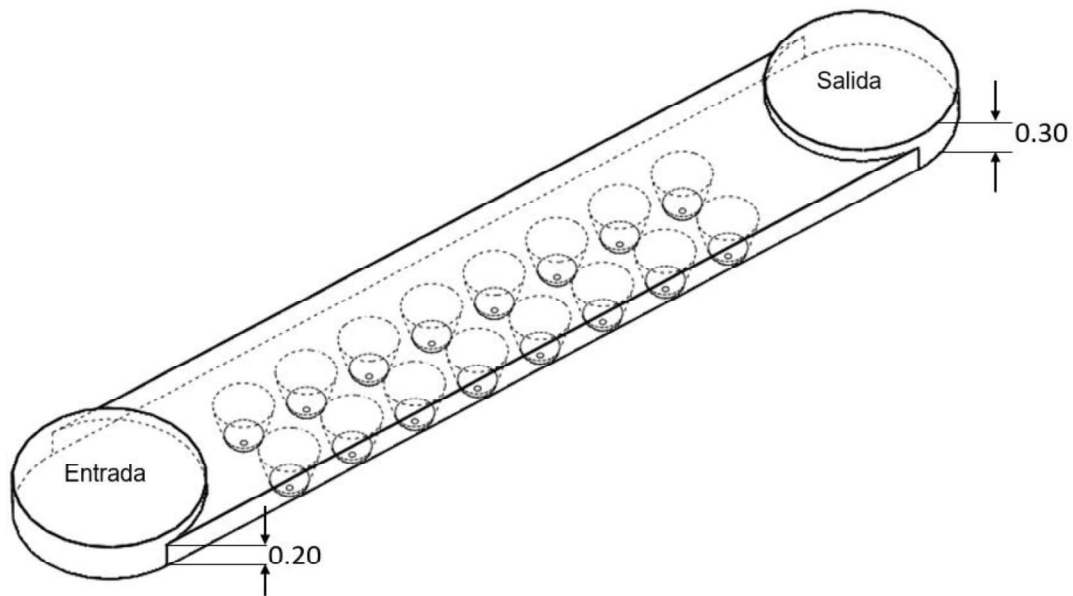


Figura 35. Plataforma microfluidica planos ver anexo 5. Medidas en milímetros

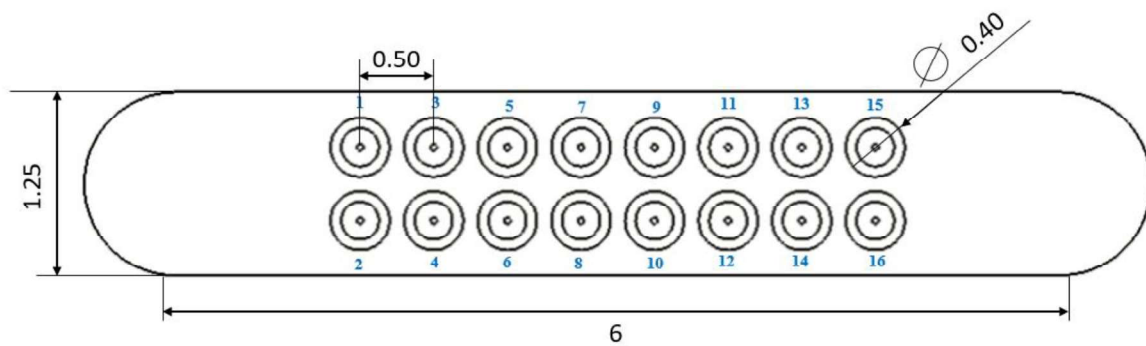


Figura 36. Numeración de los micropozos en la plataforma Medidas en milímetros

Tabla 7 Dimensiones de la plataforma microfluidica

Diámetro de entrada	1.25 mm
Diámetro de salida	1.25 mm
Longitud del canal	6 mm
Ancho del canal	1.25 mm
Altura del canal	200 μm
Número de micropozos	16
Diámetro de los micropozos	400 μm
Profundidad de los micropozos	350 μm
Radio del fondo del micropozos	110 μm
Distancia entre micropozos	100 μm
Ángulo	15°
Volumen de la plataforma	1.53mm ³

El diseño de la plataforma se realizó de modo que la MEC con las células se suministrara con un flujo constante y estas células se depositen en los micropozos para que se logre formar esferoides, en un ambiente controlado y de un material como el PDMS que permite la difusión de oxígeno a través de él y de igual manera observar si la geometría permite que las células no se dañen a causa de la tensión de corte que se genera debido al ingreso de estas. Por otra parte, la geometría de los micropozos se diseñó de modo que el medio de cultivo (DMEM + 10% suero fetal bovino) que permite el crecimiento de las células, así como el intercambio de nutrientes y desechos, no generara vórtices, ni tensión de corte en las paredes superiores a 0.6 Pa. Lo cual se discuten en los resultados de la simulación

4.3. Simulación

En este apartado se muestran los resultados de las simulaciones realizadas, así como los modelos y las condiciones límite indicadas en cada caso. Las simulaciones se realizaron en una laptop ASUS x555lb con un procesador Intel(R) Core (TM) i5-5200U CPU @ 2.20GHz 2.20 GHz y una memoria RAM 8.00 GB.

4.3.1 Simulación de la migración celular en las formulaciones de la MEC.

Para tener una estimación de la migración de las células en la MEC se simuló la trayectoria de las células para esto se simuló una sola célula a través de las tres formulaciones de la MEC sin considerar las interacciones celulares como se desarrolló en la ecuación 16, con 40 repeticiones. Se simuló la trayectoria de la célula por un periodo de 24 horas registrado cada 20 minutos la posición y tomando de inicio un punto aleatorio al igual que la dirección que esta tomaría, esto se realizó por medio del software de simulación PhysiCell (Versión 1.7.1) el cual es un programa de código abierto(<https://github.com/m2be-igg/PhysiCell-ECM>) que permite modelar un ambiente celular a través de una combinación de factores, de igual manera cuenta con módulos definidos por el usuario por lo cual se hizo uso de uno de estos desarrollado por Gonçalves et al., 2021 en la migración de células en una MEC de colágeno a diferentes concentraciones donde se observó que la viscosidad de una matriz extracelular regula la motilidad de células, a mayor concentración de colágeno la motilidad es más compacta.

Además de las características previamente mencionadas otras condiciones de simulación fueron que la viscosidad y densidad fueran constantes, es decir que no se considera alguna modificación debido al tiempo de simulación y a la presencia de las células, también la velocidad fue estimada por medio de la ecuación 16 donde F_{loc}^i se estimó gracias a la función de densidad acumulativa que se desarrolló por Gonçalves et al., 2021 que se muestra a continuación [15].

$$F_{loc}(x) = 1.56x^3 + 3.27x^2 + 0.07x + 0.06$$

Se debe notar que es una estimación de tendencias generales de la migración de las células en una matriz extracelular basado en la viscosidad de esta. En la figura 37 se muestra las trayectorias de las células en las tres formulaciones en un plano 2D y en la figura 38 en 3D, como se observa entre menor es la viscosidad dinámica de la formulación, mayor es la migración.

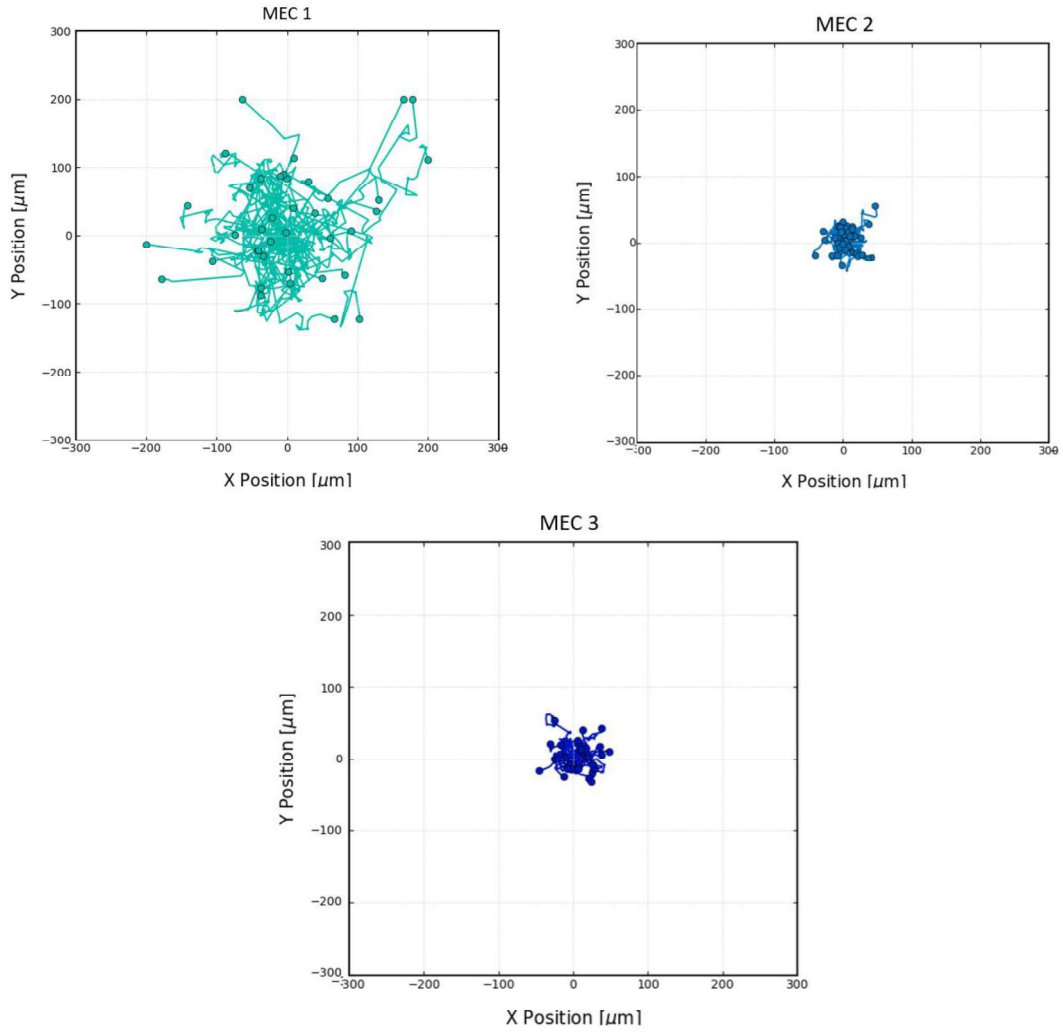
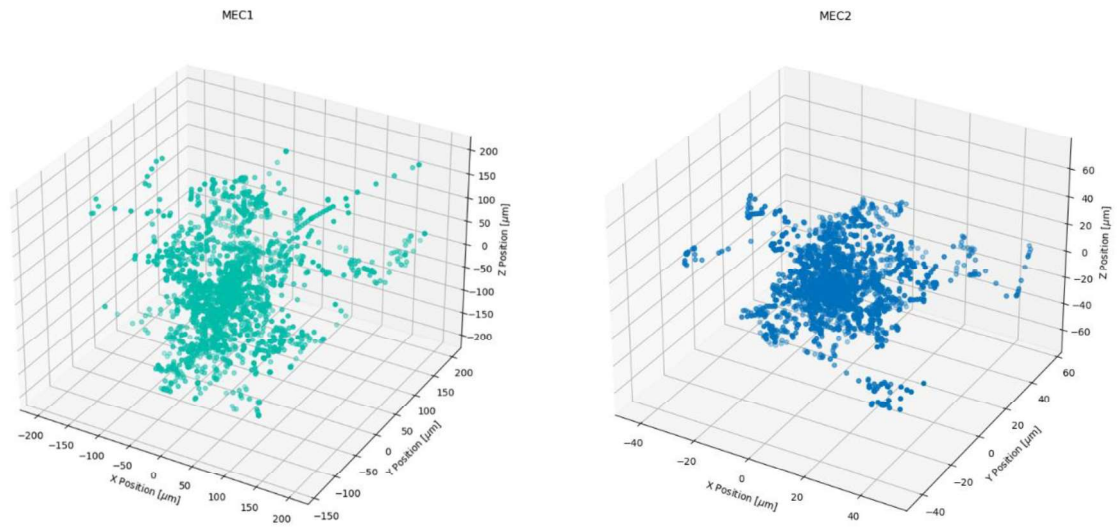


Figura 37. Simulación de la migración de las células en las tres formulaciones de la MEC



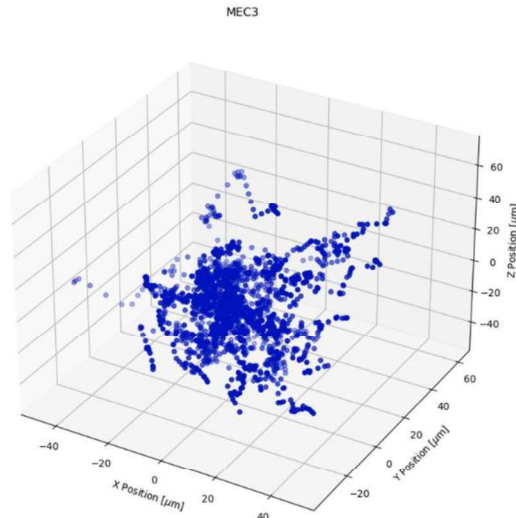


Figura 38. Vista 3D de la simulación de la migración a través de la MEC.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores la formulación que cuenta con un menor desplazamiento de las células permitiría que se formen esferoides más estables de acuerdo con lo que reporta Huang et al., 2020, el cual reporta, que existe una relación entre la motilidad de las células dentro de la MEC y la formación de esferoides, donde entre menos densa y viscosa sea, no permite la formación de esferoides estables. Además de que dentro de su trabajo notó que un flujo intersticial en la MEC aumenta la migración celular [70]. Calculando la distancia entre el punto de partida de la célula y su punto final se obtuvieron los resultados (tabla 8), donde se observa que tercera y segunda formulación el desplazamiento es menor en comparación con la primera, sin embargo, no existe una diferencia significativa.

Tabla 8. Media y desviación estándar de la distancia de migración

Número de MEC	Media	Desviación estándar
1	179.882	56.465
2	37.540	18.168
3	35.032	16.228

4.3.2 Simulación de la MEC en la plataforma

Tomando el modelo 3D de la plataforma previamente diseñado en el software SolidWorks y posteriormente se importó a al software COMSOL Multiphysics 5.5, agregando los atributos físicos y químicos del material el cual es el PDMS las características de este se muestran en la tabla 14 en el anexo 2. Para la simulación del flujo de ambas formulaciones de MECs con tres caudales 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, para la evaluación del movimiento de las células y evaluar con que flujo se depositan mayor número de células. Además, de observar la tensión de corte en las paredes de la plataforma debido al flujo de la MEC y del medio de cultivo se diseñó un modelo 2D de la plataforma y de igual modo del micropozo para apreciar si la forma propiciaba la formación de vórtices. Tomando de referencia la calculadora en la página Web de FLUIGENT, el equipo de FLUIGENT debe ejercer una presión en el reservorio de 33.546 mbar, 167.73 mbar, 335.46 mbar para tener flujos de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ respectivamente.

4.3.2.1. Condiciones de límite.

Las condiciones límite en esta simulación para los modelos tanto 2D como 3D fueron de “No deslizamiento”, la cual nos dice que la velocidad del fluido en las paredes de la plataforma es igual a cero, el uso de esta condición es para evaluar el flujo dentro de la plataforma sin que exista una intervención de esta.

En el caso de la simulación del movimiento de las células las paredes presentan la condición límite de “Isotropic scattering” la cual permite que la energía cinética se conserve haciendo que, si la célula golpea la pared, rebote en cualquier dirección, la condición de la salida es “disappear” la cual al tocar el borde de la salida esta desaparece simulando la salida de la plataforma de igual modo de manera experimental por medio del tubo conectado en la salida de la plataforma.

4.3.2.2 Malla

El diseño de la malla para el modelo de la plataforma 3D (figura 39), es una malla tetraédrica la cual contiene 776,598 elementos, se generó de manera automática por COMSOL Multiphysics 5.5, esta se adecua al problema de acuerdo con la física esto es gracias a que está programada por expertos en cada área por ejemplo en el caso de fluidos, se obtiene una malla más fina en los bordes del modelo generando un mejor resultado[82]. Algunos ejemplos de usos de mallas tetraédricas en el análisis de fluidos, son la simulación realizada por Lopa et al., 2020 en su diseño de micropozo para evaluar el flujo dentro de él y la tensión de corte en las paredes debido al flujo [83], de igual manera la simulación realizada por Charles et al., 2018 para el monitoreo de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en una plataforma microfluidica de 128 canales en la cual encontraron que debido al diseño de la plataforma no se genera vórtices, flujo turbulento o tensiones de corte altas en las paredes de los canales [84].

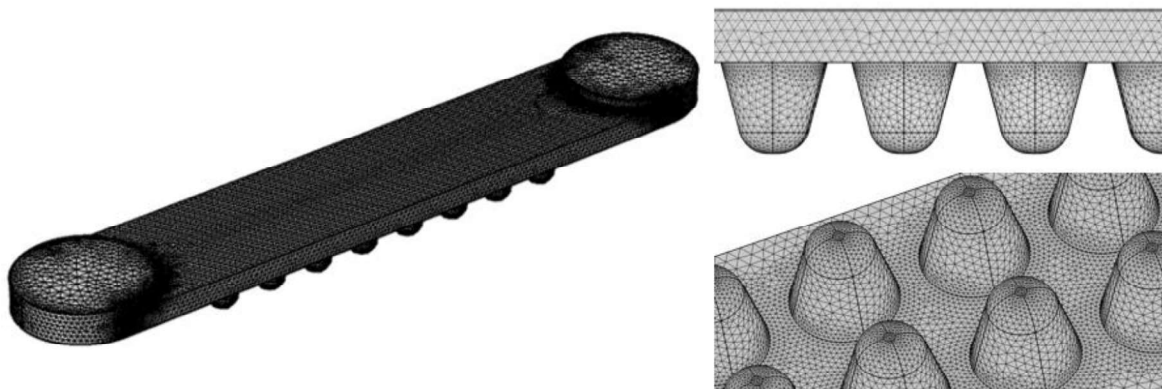


Figura 39. Malla de la plataforma microfluidica con 776598 elementos

El diseño de la malla para el corte de la plataforma 2D (figura 40) la cual es una malla tetraédrica diseñada de manera automática por COMSOL Multiphysics 5.5 ya que de acuerdo con el modelo físico aplicar el software escoge la mejor de manera automática con un total 14892 elementos tetraédricos.



Figura 40. Malla generada por COMSOL Multiphysics 5.5 para el análisis de fluido

El diseño de la malla para el análisis en el micropozo (figura 41) al igual que de la plataforma se generó de manera automática con un total 2851 elementos tetraédricos.

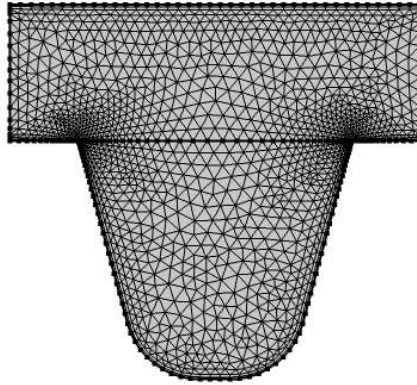


Figura 41. Malla generada por COMSOL Multiphysics 5.5 para el análisis de fluido

4.4 Análisis de resultados

En este apartado se presentan los resultados obtenidos de las simulaciones del medio de cultivo y de las MECs en las diferentes geometrías propuestas.

4.4.1 Distribución de las células en la plataforma

La simulación de la distribución de las células en la plataforma microfluídica se realizó considerando que estas se encuentran inmersas en la MECs que se encuentra a una temperatura de 4°C para que tenga un comportamiento líquido, las células tienen un diámetro de 20µm, y las células tiene una densidad de 1050 kg/m³ determinada por Tada et al., 2018 para la investigación de las propiedades dielectroforéticas de las células HeLa y cáncer de mama (MCF10A) [85] además de que la densidad de células en la MEC es de 10⁵ células/mL. Se simularon tres caudales 10 µL/min, 50 µL/min y 100 µL/min a una presión atmosférica como referencia, para observar la distribución de las células dentro de la plataforma y si estas se depositan en los micropozos, se evaluaron en cuatro tiempos 5, 10, 15 y 20 segundos de igual modo se realiza el conteo de células que se encuentran en los micropozos en los tres caudales que se muestra en la figura 45 y 46 en el histograma.

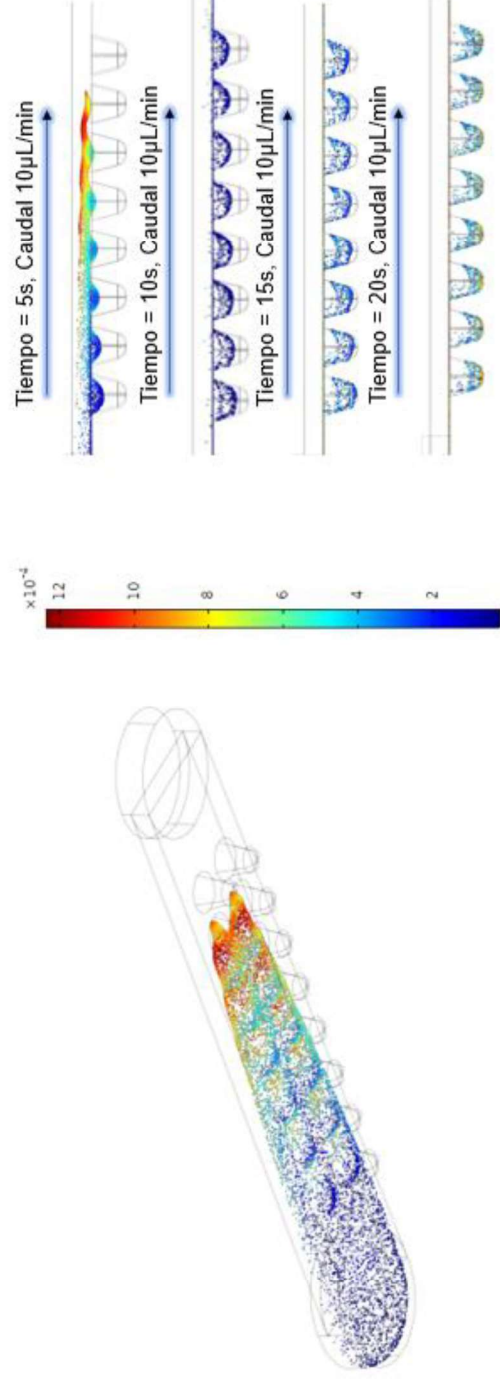


Figura 42. Simulación del movimiento de células con un caudal de 10 µL/min.

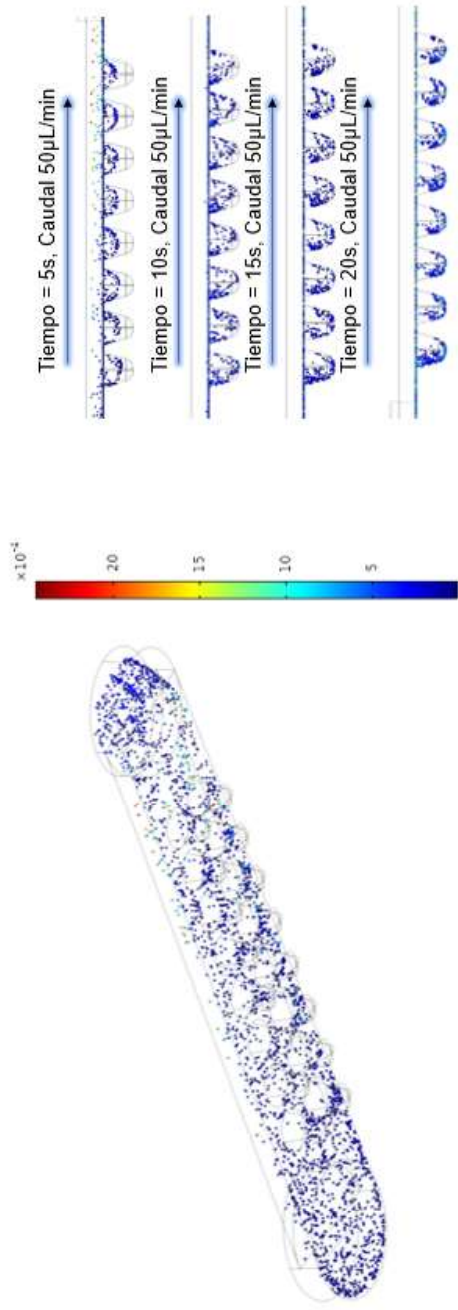


Figura 43. Simulación del movimiento de células con un caudal de $50 \mu\text{L}/\text{min}$.

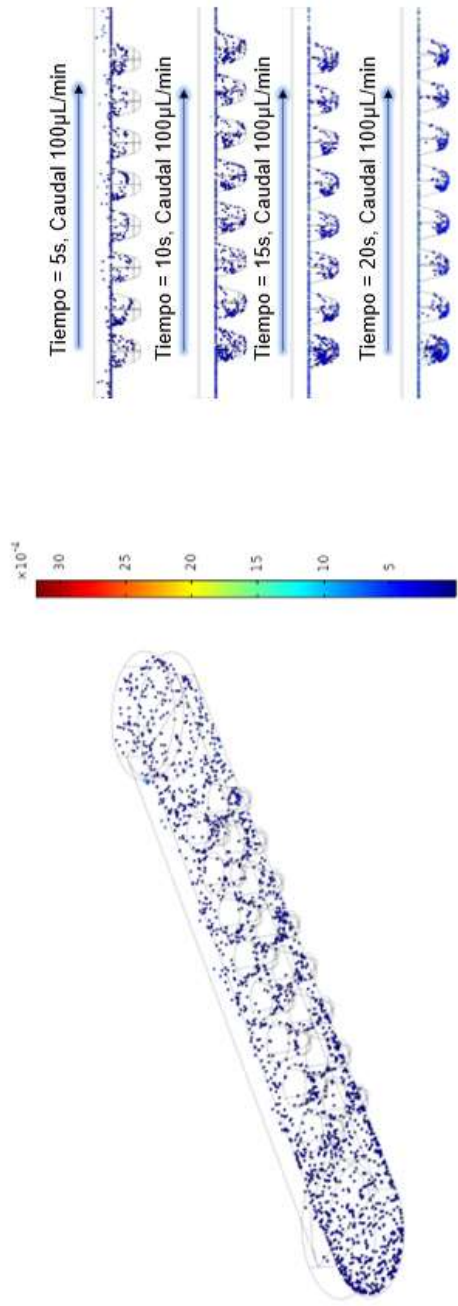


Figura 44. Simulación del movimiento de células con un caudal de $100 \mu\text{L}/\text{min}$.

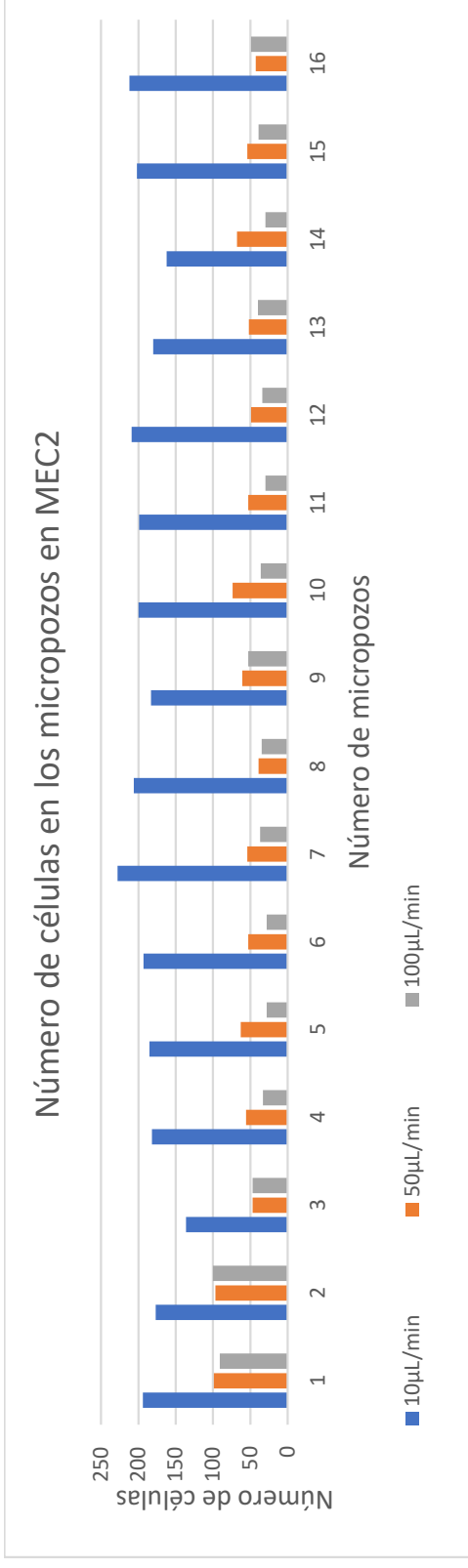


Figura 45. Histograma del número de células por microozo en los tres caudales propuestos en la MEC 2.

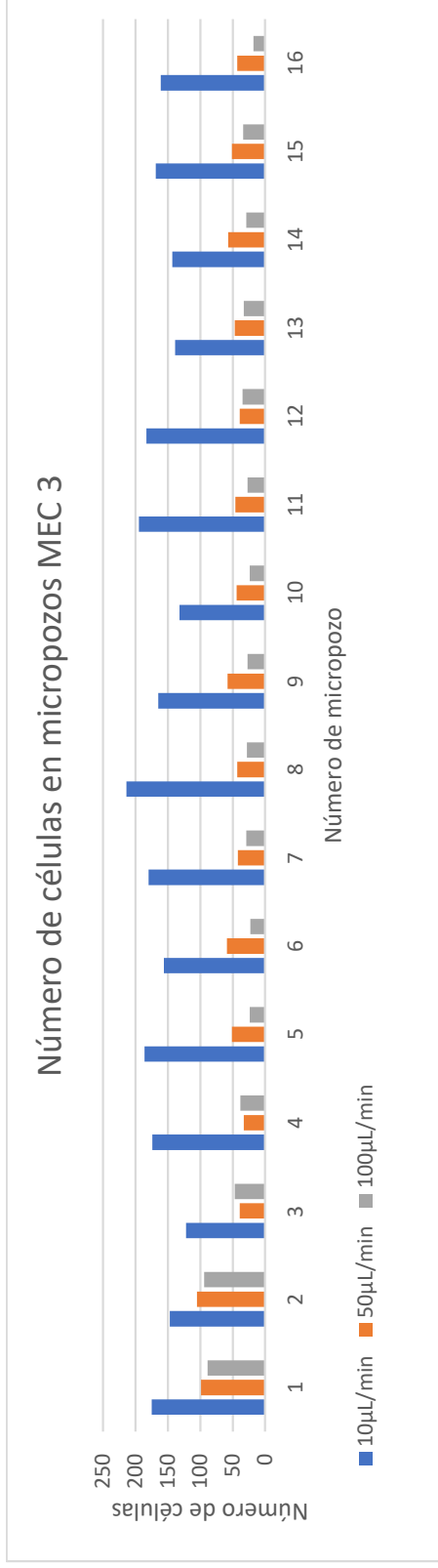


Figura 46. Histograma del número de células por microozo en los tres caudales propuestos en la MEC 3.

Como se observa en la figura 45 y 46 existe una relación entre el número de células en cada micropozo debido al caudal con el que se ingresa las MECs en la plataforma. Con caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ se observa una deposición casi uniforme en los micropozos, para poder observar si existe una mayor deposición de células en la MEC 2 o MEC 3 se realiza un ANOVA con un alfa de 0.5, observa en la tabla 10 el valor p (probabilidad) es menor a 0.05 que confirma que hay una diferencia significativa siendo que la MEC 2 permite una mayor deposición de células con una media de 190 células por micropozo.

Tabla 9. Variables estadísticas

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
MEC2	16	3048	190.5	466.5333333
MEC3	16	2641	165.0625	600.4625

Tabla 10. Análisis ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	5176.53125	1	5176.53125	9.703001808	0.004027841	4.170876786
Dentro de los grupos	16004.9375	30	533.4979167			
Total	21181.46875	31				

Al tener a la MEC 2 como la junto con caudal 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ y se analiza la tensión de corte en las paredes de la plataforma en el modelo 2D para observar si esta no supera los 0.6 Pa (figura 47).

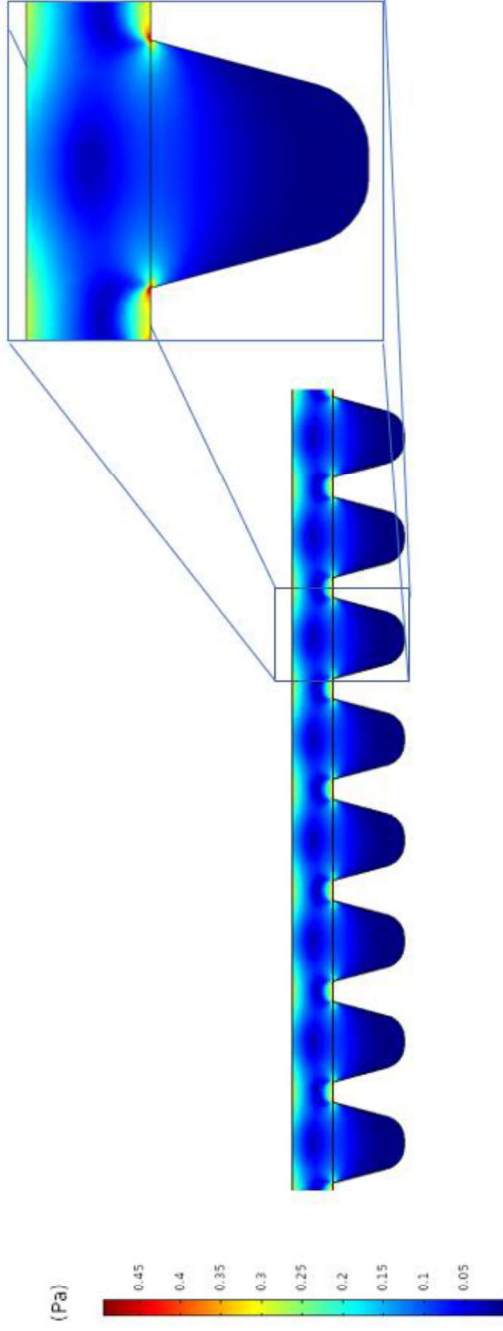


Figura 47. Tensión de corte en las paredes por el ingreso de la MEC

De acuerdo con la figura 47 se puede observar que la tensión de corte en las paredes por el ingreso de la MEC, conforme al mapa de color en los bordes de la plataforma aumenta la tensión, pero esta no sobrepasa los 0.6 Pa, se encuentra en 0.3 y 0.45 Pa. Por lo cual al pasar las células en estas áreas no se dañarían

Por otra parte, se analiza el ingreso del medio de cultivo para observar las líneas de flujo y si este permitiese el intercambio de nutrientes necesarios para las células, así como observar la tensión de corte que está presente en las paredes de la plataforma con el mismo caudal.

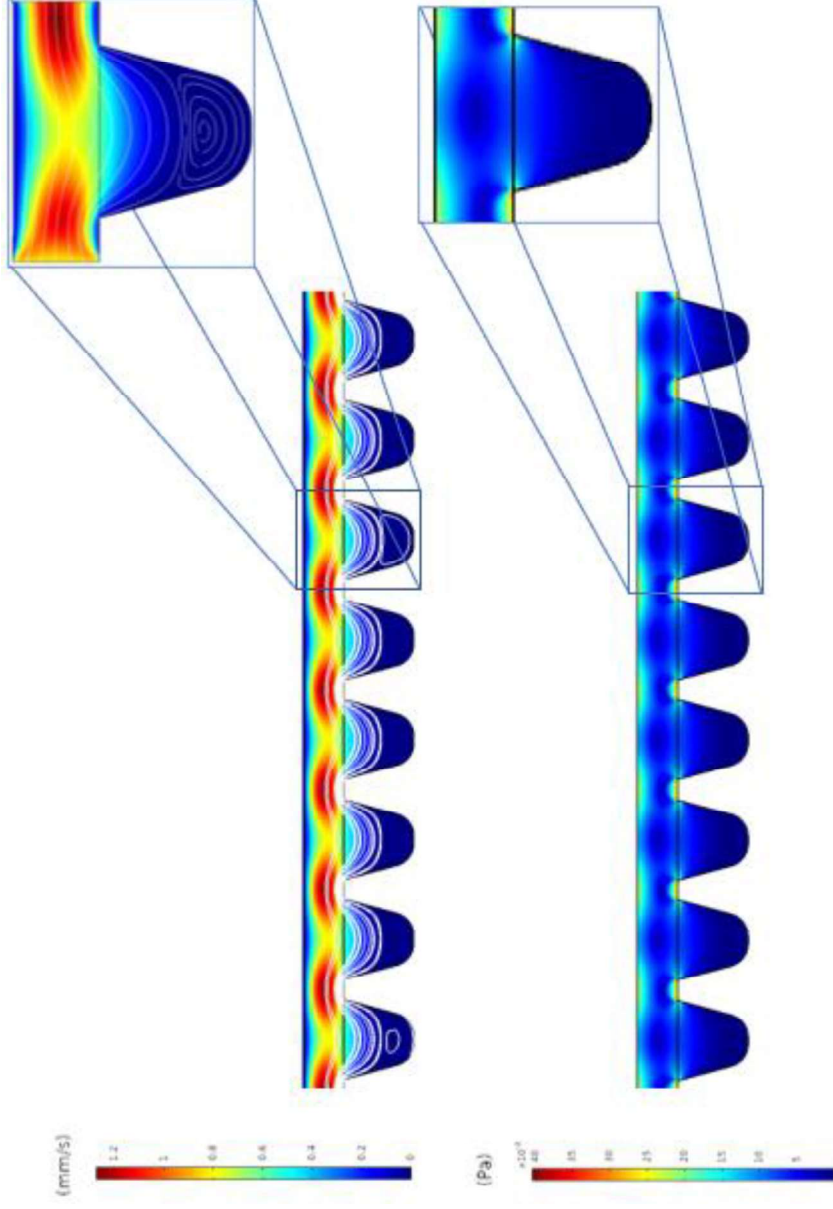


Figura 48. Simulación de DMEM con un caudal de $10 \mu\text{l}/\text{min}$. Diagrama superior análisis de la velocidad y diagrama en la parte inferior tensión de corte generada por el flujo.

En la figura 48 se observa que la geometría del micropozo permite la formación de vórtices en el fondo de este lo cual no es lo ideal debido a que no permite el intercambio de nutrientes necesarios para la proliferación de la línea celular, por otra parte, la tensión de corte en las paredes de la plataforma es muy poca. Tomando el mapa de color se puede observar que en los bordes del micropozo y el canal, la tensión de corte es alrededor de 20mPa , esto permite que no se dañen las células al pasar por estas áreas.

4.4.2 Cambios en la geometría del micropozo

Debido a que la geometría del micropozo presentó la formación de vórtices de decidió modificar la profundidad de este para mejorarlas condiciones de flujo y por lo tanto el intercambio de nutrientes, para esto se propusieron dos profundidades 300 μm y 250 μm . Primero se realizó el conteo de células que quedan atrapadas en los micropozos para observar si existe una diferencia en ambas.

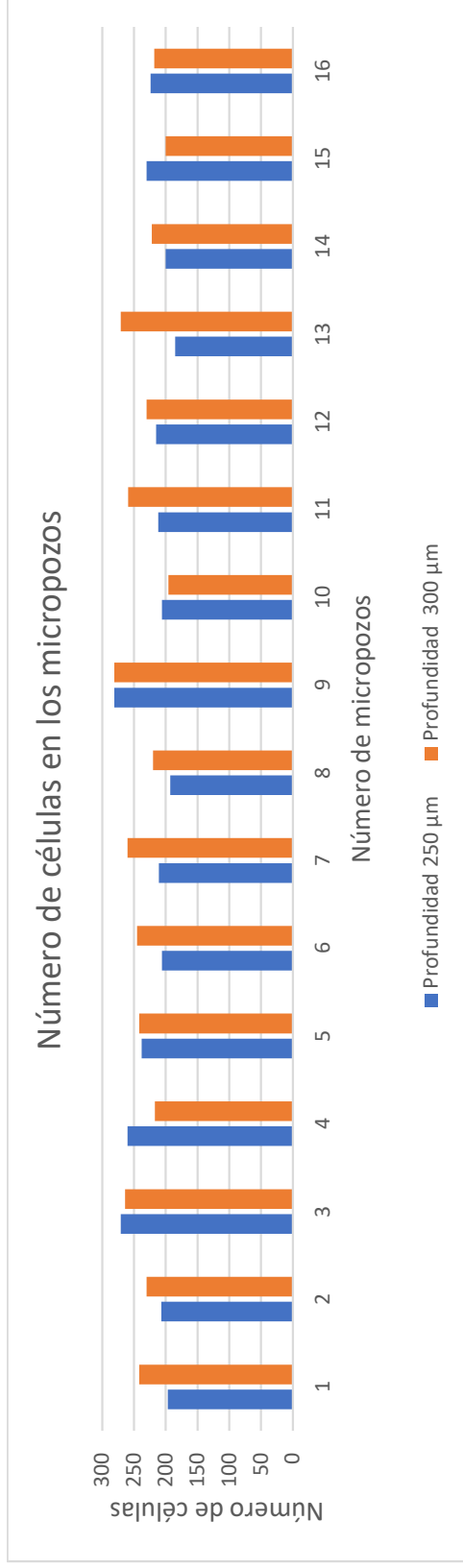


Figura 49. Histograma del número de células por micropozo en dos profundidades con un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Como se aprecia en la figura 49, no se observa una tendencia notable por lo cual se decide hacer un análisis ANOVA de un factor con un alfa de 0.05 para determinar si existe una diferencia significativa.

Tabla 11. Variables estadísticas

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Profundidad 250 μm	16	3536	221	797.3333333
Profundidad 300 μm	16	3797	237.3125	624.6291667

Tabla 12. Análisis ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2128.78125	1	2128.78125	2.994145415	0.093842279	4.170876786
Dentro de los grupos	21329.4375	30	710.98125			
Total	23458.21875	31				

Como se observa en la tabla 12 el valor p (probabilidad) es mayor a 0.05 por lo cual se confirma que no hay diferencia significativa en las medias del número de células en los micropozos. Por lo cual se realizaron simulaciones de las dos profundidades para observar cuál de las dos generaba vórtices en el ingreso del medio de cultivo.

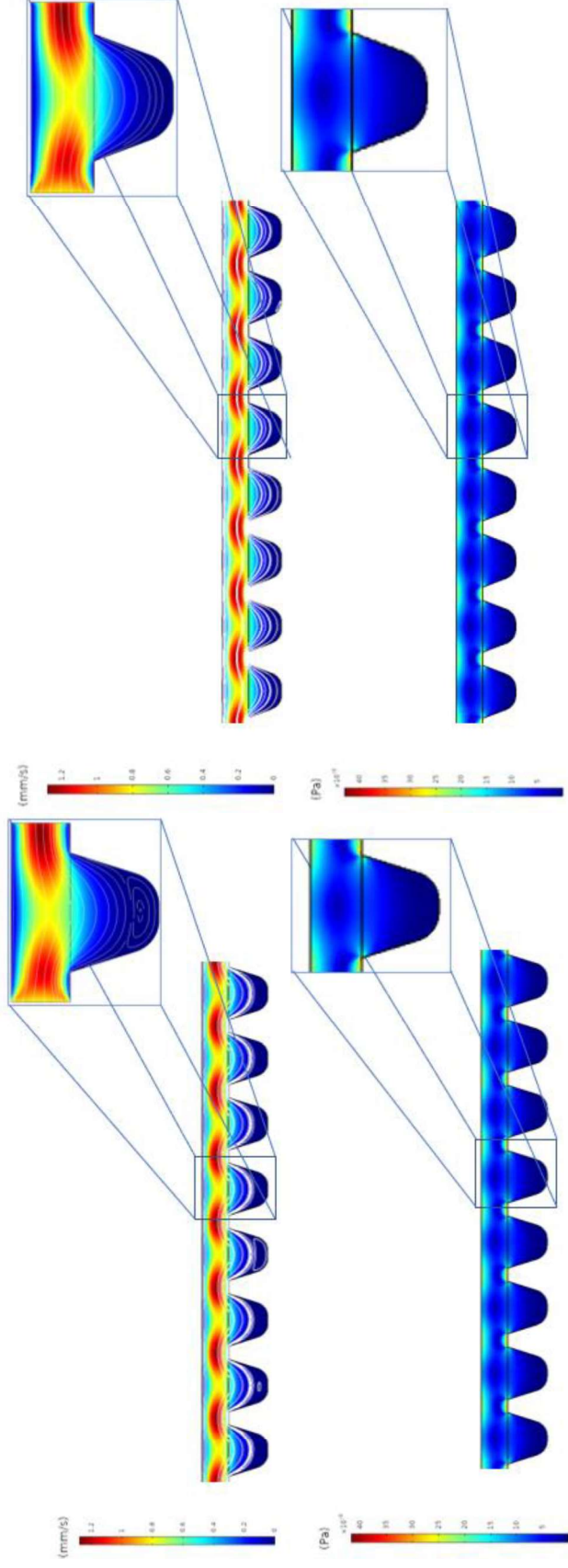
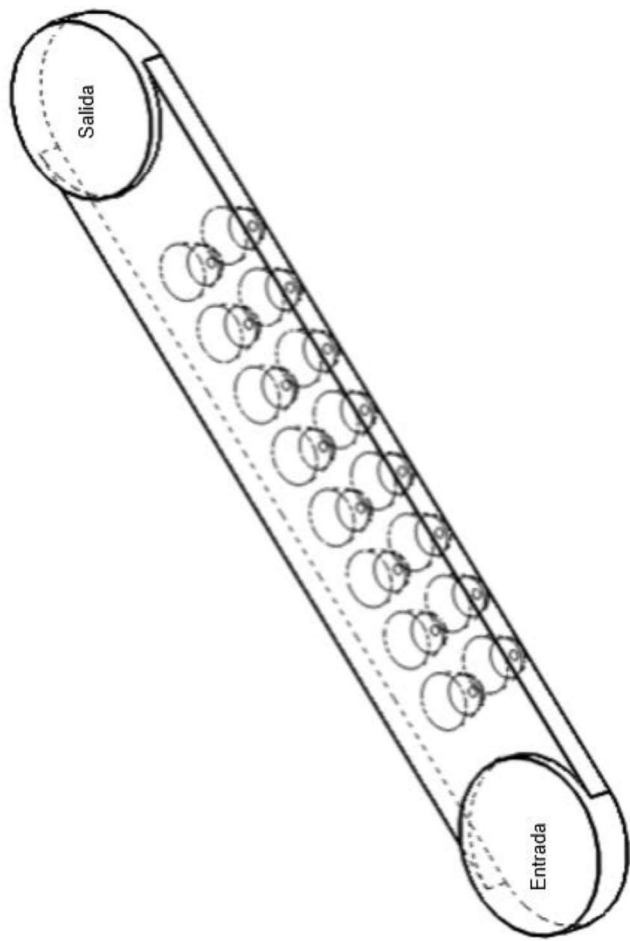
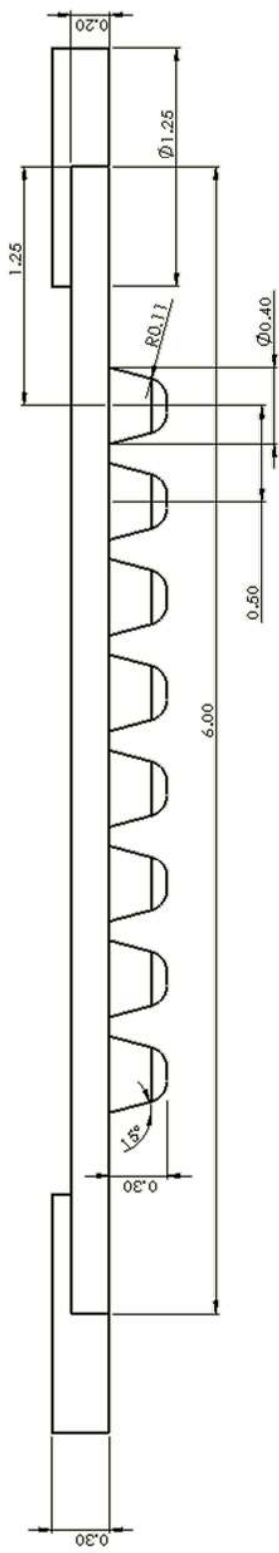


Figura 50. Simulación de DMEM con un caudal de $10 \mu\text{l}/\text{min}$. Izquierda Diagrama superior análisis de la velocidad y diagrama de corte generada por el flujo con una profundidad de $300 \mu\text{m}$. Derecha Diagrama superior análisis de la velocidad y diagrama de corte generada por el flujo con una profundidad de $350 \mu\text{m}$.

En la figura 50 se observa que la profundidad de $300 \mu\text{m}$ presenta la generación de un vórtice que es menor al que el presente en el micropozo con una profundidad de $350 \mu\text{m}$. Lo cual permite un intercambio de nutrientes, desecho y la tensión de corte en las paredes de acuerdo con la tabla de color se encuentra alrededor de 25 mPa . Por otra parte, los micropozos con una profundidad de $250 \mu\text{m}$ no presenta la formación de vórtices y la tensión de corte en las paredes es similar a la que presenta los micropozos de $300 \mu\text{m}$. Una desventaja que presenta los micropozos de $250 \mu\text{m}$ es que favorecen la migración de las células que se encuentran en el fondo de micropozo con el cambio constante del DMEM lo cual dificultaría la formación de los esferoides en la plataforma. La profundidad del micropozo tiene una correlación significativa con la formación de vórtices en ellos debido al flujo del fluido, además, de que la tensión de corte puede aumentar o disminuir debido a esta característica geométrica. Siendo así la plataforma final optimizada se muestra en la figura 51.



a)



b)

Figura 51. Plataforma final. a) Vista 3D b) Acotaciones de las medidas en milímetros

4.5 Interpretación de resultados

En esta sección se describen a detalle los resultados obtenidos de las simulaciones realizadas. Las cuales se refieren al análisis de la migración de las células en la MEC, la movilidad de las células en la plataforma, la velocidad y tensión de corte en la plataforma y en el micropozo.

La rigidez del entorno extracelular en un cultivo influye en la migración de las células de manera positiva o negativa, en sistemas que se encuentran en perfusión o presencia de flujos, se vuelve un factor clave debido a que aumenta la migración, lo cual dificulta la formación de esferoides tumorales. Debido a esto en este trabajo se escogió la MEC 2 con una viscosidad de $11.7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ y $1.37 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$, la cual en la simulación de la migración celular se observó que restringe la motilidad de las células debido a la viscosidad de la formulación y a su vez se decidió no optimizar la MEC debido a la limitación de los datos como la difusión de oxígeno y la difusión de glucosa a través de esta, ya que estas constantes son importantes para la viabilidad del cultivo celular, estas se obtienen de manera experimental con ayuda de sensores de oxígeno o sensores enzimáticos en el caso de la glucosa, y esto restringe el poder optimizar la formulación de la MEC por medio de simulación.

El caudal a la hora de ingresar la MEC formulada con Matrigel y colágeno tipo I cola de rata junto con la densidad de las células juega un papel importante en la deposición como se observó en los histogramas (figura 45 y 46) donde se observó que a mayor caudal la deposición de células es menor, lo cual concuerda con lo reportado por M. A. Hajari et al., 2021 donde si a una viscosidad alta se requiere un caudal más rápido y esto provoca mayor tensión de corte en las paredes de la plataforma.

El análisis de la velocidad y tensión de corte en la plataforma permitió evaluar en que áreas la velocidad es mayor debido a los caudales y como estos generan una tensión de corte en las paredes de la plataforma, la cual puede ser dañina si se supera el límite de 0.6 Pa . El tener un canal de $200 \mu\text{m}$ reduce la tensión de corte considerablemente en comparación con la plataforma realizada por Zuchowska et al., 2017 donde su microcanal de $100 \mu\text{m}$ presenta mayor tensión de corte en las paredes. Por lo cual se nota que la geometría de la plataforma influye de manera significativa en factores como la tensión de corte, así como la formación de vórtices no deseables en los micropozos

En el análisis de los micropozos se puede ver una relación entre la profundidad del micropozo tal como lo reporta Behroodi et al., 2020, la medida ideal independiente de los 3 caudales que se simularon es de $300 \mu\text{m}$ o mayor a $250 \mu\text{m}$, a su vez la tensión de corte en un micropozo se encuentra entre los 20 mPa por el ingreso de medio de cultivo el cual se encuentra por debajo del límite permisible. Además, se realizó una simulación obteniendo el conteo de células en cada micropozo con dos profundidades en las cuales no se encontró una diferencia significativa, Sin embargo, la profundidad de $300 \mu\text{m}$ es la ideal para el desarrollo del cultivo celular ya que el vórtice no es pronunciado y permite el intercambio de nutrientes como fue observado en sus micropozos de fondo plano de Behroodi et al., 2020.

Capítulo 5. Conclusiones

Los cultivos celulares sobre plataformas microfluídicas basados en esferoides depende de cuatro características principales, la MEC, la geometría de la plataforma, el intercambio del medio de cultivo y el caudal de ingreso, que se evaluaron en este trabajo por medio de simulación.

La MEC es el ambiente biomimético donde las células van a desarrollarse, proliferar y expresar características como la morfología, proliferación y diferenciación, debido a esto la formulación debe cumplir con requisitos como un pH en el rango de 6.7 a 7, permitir la motilidad celular y si la MEC se ingresara en una plataforma microfluídica no debe ser tener una viscosidad alta ya que el caudal con el que ingrese aumentara la tensión de corte en las paredes y superaría los 0.6 Pa como límite. Además de reducir la motilidad por lo cual la formación de esferoides se vería comprometida.

La geometría de la plataforma y dimensiones de los micropozos y el canal principal juega un rol importante, ya que de esta dependerá si las células experimentan magnitudes superiores como la tensión de corte en valores superiores a 0.6 Pa provocando así que no sea viable el cultivo debido al daño que sufrirán las células, así como también, el número de células que pueden ingresar en un micropozo por las dimensiones. La altura del canal principal es un parámetro para delimitar el caudal, ya que en las paredes y bordes se puede generar una tensión de corte superior a 0.6 Pa lo cual afectara a las células antes de que se formen esferoides en los micropozos.

El intercambio del medio de cultivo, una vez formados los esferoides con algún biopolímero o no, es importante debido a que, al no ser un sistema de perfusión continuo por el diseño de la plataforma. El medio de cultivo debe ser cambiando con regularidad con un caudal específico para que este no disocie a los esferoides formados y no se generen vórtices en el fondo de los micropozos los cuales no permitirían de forma ideal el intercambio de nutrientes. El caudal de una plataforma microfluídica determina las magnitudes de las fuerzas que puedan experimentar las células, así como el intercambio de nutrientes y de los desechos de manera que los esferoides formados proliferen. El caudal de 100 μ L/min no es el óptimo de acuerdo con los resultados obtenidos ya que la deposición de las células en los micropozos es menor, así como un aumento en la tensión de corte en las paredes de la plataforma. Por lo cual el caudal depende la viscosidad de medio cultivo y de la MEC.

Por otra parte, el alcance de los softwares de simulación permite optimizar, entender y analizar variables que pueden ser difíciles de medir de manera experimental, además de tener la ventaja del ahorro de costos en el desarrollo de cultivos celulares. Así mismo permite evaluar si la geometría de la plataforma es viable para la creación y soportar de un cultivo celular, sin embargo, es una herramienta con limitaciones debido a la complejidad de fenómenos característicos en cultivos celulares como son las interacciones de las células con la matriz extracelular y la interacción con las células vecinas o la obtención de parámetros de la MEC como la difusión de oxígeno, el tamaño de las fibras de la red, la difusión de glucosa y la degradación de la MEC a causa de las células, del mismo modo, la complejidad del problema dicta la demanda de recursos de cómputo que requiera existiendo una diferencia económica debido a la características de cómputo.

Tomando en consideración los resultados obtenidos, se concluye que la hipótesis planteada para el desarrollo de esta investigación es verdadera, debido a que, considerando los parámetros como la tensión de corte y la viscosidad de la matriz extracelular, se puede estimar el comportamiento de las células y el análisis de las fuerzas que experimentan por medio de simulación.

Capítulo 6. Recomendaciones para investigaciones futuras.

Se propone como trabajo la realización de la formulación propuesta de la MEC y las mediciones experimentales como la viscosidad, su coeficiente de difusión de oxígeno y glucosa para la realización de simulaciones donde se observe el consumo por los esferoides formados en los micropozos, así como, el análisis de la tensión de corte que sufrirán los esferoides debido al intercambio del medio de cultivo y determinar el caudal adecuado para mantener esta tensión por debajo de 0.6 Pa.

Adicionalmente se propone el análisis y evaluación de viabilidad en la plataforma (figura 52) en la cual se presenta una división en tres micro canales y con un mayor número de micropozos con el mismo diámetro y una profundidad de 300 μm , donde se presente la formación de los esferoides y la realización de simulación con nanopartículas que funcionen como una alternativa a tratamiento de cáncer.

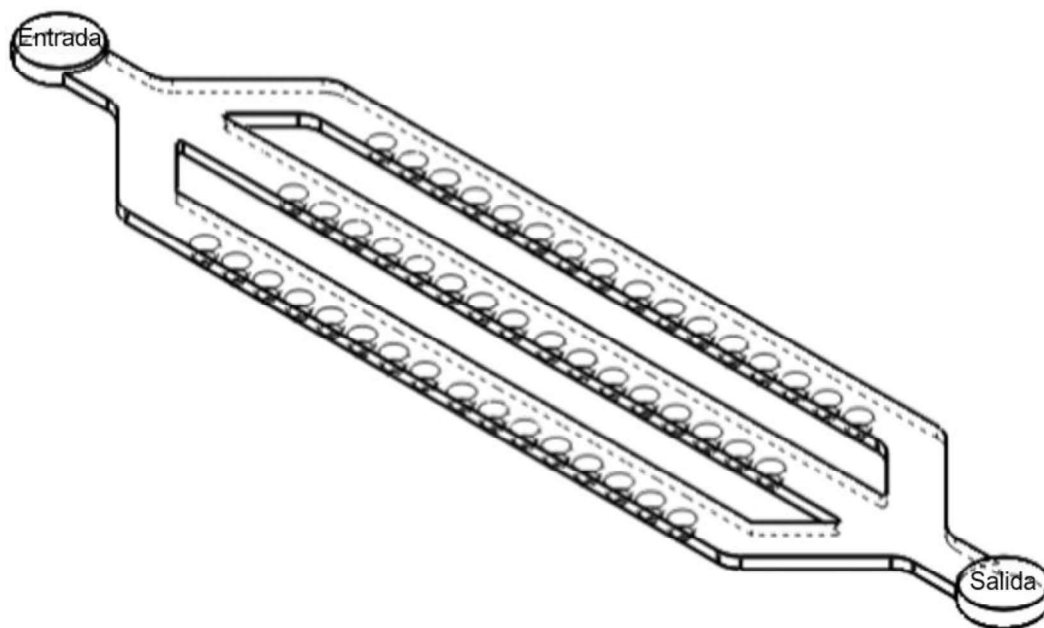
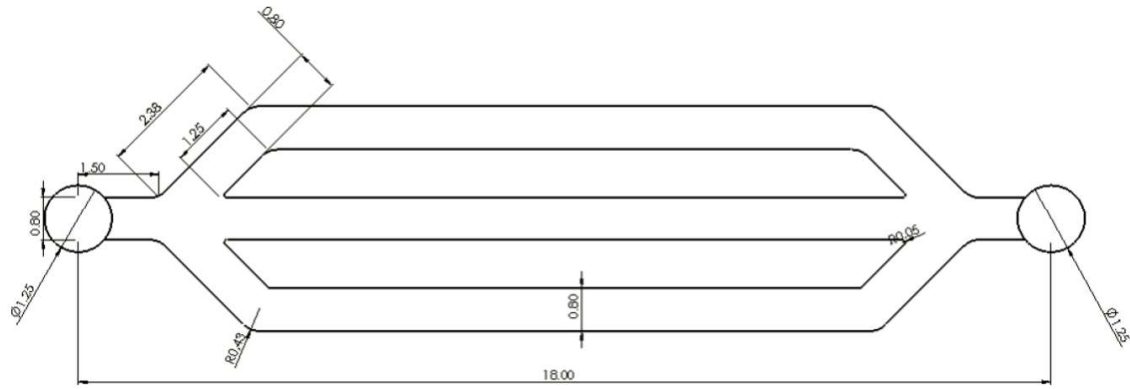
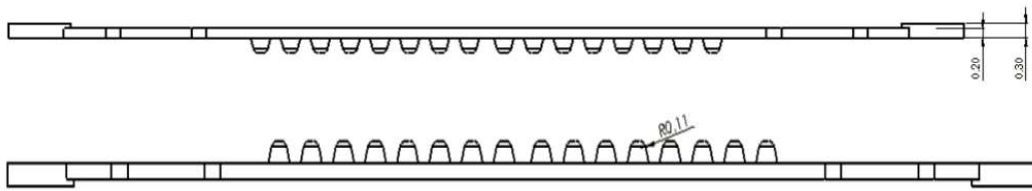


Figura 52. Plataforma sugerida.



A



B

Figura 53. Medidas de la plataforma propuesta en milímetros. A) Vista superior B) Vistas laterales

Capítulo 7. Bibliografía

- [1] J. Nicolas, S. Magli, L. Rabbachin, S. Sampaolesi, F. Nicotra, y L. Russo, “3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate”, *Biomacromolecules*, vol. 21, núm. 6, pp. 1968–1994, jun. 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00045.
- [2] K. Duval *et al.*, “Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture”, *Physiology*, vol. 32, núm. 4, pp. 266–277, jul. 2017, doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
- [3] K. M. Park, D. Lewis, y S. Gerecht, “Bioinspired Hydrogels to Engineer Cancer Microenvironments”, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 19, núm. 1, pp. 109–133, jun. 2017, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044619.
- [4] H. Song, G. Cai, J. Liang, D. Ao, H. Wang, y Z. Yang, “Three-dimensional culture and clinical drug responses of a highly metastatic human ovarian cancer HO-8910PM cells in nanofibrous microenvironments of three hydrogel biomaterials”, *J. Nanobiotechnology*, vol. 18, núm. 1, p. 90, dic. 2020, doi: 10.1186/s12951-020-00646-x.
- [5] “Matrigel Matrix | Extracellular Matrix | Corning”. <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html> (consultado abr. 28, 2021).
- [6] N. Gupta, J. R. Liu, B. Patel, D. E. Solomon, B. Vaidya, y V. Gupta, “Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research”, *Bioeng. Transl. Med.*, vol. 1, núm. 1, pp. 63–81, 2016, doi: 10.1002/btm2.10013.
- [7] M. A. Hajari, S. Baheri Islami, y X. Chen, “A numerical study on tumor-on-chip performance and its optimization for nanodrug-based combination therapy”, *Biomech. Model. Mechanobiol.*, feb. 2021, doi: 10.1007/s10237-021-01426-8.
- [8] M. Gargotti, U. Lopez-Gonzalez, H. J. Byrne, y A. Casey, “Comparative studies of cellular viability levels on 2D and 3D in vitro culture matrices”, *Cytotechnology*, vol. 70, núm. 1, pp. 261–273, feb. 2018, doi: 10.1007/s10616-017-0139-7.
- [9] J. Wu, Q. Chen, W. Liu, Z. He, y J.-M. Lin, “Recent advances in microfluidic 3D cellular scaffolds for drug assays”, *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 87, pp. 19–31, feb. 2017, doi: 10.1016/j.trac.2016.11.009.
- [10] M. W. Tibbitt y K. S. Anseth, “Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture”, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 103, núm. 4, pp. 655–663, jul. 2009, doi: 10.1002/bit.22361.
- [11] A. D. Castiaux, D. M. Spence, y R. Scott Martin, “Review of 3D cell culture with analysis in microfluidic systems”, *Anal. Methods*, vol. 11, núm. 33, pp. 4220–4232, 2019, doi: 10.1039/C9AY01328H.
- [12] Y. Zhao, R. Kankala, S.-B. Wang, y A.-Z. Chen, “Multi-Organs-on-Chips: Towards Long-Term Biomedical Investigations”, *Molecules*, vol. 24, núm. 4, p. 675, feb. 2019, doi: 10.3390/molecules24040675.
- [13] B. Choi, S. Kim, B. Lin, B. M. Wu, y M. Lee, “Cartilaginous Extracellular Matrix-Modified Chitosan Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, núm. 22, pp. 20110–20121, nov. 2014, doi: 10.1021/am505723k.
- [14] H. S. Santana, J. Lameu da Silva Jr, y O. P. Taranto, Eds., *Process Analysis, Design, and Intensification in Microfluidics and Chemical Engineering*: IGI Global, 2019. doi: 10.4018/978-1-5225-7138-4.
- [15] I. G. Gonçalves y J. M. Garcia-Aznar, “Extracellular matrix density regulates the formation of tumour spheroids through cell migration”, *PLOS Comput. Biol.*, vol. 17, núm. 2, p. e1008764, feb. 2021, doi: 10.1371/journal.pcbi.1008764.
- [16] Y. Zhao *et al.*, “Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model *in vitro*”, *Biofabrication*, vol. 6, núm. 3, p. 035001, abr. 2014, doi: 10.1088/1758-5082/6/3/035001.

- [17] D. Park *et al.*, “High-Throughput Microfluidic 3D Cytotoxicity Assay for Cancer Immunotherapy (CACI-IMPACT Platform)”, *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 1133, may 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01133.
- [18] H. Orozco, “Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion ‘Salvador Zubiran’”, *Arch. Surg.*, vol. 138, núm. 9, p. 940, sep. 2003, doi: 10.1001/archsurg.138.9.940.
- [19] M. Tenje *et al.*, “A practical guide to microfabrication and patterning of hydrogels for biomimetic cell culture scaffolds”, *Organs---Chip*, vol. 2, p. 100003, dic. 2020, doi: 10.1016/j.ooc.2020.100003.
- [20] S. Saeedi Garakani *et al.*, “Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 143, pp. 533–545, ene. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.040.
- [21] K. Moshksayan *et al.*, “Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture”, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 263, pp. 151–176, jun. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.01.223.
- [22] B. Patra, Y.-H. Chen, C.-C. Peng, S.-C. Lin, C.-H. Lee, y Y.-C. Tung, “A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis”, *Biomicrofluidics*, vol. 7, núm. 5, p. 054114, sep. 2013, doi: 10.1063/1.4824480.
- [23] H. Ma *et al.*, “Multicellular Tumor Spheroids as an in Vivo–Like Tumor Model for Three-Dimensional Imaging of Chemotherapeutic and Nano Material Cellular Penetration”, *Mol. Imaging*, vol. 11, núm. 6, p. 7290.2012.00012, nov. 2012, doi: 10.2310/7290.2012.00012.
- [24] Y. Wang y J. Wang, “Mixed hydrogel bead-based tumor spheroid formation and anticancer drug testing”, *The Analyst*, vol. 139, núm. 10, pp. 2449–2458, 2014, doi: 10.1039/C4AN00015C.
- [25] S. J. Bidarra y C. C. Barrias, “3D Culture of Mesenchymal Stem Cells in Alginate Hydrogels”, en *Stem Cell Niche*, vol. 2002, K. Turksen, Ed. New York, NY: Springer New York, 2018, pp. 165–180. doi: 10.1007/7651_2018_185.
- [26] J. B. Kim, “Three-dimensional tissue culture models in cancer biology”, *Semin. Cancer Biol.*, vol. 15, núm. 5, pp. 365–377, oct. 2005, doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.002.
- [27] N. A. Pattanashetti, G. B. Heggannavar, y M. Y. Kariduraganavar, “Smart Biopolymers and their Biomedical Applications”, *Procedia Manuf.*, vol. 12, pp. 263–279, 2017, doi: 10.1016/j.promfg.2017.08.030.
- [28] M. O. Ilomuanya, “Hydrogels as biodegradable biopolymer formulations”, en *Biopolymer-Based Formulations*, Elsevier, 2020, pp. 561–585. doi: 10.1016/B978-0-12-816897-4.00023-0.
- [29] Sigma Aldrich, “Collagen, Type I”. Consultado: abr. 27, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/3/c3867dat.pdf>
- [30] “Collagen Type I, Rat Tail | 3D Cell Culture Gels & Coating”, *ibidi*. https://ibidi.com/cell-culture-microscopy/107-collagen-type-i-rat-tail.html?gclid=CjwKCAjw7J6EBhBDEiwA5UUM2sdxFtjqoWt0aaVydZRCQyx9AOUyVR-psEfuAlOW5cwaQ9QtcDCEXBoCpToQAvD_BwE (consultado abr. 28, 2021).
- [31] “Collagen I, rat tail”. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1048301> (consultado jun. 13, 2021).
- [32] Y. Li *et al.*, “Controlled generation of cell–laden hydrogel microspheres with core–shell scaffold mimicking microenvironment of tumor”, *Chin. Phys. B*, vol. 27, núm. 12, p. 128703, dic. 2018, doi: 10.1088/1674-1056/27/12/128703.
- [33] M. Anguiano *et al.*, “The use of mixed collagen-Matrigel matrices of increasing complexity recapitulates the biphasic role of cell adhesion in cancer cell migration: ECM sensing, remodeling and forces at the leading edge of cancer invasion”, *PLOS ONE*, vol. 15, núm. 1, p. e0220019, ene. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0220019.
- [34] “Sodium alginate W201502”, 9005-38-3. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w201502> (consultado abr. 28, 2021).

- [35] “Alginic acid sodium salt from brown algae BioReagent, suitable for plant cell culture, low viscosity, powder | Sigma-Aldrich”. <http://www.sigmaaldrich.com/> (consultado jun. 13, 2021).
- [36] R. Silva *et al.*, “Hydrogel matrices based on elastin and alginate for tissue engineering applications”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, pp. 614–625, jul. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.091.
- [37] H. Gutiérrez Pulido y R. De la vara Salazar, *Análisis y diseño de experimntos*, 3ra ed. Mc Graw Hill.
- [38] G. R. Bardajee, S. Azimi, y M. B. A. S. Sharifi, “Ultrasonically accelerated synthesis of silver nanocomposite hydrogel based on salep biopolymer: application in Rhodamine dye adsorption”, *Iran. Polym. J.*, vol. 25, núm. 12, pp. 1047–1063, dic. 2016, doi: 10.1007/s13726-016-0490-0.
- [39] P. R. Amarachinta, G. Sharma, N. Samed, A. K. Chettupalli, M. Alle, y J.-C. Kim, “Central composite design for the development of carvedilol-loaded transdermal ethosomal hydrogel for extended and enhanced anti-hypertensive effect”, *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, núm. 1, p. 100, dic. 2021, doi: 10.1186/s12951-021-00833-4.
- [40] “MEMS Module User’s Guide”. COMSOL, 2018 1998. Consultado: jun. 01, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://doc.comsol.com/5.4/doc/com.comsol.help.mems/MEMSModuleUsersGuide.pdf>
- [41] Y. C. Zhao *et al.*, “Hemodynamic analysis for stenosis microfluidic model of thrombosis with refined computational fluid dynamics simulation”, *Sci. Rep.*, vol. 11, núm. 1, p. 6875, dic. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-86310-2.
- [42] D. Truong, J. Puleo, A. Llave, G. Mouneimne, R. D. Kamm, y M. Nikkhah, “Breast Cancer Cell Invasion into a Three Dimensional Tumor-Stroma Microenvironment”, *Sci. Rep.*, vol. 6, núm. 1, p. 34094, dic. 2016, doi: 10.1038/srep34094.
- [43] A. F. Méndez-Sánchez, L. Pérez-Trejo, y A. M. P. Mercado, “Determinación de la viscosidad de fluidos newtonianos y no newtonianos (una revisión del viscosímetro de Couette)”, vol. 4, núm. 1, p. 9, 2010.
- [44] O. Sartipzadeh, S. M. Naghib, A. Seyfoori, M. Rahmanian, y F. S. Fateminia, “Controllable size and form of droplets in microfluidic-assisted devices: Effects of channel geometry and fluid velocity on droplet size”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 109, p. 110606, abr. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110606.
- [45] Ç. Yunus A. y J. M. CIMBALA, *MECÁNICA DE FLUIDOS Fundamentos y aplicaciones*, Primera. México: Mc Graw Hill, 2006.
- [46] “What Are the Navier-Stokes Equations?” <https://www.comsol.com/multiphysics/navier-stokes-equations> (consultado may 31, 2021).
- [47] E. Behroodi, H. Latifi, Z. Bagheri, E. Ermis, S. Roshani, y M. Salehi Moghaddam, “A combined 3D printing/CNC micro-milling method to fabricate a large-scale microfluidic device with the small size 3D architectures: an application for tumor spheroid production”, *Sci. Rep.*, vol. 10, núm. 1, p. 22171, dic. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-79015-5.
- [48] A. J. Smits, *Mecánica de fluidos. Una introducción física*. Alfaomega, 2003.
- [49] Y. Gou, Y. Jia, P. Wang, y C. Sun, “Progress of Inertial Microfluidics in Principle and Application”, *Sensors*, vol. 18, núm. 6, p. 1762, jun. 2018, doi: 10.3390/s18061762.
- [50] S. S. Karunarathne y L.-A. Tokheim, “Comparison of the influence of drag models in CFD simulation of particle mixing and segregation in a rotating cylinder”, sep. 2017, pp. 151–156. doi: 10.3384/ecp17138151.
- [51] N. Rousset, F. Monet, y T. Gervais, “Simulation-assisted design of microfluidic sample traps for optimal trapping and culture of non-adherent single cells, tissues, and spheroids”, *Sci. Rep.*, vol. 7, núm. 1, p. 245, dic. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-00229-1.
- [52] U. Hashim, P. N. A. Diyana, y T. Adam, “Numerical simulation of Microfluidic devices”, en *2012 10th IEEE International Conference on Semiconductor Electronics (ICSE)*, Kuala Lumpur, Malaysia, sep. 2012, pp. 26–29. doi: 10.1109/SMElec.2012.6417083.

- [53] A. Zuchowska, E. Jastrzebska, K. Zukowski, M. Chudy, A. Dybko, y Z. Brzozka, “A549 and MRC-5 cell aggregation in a microfluidic *Lab-on-a-chip* system”, *Biomicrofluidics*, vol. 11, núm. 2, p. 024110, mar. 2017, doi: 10.1063/1.4979104.
- [54] K. Kwapiszewska, A. Michalczuk, M. Rybka, R. Kwapiszewski, y Z. Brzózka, “A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening”, *Lab Chip*, vol. 14, núm. 12, pp. 2096–2104, 2014, doi: 10.1039/C4LC00291A.
- [55] M. Astolfi *et al.*, “Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy”, *Lab. Chip*, vol. 16, núm. 2, pp. 312–325, 2016, doi: 10.1039/C5LC01108F.
- [56] S. Torino, B. Corrado, M. Iodice, y G. Coppola, “PDMS-Based Microfluidic Devices for Cell Culture”, *Inventions*, vol. 3, núm. 3, Art. núm. 3, sep. 2018, doi: 10.3390/inventions3030065.
- [57] E. M. James, *Polymer Data Handbook*.
- [58] L.-D. Ma *et al.*, “Design and fabrication of a liver-on-a-chip platform for convenient, highly efficient, and safe *in situ* perfusion culture of 3D hepatic spheroids”, *Lab. Chip*, vol. 18, núm. 17, pp. 2547–2562, 2018, doi: 10.1039/C8LC00333E.
- [59] J. Ruppen *et al.*, “Towards personalized medicine: chemosensitivity assays of patient lung cancer cell spheroids in a perfused microfluidic platform”, *Lab. Chip*, vol. 15, núm. 14, pp. 3076–3085, 2015, doi: 10.1039/C5LC00454C.
- [60] Jonathan J. M. Landry *et al.*, “The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line”, *G3 Genes Genomes Genet.*, vol. 3, núm. 8, pp. 1213–1224, ago. 2013, doi: 10.1534/g3.113.005777.
- [61] Á. A y J. Pablo, “Henrietta lacks. el nombre detrás de las células hela, primera línea celular inmortal humana”, *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 24, núm. 4, pp. 726–729, jul. 2013, doi: 10.1016/S0716-8640(13)70214-1.
- [62] “HeLa Cells: A New Chapter in An Enduring Story”, *NIH Director’s Blog*, ago. 07, 2013. <https://directorsblog.nih.gov/2013/08/07/hela-cells-a-new-chapter-in-an-enduring-story/> (consultado may 28, 2021).
- [63] R. M. & R. Philips, “» How big is a human cell?” <http://book.bionumbers.org/how-big-is-a-human-cell/> (consultado may 27, 2021).
- [64] “Defined Media and Supplements”, en *Culture of Animal Cells*, John Wiley & Sons, Ltd, 2010, pp. 99–114. doi: 10.1002/9780470649367.ch8.
- [65] A. Trebinska-Stryjewska, O. Swiech, L. J. Opuchlik, E. A. Grzybowska, y R. Bilewicz, “Impact of Medium pH on DOX Toxicity toward HeLa and A498 Cell Lines”, *ACS Omega*, vol. 5, núm. 14, pp. 7979–7986, abr. 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b04479.
- [66] A. Bettaieb y D. A. Averill-Bates, “Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells”, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, núm. 1, pp. 52–62, ene. 2015, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.09.016.
- [67] E. VanBavel, “Effects of shear stress on endothelial cells: Possible relevance for ultrasound applications”, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 93, núm. 1–3, pp. 374–383, ene. 2007, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.017.
- [68] J. Das, S. Maji, T. Agarwal, S. Chakraborty, y T. K. Maiti, “Hemodynamic shear stress induces protective autophagy in HeLa cells through lipid raft-mediated mechanotransduction”, *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 35, núm. 3, pp. 135–148, mar. 2018, doi: 10.1007/s10585-018-9887-9.
- [69] B. A. Wagner, S. Venkataraman, y G. R. Buettner, “The rate of oxygen utilization by cells”, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, núm. 3, pp. 700–712, ago. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.024.
- [70] Y. L. Huang, Y. Ma, C. Wu, C. Shiau, J. E. Segall, y M. Wu, “Tumor spheroids under perfusion within a 3D microfluidic platform reveal critical roles of cell-cell adhesion in tumor invasion”, *Sci. Rep.*, vol. 10, núm. 1, Art. núm. 1, jun. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-66528-2.

- [71] “DMEM, high glucose, pyruvate”. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11995040> (consultado may 15, 2021).
- [72] “Fetal Bovine Serum USA origin, suitable for cell culture | Sigma-Aldrich”. <http://www.sigmaaldrich.com/> (consultado ago. 13, 2021).
- [73] C. Poon, “Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of *in vitro* devices”, *Bioengineering*, preprint, ago. 2020. doi: 10.1101/2020.08.25.266221.
- [74] C. Sandoval, J. Caramy, y J. Salinas, “La engañosa simplicidad del ‘método de Stokes’ para medir viscosidades”, *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 31, núm. 4, pp. 4310–4322, dic. 2009, doi: 10.1590/S1806-11172009000400012.
- [75] M. Imai, K. Furusawa, T. Mizutani, K. Kawabata, y H. Haga, “Three-dimensional morphogenesis of MDCK cells induced by cellular contractile forces on a viscous substrate”, *Sci. Rep.*, vol. 5, núm. 1, p. 14208, nov. 2015, doi: 10.1038/srep14208.
- [76] Y. Li, C. Qiao, L. Shi, Q. Jiang, y T. Li, “Viscosity of Collagen Solutions: Influence of Concentration, Temperature, Adsorption, and Role of Intermolecular Interactions”, *J. Macromol. Sci. Part B*, vol. 53, núm. 5, pp. 893–901, may 2014, doi: 10.1080/00222348.2013.852059.
- [77] “VISCOBALL”, *FungiLab* –. <https://fungilab.com/product/kinematic-viscometers/viscoball/viscoball/> (consultado nov. 07, 2021).
- [78] “Advanced BioMatrix - Collagen Viscosity”. <https://advancedbiomatrix.com/collagen-viscosity.html> (consultado jun. 01, 2021).
- [79] M. E. Dolega, F. Abeille, N. Picollet-D’ahan, y X. Gidrol, “Controlled 3D culture in Matrigel microbeads to analyze clonal acinar development”, *Biomaterials*, vol. 52, pp. 347–357, jun. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.042.
- [80] “p-cap kit for microfluidic applications”, *Fluigent*. <https://www.fluigent.com/product/microfluidic-components-3/p-cap-kit/> (consultado ago. 12, 2021).
- [81] “New Pressure Controller | LineUP Series | Fluigent”. <https://www.fluigent.com/product/microfluidic-components-3/lineup-series-push-pull/> (consultado oct. 26, 2021).
- [82] “Physics-Controlled Meshing”. https://doc.comsol.com/5.5/doc/com.comsol.help.comsol/comsol_api_mesh.40.19.html (consultado oct. 13, 2021).
- [83] S. Lopa *et al.*, “Microfluidic Biofabrication of 3D Multicellular Spheroids by Modulation of Non-geometrical Parameters”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 366, may 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00366.
- [84] P. Charles *et al.*, “A High Aspect Ratio Bifurcated 128-Microchannel Microfluidic Device for Environmental Monitoring of Explosives”, *Sensors*, vol. 18, núm. 5, p. 1568, may 2018, doi: 10.3390/s18051568.
- [85] S. Tada, Y. Omi, M. Eguchi, N. Nakai, y A. Tsukamoto, “Analysis of Dielectrophoretic Properties of Cells by the use of the Uniform Field Gradient”, en *2018 World Automation Congress (WAC)*, jun. 2018, pp. 1–5. doi: 10.23919/WAC.2018.8430427.
- [86] C. Ma, C. Tian, L. Zhao, y J. Wang, “Pneumatic-aided micro-molding for flexible fabrication of homogeneous and heterogeneous cell-laden microgels”, *Lab. Chip*, vol. 16, núm. 14, pp. 2609–2617, jul. 2016, doi: 10.1039/C6LC00540C.
- [87] K. P. Valente, S. S. Thind, M. Akbari, A. Suleman, y A. G. Brolo, “Collagen Type I–Gelatin Methacryloyl Composites: Mimicking the Tumor Microenvironment”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, núm. 6, pp. 2887–2898, jun. 2019, doi: 10.1021/acsbomaterials.9b00264.
- [88] C.-T. Kuo, J.-Y. Wang, Y.-F. Lin, A. M. Wo, B. P. C. Chen, y H. Lee, “Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array”, *Sci. Rep.*, vol. 7, núm. 1, Art. núm. 1, jun. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-04718-1.

- [89] M. Lamba, N. Mittal, K. Singh, y H. Chaudhary, “Design analysis of polysilicon piezoresistors PDMS (Polydimethylsiloxane) microcantilever based MEMS Force sensor”, *Int. J. Mod. Phys. B*, vol. 34, núm. 09, p. 2050072, abr. 2020, doi: 10.1142/S0217979220500721.
- [90] J. Zilberman-Rudenko, J. L. Sylman, H. H. S. Lakshmanan, O. J. T. McCarty, y J. Maddala, “Dynamics of Blood Flow and Thrombus Formation in a Multi-Bypass Microfluidic Ladder Network”, *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 10, núm. 1, pp. 16–29, feb. 2017, doi: 10.1007/s12195-016-0470-7.
- [91] G. Lee *et al.*, “Generation of uniform liver spheroids from human pluripotent stem cells for imaging-based drug toxicity analysis”, *Biomaterials*, vol. 269, p. 120529, feb. 2021, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120529.

Anexos

Anexo I

Tabla 13. Formulaciones de matrices extracelulares basadas en biopolímeros

Línea celular	Biopolímeros y concentraciones	Metodología	Ref.
HeLa	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno tipo I 9 mg/mL • buffer HEPES 150mM 	Las células HeLa se mezclaron con la pre-solución de gel de colágeno, que es una mezcla de colágeno tipo I de cola se rata (Corning, 354249) con una concentración de 9 mg/mL y buffer HEPES 150mM en proporción 2:1 (v/v).	[17]
HeLa	<ul style="list-style-type: none"> • Matrigel 5 mg/mL • Alginato 2mg/mL en DMEM 	Las células se cultivaron con DMEM suplementado con 10% de FBS, 100µg/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina en una atmósfera húmeda de 5% de CO ₂ a 37 °C La suspensión de células se preparó con una concentración de 1x10 ⁷ células por mL usando DMEM mezclado con 50% (v/v) matrigel a 4 °C. El alginato (2 p%) en DMEM fue filtrado con un 0.22 µm jeringa	[24]
HeLa	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatina 20 mg x100 mL • NaCl 9 mg/mL • Alginato 4 mg x 100 mL 	La gelatina en polvo (Sigma; G1890) se disolvió en una solución de NaCl al 0.9% (p/v) al 20% (p/v). El polvo de alginato de sodio (Sigma; A0682) se disolvió en una solución de NaCl al 0.9% (p/v) al 4% (p/v). Ambas soluciones se esterilizaron calentándolas tres veces en una estufa (70 °C) durante 30 min. El fibrinógeno (Sigma; F8630) se disolvió en H-DMEM al 8% (p/v).	[10]
MDA-MB-231	<ul style="list-style-type: none"> • Alginato 2mg x 100mL • Solución de calcio-EDTA (100 mM) • Colágeno tipo I 2 mg/mL • 3.5mg/mL Matrigel. 	La línea celular se cultivó en DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal (Corning) y un 1% de penicilina/estreptomina (Corning). La solución de las células se preparó con una concentración de 1x10 ⁷ células/mL usando el medio de cultivo mezclando con el Matrigel y colágeno en hielo.	[32]
HUVEC-C HepG2 A549 NIH 313	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno 8mg/mL • NaOH 1.0 M • Solución salina tamponada con fosfato (PBS, 0.01 M, pH 7.4) • Transglutaminasa al 2% p/v 	La solución de colágeno se preparó neutralizando el colágeno con NaOH (1.0M) La solución de gelatina se preparó disolviendo el polvo de gelatina en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 0.01 M, pH 7.4) calentada y se mezcló con transglutaminasa para producir gelatina al 10% p/v con transglutaminasa al 2% p/v. La solución de agarosa (2% p/v) se preparó calentando agarosa de baja temperatura de gelificación para disolverla en PBS.	[86]

MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> • Agarosa 2 mg x 100mL en PBS • Metacrilato de gelatina 15 mg x 100 mL • Irgacure 2959 1 mg x 100mL • Colágeno tipo I 4mg/mL • NaOH 1M 	<p>Se preparó una solución que contenía 15% (p/v) de GelMA en 1% (p/v) de Irgacure 2959 en 1× PBS. Además, se preparó una solución de 4.0 mg/mL de Colágeno Tipo I CULTREX utilizando las cantidades necesarias de NaOH 1 M, PBS 10x y agua desionizada. Se mezcló el 25% (v/v) de solución de GelMA se mezcló con 75% (v/v) de Colágeno I hasta una concentración final de 3.0 mg/mL de colágeno I y 3.75% de GelMA (3 Coll I- 3,75 GelMA) para la ECM blanda. En el último hidrogel se usó el 75% (v/v) de la solución de GelMA se mezcló con el 25% (v/v) muestra de colágeno I hasta una concentración final de 1.0 mg/mL de colágeno I y 11.25% de GelMA (1 Coll I-11,25 GelMA). Los volúmenes de cada componente respectivo se mezclaron para formar una mezcla homogénea de hidrogel homogénea y el pH final se ajustó a 7 añadiendo la cantidad cantidades necesarias de NaOH 1 M.</p>	[87]
MDA-MB-231	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno de tipo I 5.0 mg/mL • NaOH 1 M • M199 10X 20 µL 	<p>Se utilizaron 60 µL de colágeno de tipo I con una concentración de 5.0 mg/mL (Cat. 354249, Corning, Discovery Labware Inc., Bedford, MA) se tituló primero con 1.32 µL de NaOH 1 M y 20 µL de M199 10X (Cat. M0650-100ML, Sigma-Aldrich) para obtener un pH final de aproximadamente 7.449. A continuación, el colágeno se mezcló con los esferoides de co-cultivo recogidos en un medio de proporción 1:1 (DMEM: medio de crecimiento DMEM/F12) hasta un volumen final de 200 µL. La concentración media final de esferoides fue de aproximadamente 33 esferoides por dispositivo (aproximadamente 1 esferoide por mm² bajo la vista superior) y la concentración final de colágeno fue de 1.5 mg/mL.</p>	[70]
HO-8910PM	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno tipo I 1.5mg/mL • Matrigel 1.25mg/mL • RADA16-I 	<p>Las células HO-8910PM se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina a temperatura constante de 37 °C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad. Las células HO-8910PM obtenidas se centrifugaron y se re suspendieron con sacarosa al 10%. La solución de péptidos se mezcló a fondo con la suspensión celular en una proporción de 1:9 (RADA16-I: suspensión celular, v/v), lo que equilibró las concentraciones finales de las células RADA16-I y HO-8910PM en 1.0 mg/mL y 1 × 10⁶/mL, respectivamente, además de mantener el valor de pH adecuado y la presión osmótica celular normal.</p>	[4]
MCF7	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno tipo I 1mg/mL • NaOH 1N 	<p>Las células MCF7 y MDA-MB-231 fueron mantenidas en α-minimum essential, complementado con 10% de suero fetal bovino y 1% penicilina/ estreptomicina. Un 1 ml de colágeno tipo I fue preparada añadiendo el cultivo celular u ajustando el pH con 1 N NaOH.</p>	[88]

Nota: Formulaciones de 100 mL.

Anexo 2

Tabla 14. Propiedades del PDMS.

Propiedad	Valor	Ref.
Densidad (ρ)	0.970 g/cm ³	[57]
Densidad Vs. Temperatura (ρ Vs. T°)	$\rho=0.9919-(8.925 \times 10^{-4}) t+(2.65 \times 10^{-2}) t^2-(3.0 \times 10^{-11}) t^3$	
Volumen Específico (v_{sp})	$v_{sp}= 1.0265+(9.7 \times 10^{-4}) (t-20) \text{ cm}^3/\text{g}$	
Calor específico (C_p)	1.35–1.51 kJ/k K	
Índice de Refracción	1.375–1.399	
Viscosidad	100 Pa s	
Temperatura de transición vítrea	-123.15°C	
Módulo de Young	750kPa	[89]
Radio de Poisson	0.49	[89]

Anexo 3

Tabla 15. Simulaciones realizadas en plataformas microfluidicas.

Software	Tipo de plataforma	Objetivo de la simulación	Ref.
COMSOL Multiphysics	Micropozos	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de la velocidad y distribución de las células. • El efecto de la viscosidad del medio en la velocidad del fluido y distribución de las células. • El efecto de la tensión de corte en los esferoides de los diámetros propuestos. • Efecto de la densidad de células por mililitro en la deposición de los micropozos. • Optimización de la geometría de la plataforma de debido a la tensión de corte que presentan los esferoides tumorales. 	[7]
COMSOL Multiphysics	Micropozos	<ul style="list-style-type: none"> • La velocidad del medio para la deposición de las células en los micropozos. • Evaluación de diferentes velocidades del medio para el intercambio de nutrientes. • Evaluación de las velocidades necesarias para la liberación de esferoides tumorales de los micropozos. 	[22]
COMSOL Multiphysics	Micropozos	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución del flujo de medio por la plataforma. • Análisis del flujo de un micropozo a diferentes profundidades y velocidades del flujo. 	[47]
COMSOL Multiphysics	Micropozos	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis de la velocidad del flujo en la plataforma. • Análisis de la velocidad el micropozo. • Análisis de la concentración de oxígeno en la superficie del esferoide tumoral en el micropozo. 	[58]
COMSOL Multiphysics	Micropozos	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis del consumo de glucosa. • Análisis del consumo de oxígeno. • La tensión de corte que provocada por el flujo. 	[55]
COMSOL Multiphysics	Por emulsión	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis de velocidad para la formación de esferoides. • Análisis de diferentes velocidades de flujo para la formación de esferoides. 	[32]
COMSOL Multiphysics	Plataforma en forma de escalera	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis de la velocidad del flujo en la plataforma. • Análisis de la tensión de corte en la plataforma por la velocidad del fluido. • Evaluación de la distribución de células para localizar el lugar más probable a desarrollar un trombo debido a la geometría de la plataforma. 	[90]

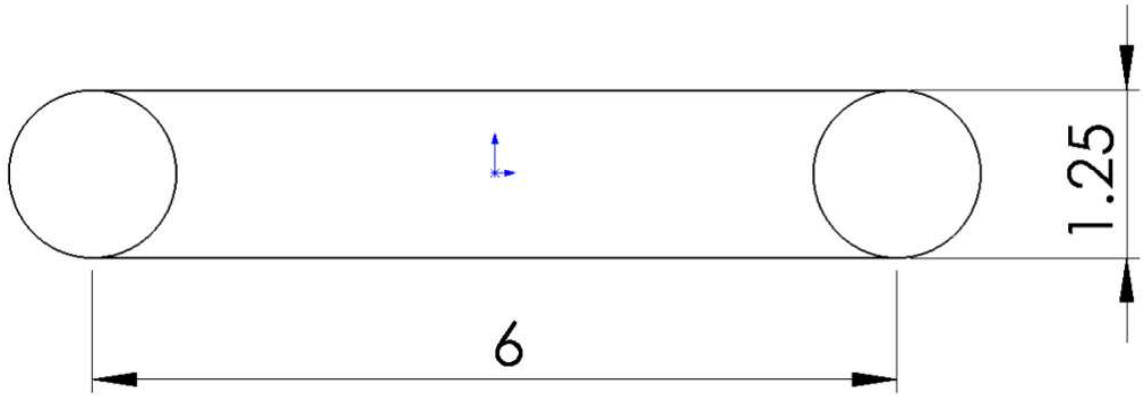
Anexo 4

Tabla 16. Características geométricas de plataformas microfluidicas basadas en micropozos.

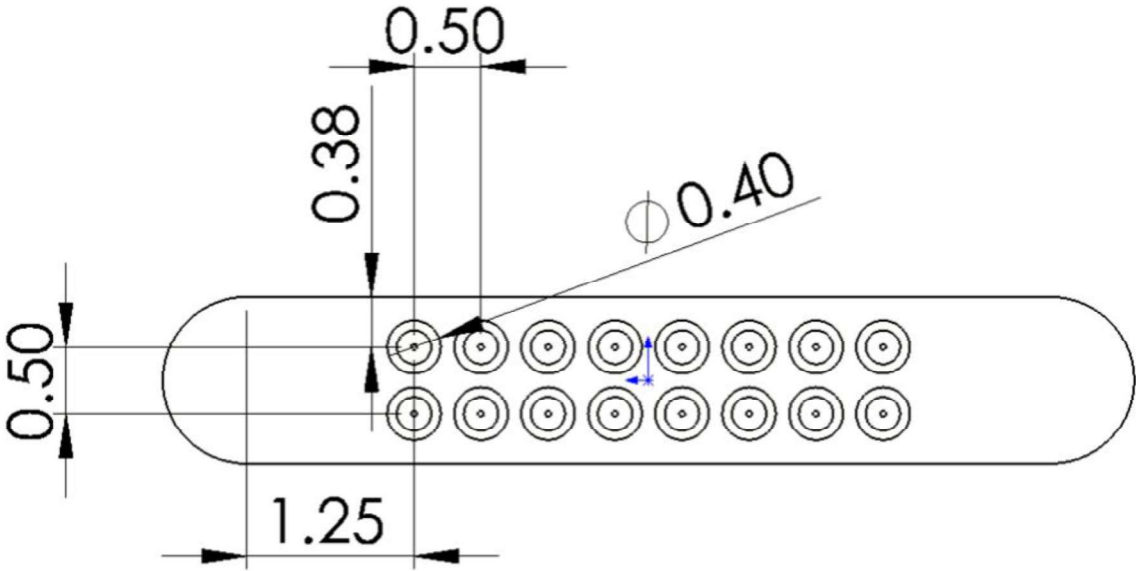
Material	Número de capas	Número de entradas y salidas	Dimensiones de Micro canales	GGC	Numero de micropozos	Dimensiones	Distancia entre micropozos	Forma	Ref.
PDMS (Sylgard 184; Dow Corning)	2	Una entrada, un agujero de ventilación y 3 salidas	100 μm de ancho y 100 μm de profundidad	No	12 cámaras	Diámetro de 2700 μm y profundidad de 100 μm	No especificada	Forma de U	[53]
					84	Diámetro 500 μm y profundidad (350 μm y 500 μm)			
PDMS (Sylgard 184; Dow Corning)	2	Dos entradas y una salida	No especificada	Si (Dimensiones no especificadas)	12 cámaras	Diámetro de 2.67 mm y 50 μm y profundidad	Distancia entre cámaras de 4.4mm	Forma de U	[54]
					216	Diámetro de 200 μm y profundidad de 150 μm			
PDMS (Sylgard 184, Dow Corning Co., Midland, MI)	2	Dos entradas y una salida	25 mm de largo, 1.2 mm de ancho y 0.15 mm de profundidad	No	90	200 μm x 200 μm y profundidad de 250 μm	90 μm entre ellas	Rectangular	[22]
PDMS (Sylgard 184)	4	Una entrada y una salida	En forma de serpentina 2000 μm de ancho y 200 μm de alto <i>Microcanal 1</i> (Profundidad 200 μm y ancho 1200 μm) <i>Microcanal 2</i> (Profundidad 200 μm y ancho 700 μm) <i>Microcanal 3</i> (Profundidad 200 μm y ancho 300 μm) <i>Microcanal 4</i> (Profundidad 200 μm y ancho 200 μm) <i>Microcanal 5</i>	No	1080	Diámetro de 400 μm y profundidad de 300 μm	Distribuidas en forma de panel	Forma de V	[58]
(PDMS, Dow Corning)	2	Una entrada y una salida		No	8	Diámetro de 500 μm y profundidad de 600 μm	No especificada	Forma de U	[59]

						(Profundidad 50 μm y ancho 100 μm) <i>Microcanal 6</i> (Profundidad 100 μm y ancho 200 μm) <i>Microcanal 7</i> (Profundidad 100 μm y ancho 300 μm) <i>Microcanal 8</i> (Profundidad 100 μm y ancho 400 μm)	No	No	361	Diámetro 400 μm a 600 μm y profundidad de 500 μm	1 mm	Pirámide invertida con fondo en forma de U	[91]
Silicona líquida (LSR 7080, Momentive Performance Materials, NY, EE. UU) PDMS (Sylgard 184 Elastomer Kit, Dow Corning, Midland, MI, USA)	1		Una entrada y una salida	800 μm de ancho y 200 μm de profundidad	No		No	35 (divididos en grupos de 7)	300 μm lado Hexagonal	No especificada	Forma hexagonal y proyección cónica de 25°	[47]	

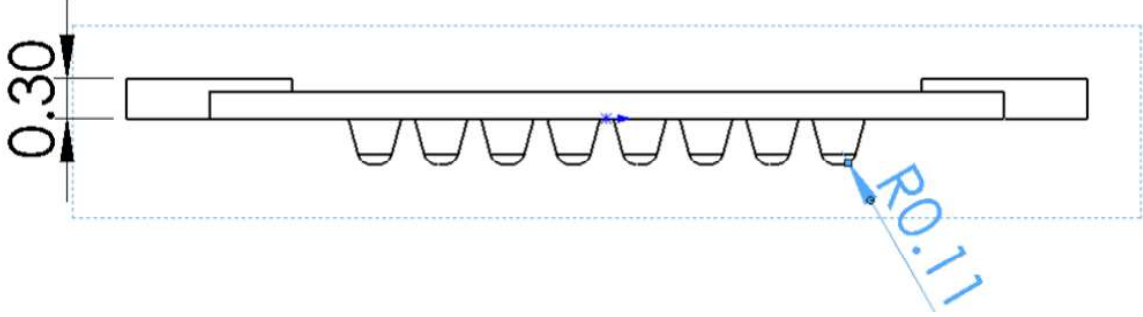
Anexo 5



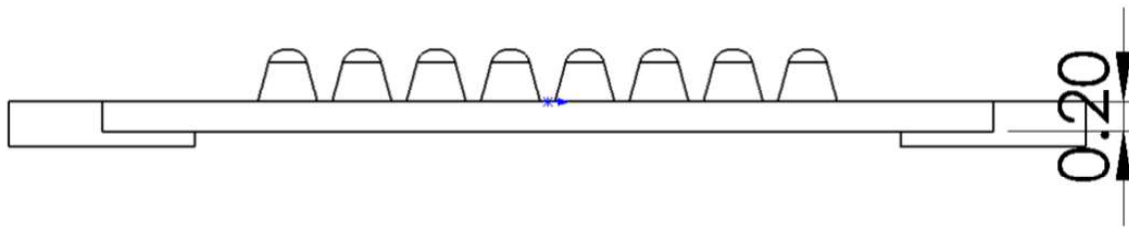
a)



b)



c)



d)

Figura 54. Vistas de la plataforma acotado en milímetros a) Vista superior b) Vista posterior de la plataforma c) Vista lateral superior d) Vista lateral inferior