

Integración de microestructuras en dispositivos microfluídicos para la optimización de la interacción tratamientos-monocapa celular en estudios citotóxicos

J. Zabalo Carrere¹, O. Mitxelena Iribarren²

¹ Tecnun, Universidad de Navarra (UNAV), Donostia, a904048@alumni.tecnun.es

² CEIT y Tecnun, Universidad de Navarra, Donostia, omitxelena@ceit.es

Resumen

Las nanopartículas lipídicas cargadas con medicamento son una alternativa selectiva y eficaz a la quimioterapia. Las técnicas de testeo in vitro actuales para su validación son de carácter estático, por lo que es difícil demostrar si las células cultivadas se ven afectadas por el medicamento o mueren por asfixia. Una solución a este problema es el uso de dispositivos microfluídicos. Sin embargo, dado el carácter laminar que adquiere el flujo en dichos dispositivos, solo un número reducido de nanopartículas contacta con las células cultivadas en ellos. Por eso, es necesario alterar este comportamiento y generar un mezclado. Este trabajo analiza el efecto de diversas microestructuras embebidas en el flujo laminar del dispositivo mediante tres experimentos. Los resultados de este estudio demuestran que las microestructuras más estrechas de entre las diseñadas aumentan el mezclado del flujo.

1. Introducción

La quimioterapia afecta a las células del organismo en fase de crecimiento. Por tanto, en el caso de los niños, además de afectar a las células cancerígenas, también puede afectar a otras células sanas en fase de crecimiento. Por eso, los niños son un sector vulnerable a este tratamiento [1].

Una posible alternativa a este problema son las nanopartículas lipídicas con medicamento, las cuales se unen solamente a las células cancerígenas para después insertar el medicamento dentro de ellas. Uno de los pasos para la validación de estos medicamentos es el testeo *in vitro*. Las técnicas *in vitro* son, en general, de carácter estático. Las células de osteosarcoma se cultivan en un Petri, para después insertar en él las nanopartículas con medicamento. Al paso de unos días, es difícil saber si las células mueren a causa del efecto del medicamento o debido al ahogamiento [2], [3]. Una alternativa dinámica son los dispositivos microfluídicos [4]. El problema de estos dispositivos es que el flujo que pasa a través de ellos es de carácter laminar, por lo que muchas de las nanopartículas insertadas en el dispositivo no contactan con las células pegadas en la superficie inferior de los canales [5].

Para hacer frente a esto, y basándose en trabajos anteriores [6], se han diseñado 6 tipos de microestructuras embebidas en la superficie superior del dispositivo microfluídico utilizado para este test.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es, una vez diseñadas diferentes microestructuras, fabricar los dispositivos con

estas microestructuras embebidas y comprobar si se rompe el carácter laminar del flujo en la cámara del dispositivo microfluídico. Para ello, se han hecho tanto simulaciones como ensayos experimentales.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño de los nuevos dispositivos con microestructuras

Se han hecho un total de 6 diseños de microestructuras diferentes. Estos diseños se dividen en dos bloques: “Microestructuras con forma de X”, del cual se han creado 2 diseños y “Microestructuras lineales”, del cual se han hecho 4 diseños. Los diseños de cada bloque se diferencian entre ellas en el grosor de las microestructuras (25/50 μm) y la separación entre ellas (25/50 μm , solamente en las microestructuras lineales).

También se han diseñado dispositivos con 3 y 5 entradas para poder insertar distintos colores por cada entrada y observar si se produce un mezclado de los distintos colores.

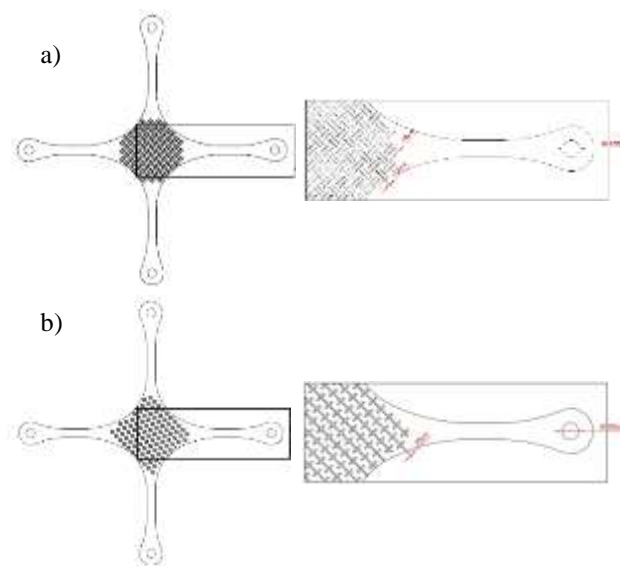


Figura 1. a) Diseño del dispositivo con microestructuras con forma lineal de un grosor de 25 μm y una separación de 50 μm . b) Diseño del dispositivo con microestructuras con forma de “X” de un grosor de 25 μm

Los dispositivos con múltiples entradas son análogos a la Figura 1 pero con 3 ó 5 entradas en uno de los lados.

2.2. Fabricación de los nuevos dispositivos con microestructuras

Los dispositivos han sido fabricados en PDMS. Primero, se han fabricado los moldes mediante fotolitografía de doble capa, siendo la primera la que servirá para replicar los canales microfluídicos y la segunda la que creará las microestructuras embebidas. Después, se ha procedido a replicar los moldes mediante el método de *casting*. Finalmente, se han pegado con plasma de oxígeno los dispositivos en PDMS tanto en vidrio (portaobjetos) como en silicio, dependiendo el experimento para el que van a ser útiles. Tanto los moldes como el PDMS replicado han sido caracterizados mediante el perfilómetro KLA-Tencor.

2.3. Simulación de los dispositivos microfluídicos

Las simulaciones se han llevado a cabo con el software COMSOL Multiphysics. Los parámetros simulados han sido las líneas de flujo dentro de los dispositivos y las velocidades de las células y nanopartículas dentro de la cámara. Con los resultados obtenidos, se ha calculado el factor de reducción de velocidad (diferencia entre las medias de velocidad máxima y mínima de las células dentro de la cámara) para la simulación de cada diseño.

2.4. Ensayos experimentales

Se han realizado 3 ensayos experimentales para obtener información acerca del efecto que crean las diferentes microestructuras en el comportamiento del flujo dentro de la cámara microfluídica. Para todos los ensayos se ha utilizado una bomba peristáltica.

El primero de ellos es la medición de la velocidad de las células que se insertan a través de los canales. Este experimento se ha realizado en el microscopio óptico Nikon Eclipse TS100 y con la ayuda de una cámara fotográfica Nikon D90 se han grabado los vídeos necesarios para cada tipo de dispositivo. El post-procesado de los vídeos se ha podido realizar gracias al software de Matlab “Cell Tracker” [7]. Este software identifica cada célula que pasa por la cámara microfluídica, y hace un seguimiento de cada una para después obtener información como el factor de reducción de velocidad.

El segundo experimento realizado es el de la medición del mezclado de colores. En este experimento, se han utilizado los dispositivos con múltiples entradas (3 ó 5) y por cada una de ellas se ha insertado un color. Después, se ha medido el grosor de la interfase. Este experimento también se ha realizado en el microscopio óptico, mediante la grabación de vídeos. La medición del grosor de la interfase se ha hecho mediante la creación de un código en Matlab.

El tercer y último experimento realizado es el de nanopartículas fluorescentes. El objetivo de este ensayo es medir el mezclado tridimensional del flujo. Este experimento es el único donde el PDMS se ha pegado en silicio en vez de en vidrio. Esto se debe a que es necesario biofuncionalizar (creación de una “Self Assembled Monolayer” sobre un depósito de oro) la superficie inferior de los canales. Tras la creación de la SAM, se han recirculado nanopartículas fluorescentes afines a la superficie funcionalizada. Después, mediante el

microscopio de fluorescencia Planar Eclipse Ti de Nikon, se ha podido calcular el porcentaje de ocupación de nanopartículas fluorescentes pegadas a la SAM para cada tipo de dispositivo.



Figura 2. Pruebas iniciales del experimento de 5 colores



Figura 3. Setup del experimento de nanopartículas fluorescentes

En todos los ensayos se han comparado los resultados obtenidos en los dispositivos con microestructuras con los resultados obtenidos en los dispositivos lisos.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de los moldes y el PDMS

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización tanto de los moldes como del PDMS replicado. En él se puede ver la altura de los canales y las microestructuras embebidas. Estos resultados confirman que la réplica se ha hecho de manera óptima, y que las alturas obtenidas concuerdan con las que habían sido previstas (110 μm para los canales y 30 μm para las microestructuras).

Altura (μm)	Molde	PDMS
Canales	109.47 ± 1.50	107.22 ± 5.00
Microestructuras	28.41 ± 4.93	30.92 ± 2.95

Tabla 1. Caracterización de moldes y PDMS

3.2. Simulaciones

En cuanto a las simulaciones en COMSOL, en la Figura 4 se pueden observar las líneas de flujo simuladas para el dispositivo con microestructuras en forma de “X” y un grosor de 25 μm , y el dispositivo con microestructuras lineales de un grosor y separación de 25 μm . Se puede ver que las líneas de flujo no son lineales, a diferencia del dispositivo liso, donde las líneas de flujo sí son lineales.

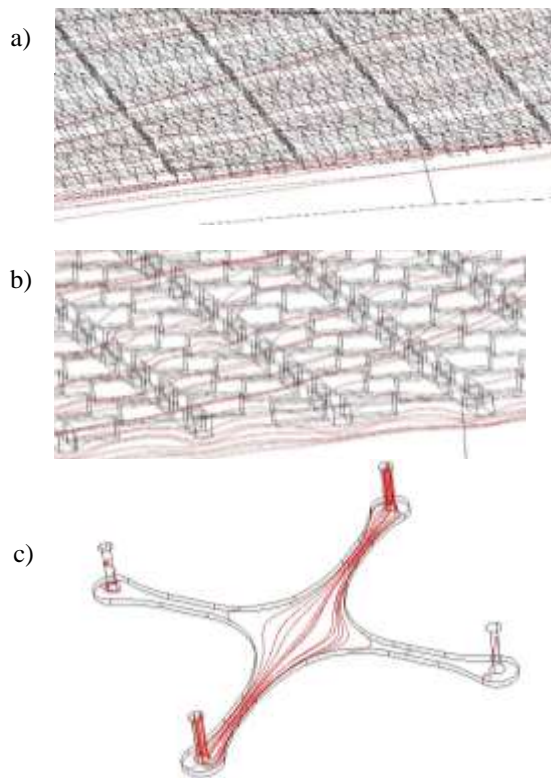


Figura 4. Líneas de flujo del dispositivo con microestructuras
a) Lineales de grosor y separación de 25 μm . b) Con forma de X de grosor de 25 μm . c) Sin microestructuras

El resultado de la simulación del factor de reducción de velocidad de las células muestra que no hay diferencia significativa entre el dispositivo liso y los dispositivos con microestructuras embebidas (Figura 6).

3.3. Ensayos experimentales

En primer lugar, se muestran los resultados obtenidos del ensayo de velocidad celular. En la Figura 5 se puede observar un ejemplo del resultado visual obtenido gracias al software *Cell Tracker*, en el que se puede apreciar con diferentes colores el recorrido que hace cada célula dentro de la cámara microfluídica.

Con los datos obtenidos con este software, podemos calcular el factor de reducción de velocidad de las células para cada tipo de dispositivo. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos, tanto en las simulaciones previamente mencionadas como en este ensayo.

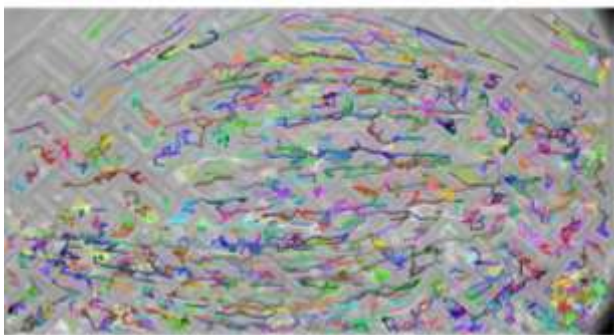


Figura 5. Recorrido de las células en la cámara microfluídica del dispositivo con microestructuras lisas con un grosor de 50 μm y separación de 25 μm

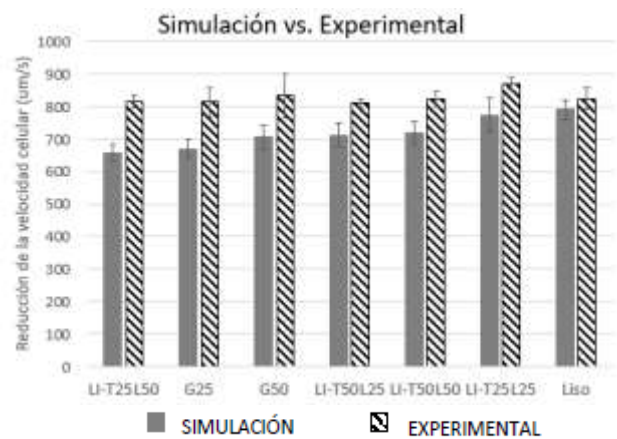


Figura 6. Factor de reducción de velocidad de las células en la simulación y en el ensayo experimental

De la Figura 6 se puede concluir que los valores obtenidos para cada tipo de dispositivo tanto en las simulaciones como en los ensayos reales son muy parecidos, y que no hay diferencias significativas entre el dispositivo liso y los demás dispositivos con microestructuras. En segundo lugar, se muestran los resultados obtenidos de los experimentos de colores. Nótese que se han tenido en cuenta solamente los resultados obtenidos de los experimentos de 3 colores, dado que los resultados de los ensayos de 5 colores presentaban una variabilidad muy alta, probablemente debido a la dificultad de diferenciar los valores RGB de cada color puro de los valores RGB de las interfaces entre los colores. En la Figura 7 se muestra esquemáticamente el post-procesado de las imágenes obtenidas.

Después del post-procesado, se obtiene el factor de agitación (porcentaje de incremento de la interfase entre dos colores en un dispositivo con microestructuras respecto al dispositivo liso o sin microestructuras) para cada tipo de dispositivo. El resultado del ensayo de 3 colores se muestra en la Figura 8.

En la Figura 8 se puede observar que todos los dispositivos con microestructuras tienen un factor de agitación positivo. Aun y todo, los dispositivos con microestructuras lineales de un grosor y separación entre ellas de 25 μm y los dispositivos con microestructuras lineales de un grosor y separación entre ellas de 50 μm son los que mayor factor tienen. Entre estos dos dispositivos, el primero es el más eficaz debido a su baja variabilidad.

Por último, se muestran los resultados del experimento de nanopartículas fluorescentes. Observando la Figura 9, se puede ver que los resultados obtenidos son muy diversos. Hay que destacar que el porcentaje de ocupación fluorescente para el dispositivo liso es muy bajo, el cual es un buen resultado.

En cuanto a los dispositivos con microestructuras, los únicos que han mostrado un resultado significativo han sido los dos dispositivos con microestructuras con forma de "X". Los ensayos con estos dos tipos de dispositivos fueron los últimos en realizarse, es decir, cuando el método experimental ya había sido optimizado.

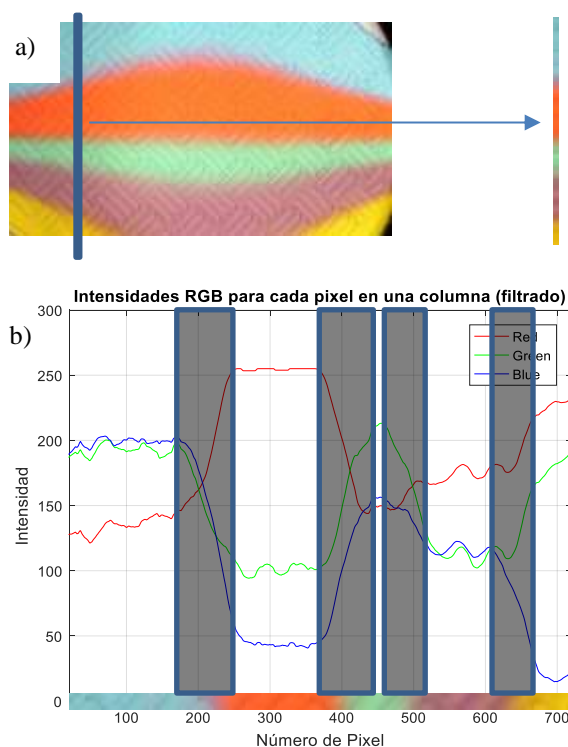


Figura 7. Esquema del post-procesado de las imágenes obtenidas en el experimento de 5 colores. a) Se obtiene una columna de píxeles de la imagen donde aparezcan los 5 colores insertados dentro de la cámara microfluídica. b) Se obtienen los valores RGB de cada uno de los píxeles obtenidos para diferenciar los valores de los colores puros de los valores de la interfase (en oscuro) entre dos colores.

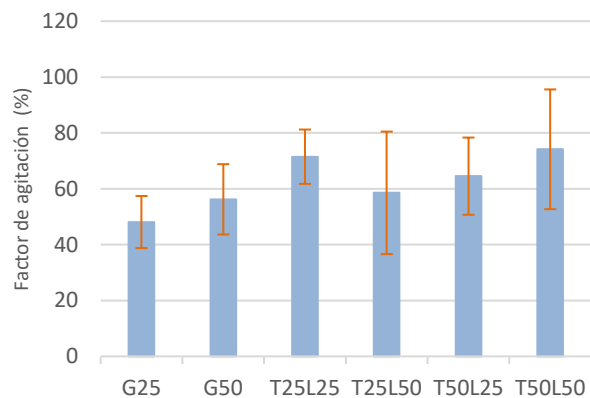


Figura 8. Factor de agitación en los ensayos de 3 colores

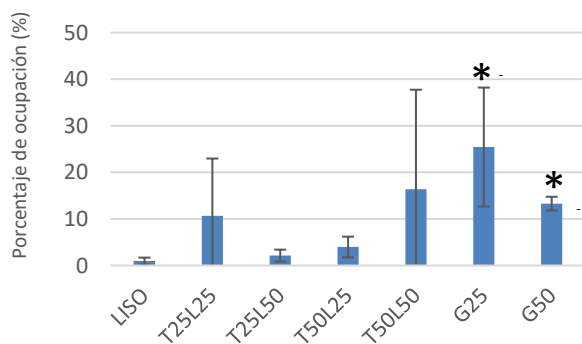


Figura 9. Porcentaje de ocupación de fluorescencia

Entre estos dos dispositivos, se puede observar que el que tiene un grosor de microestructuras de 25 μm (G25) tiene una mayor media, aunque tiene también mayor variabilidad. Aun y todo, G25 es el que mejores resultados ha dado ya que el valor más bajo que presenta es superior al valor medio del dispositivo con microestructuras de 50 μm (G50).

4. Conclusiones

Tras haber obtenido estos resultados, se pueden sacar varias conclusiones. En primer lugar, se han diseñado y fabricado satisfactoriamente los nuevos dispositivos con microestructuras embebidas. Además, se ha podido observar que el factor de reducción de velocidad de las células es similar para todos los dispositivos. Según las simulaciones de líneas de flujo, los dispositivos con microestructuras en forma de "X" de grosor de 25 μm (G25) y los dispositivos con microestructuras lineales con grosor y separación entre ellas de 25 μm (T25L25) han sido los que mejor rompen el carácter laminar del flujo. Del experimento de colores se ha observado que el dispositivo T25L25 es el que mayor factor de agitación tiene, y el dispositivo que mejor resultado ha dado en el experimento de ocupación de fluorescencia ha sido G25. Por tanto, se concluye que los dispositivos G25 y T25L25 son los que optimizan el mezclado del flujo laminar. El siguiente paso en esta línea de trabajo sería testear las nanopartículas con medicamento en estos dos dispositivos para comprobar si verdaderamente, las células de osteosarcoma cultivadas mueren a causa del medicamento.

Referencias

- [1] R. Peris Bonet et al., "Childhood cancer incidence and survival in Spain," Ann. Oncol, 2010.
- [2] M. Errázquin Irigoyen, "Estudio del comportamiento del flujo en dispositivos microfluídicos para análisis celulares," 2015.
- [3] O. Mitxelena Iribarren et al., "Effectiveness of nanoencapsulated methotrexate against osteosarcoma cells: in vitro cytotoxicity under dynamic conditions," Biomed. Microdevices, p. 1, 2017.
- [4] O. Mitxelena Iribarren, M. Mujika Garmendia, E. Pérez Lorenzo, M. J. Blanco Prieto, and S. Arana Alonso, "Simulación y desarrollo de una plataforma microfluídica para estudios celulares dinámicos in vitro," 2015.
- [5] A. Kamholz and P. Yager, "Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels," Biophys. J., 2001.
- [6] M. Gomez Aranzadi, "Diseño, fabricación y caracterización de microestructuras embebidas en sistemas microfluídicos para la mejora de la interacción superficie-análito en biosensores planares," 2013.
- [7] F. Piccinini, A. Kiss, and P. Horvath, "CellTracker (not only) for dummies," Bioinformatics, 2015.