

Review de diseño celular 3D de islotes pancreáticos: Lab-on-a-chip, *micropillar-based microfluidic system*

Valeria Adasme Brisso

I. INTRODUCCIÓN

Diabetes mellitus es definida por la OMS(2021) como: "una enfermedad crónica que se presenta cuando el páncreas no secreta suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce" [2]. Para el 2019 la diabetes afectaba al 9.5% de las personas en el mundo y para el 2045 se prevee que puede alcanzar a un total de 700 millones de diagnosticados [1]. La diabetes tipo 2 se presenta como "resistencia a la insulina", lo que significa que las células no responden normalmente a la insulina y se vuelven menos eficaces [3]. Más del 95% de las personas con diabetes presentan la de tipo 2, en gran medida originado por la falta de ejercicio y obesidad [2]. La diabetes aumenta dos a tres veces el riesgo de un infarto al miocardio o un accidente cerebrovascular, produce neuropatías que afectan el flujo sanguíneo y elevan la posibilidad de formar úlceras e infecciones que a veces llevan incluso a la amputación de los miembros infectados [2].

Los islotes de Langerhans, o islotes pancreáticos, son un agregado de células ubicado en el páncreas, órgano responsable de liberar hormonas como el glucagón e insulina [4]. Estas células son: células productoras de insulina o β , que representan 70%; células productoras de glucagón o α , que representan 20%; células productoras de somatostatina o δ , que representan entre 5 a 10%, y células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor de 2% [5]. Para el diseño de este prototipo se enfocó el diseño de los islotes con sus células α y β , que componen el 90% del islote.

La investigación para el tratamiento de la diabetes se enfoca en uso de ingeniería, biotecnología, trasplantes e incluso células madres para producir islotes Langerhans funcionales. Los métodos tradicionales para aislar islotes pancreáticos no suelen ser completamente funcionales debido a la masa o la viabilidad celular (células no sobreviven). Es clave imitar la arquitectura de los islotes y su ambiente in vivo. Existen diferencias significantes en la secreción de hormonas de modelos 2D con 3D, por lo que lo ideal sería mantener la arquitectura tridimensional original de los islotes. El uso de *microwells* es más popular para cultivos 3D, pero

presenta problemas de organización aleatoria y poco control sobre el tamaño. Esto puede resultar en un centro necrótico, baja viabilidad y menor grado de proliferación celular. En contraste, los cultivos de estructuras 3D de Lab-on-a-chip permiten mapeo de las condiciones in vivo, sin transferencias, con cultivos y análisis en el mismo lugar. Además, reducen el riesgo de daño y desorganización que se puede dar con otros métodos.

En línea con esto, Sokolowska, et al.(2021) propone un modelo celular 3D de islotes pancreáticos fabricado por medio de *micropillar-based microfluidic system*. Se utilizó este método para incubar células α y β y entregarles un espacio tridimensional guía a partir del cual comenzar a formar los pseudo-islotes. Posterior a eso, se decidió realizar una serie de testeos y toma de imágenes para comprobar la supervivencia de las células, su correcta nutrición y proliferación, además de su morfología y funcionamiento.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describe ampliamente cómo se fabricaron y testearon los islotes. Para más detalles sobre concentraciones y volúmenes, leer el texto de Sokolowska, et al.(2021), sección *Materials and Methods* [6].

A. Microfluidic system

Se diseñó con dos capas de PDMS unidas con *oxygen plasma treatment*: una capa con microestructuras llamada *bottom layer* y una *cover layer*. Para realizar microscopía de los islotes fabricados se reemplazó la *cover layer* por *borosilicate coverslips* de un grosor de $170\mu\text{m}$ para permitir el paso de luz. El *microfluidic system* de *bottom layer* consistía en dos microestructuras iguales, paralelas, con un canal de entrada y uno de salida. Estos canales se conectaban por una cámara elíptica que contenía 15 *microtraps*. Cada una de estas está conformada por 7 *micropillar* redondos que se ubican en círculo dejando una boca de abertura de $160\mu\text{m}$. La estructura final fue diseñada utilizando CAD (SolidWorks) y reproducida con *CNC micromilling machine*. Se puede apreciar el resultado final en la Figura 1.

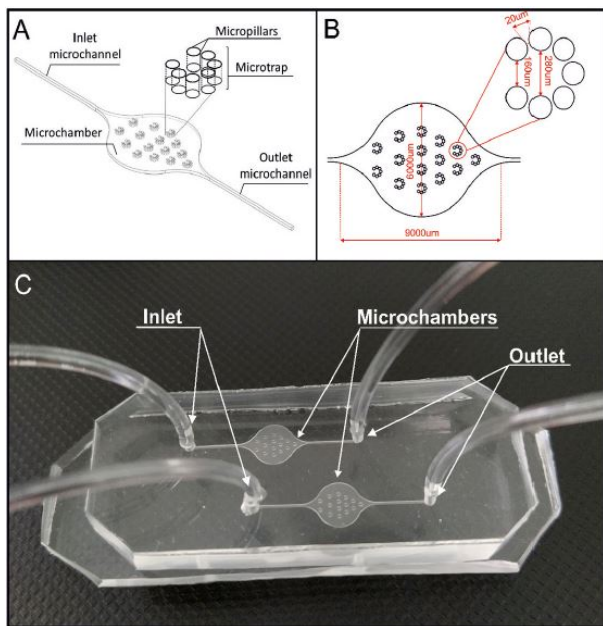


Fig. 1. Imagen tomada del paper de Sokolowska, et al.(2021) [6]. A) Geometría de la microestructura B) Medidas y detalle específico de la cámara elíptica, sus 15 *microtraps*, cada uno de ellos formado por 7 *micropillar* C) Apariencia final del *microfluidic system*

B. Three-dimensional cell culture in the microfluidic system

Para realizar el cultivo celular se utilizaron células α -TC1-6 de islotes pancreáticos de ratón y células β tipo INS-1E *insulinoma*, también de roedor. El *microfluidic system* fue esterilizado usando luz ultravioleta por 30 minutos y llenándolo de etanol 70%. Después de esto, se introdujo una mezcla de las células α y β en la razón 1:1 con un flujo de $10\mu\text{l}/\text{min}$ por 10 minutos. Posterior a una incubación de 2 horas. Luego se introdujo otro cultivo con una mezcla de ambas células, en razón 1:2 esta vez (α y β), con un flujo de $15\mu\text{l}/\text{min}$ por 1 minuto. Finalmente, para remover las células que no quedaron ubicadas en los *microtraps*, se vuelve a introducir la mezcla en razón 1:1, con el mismo flujo de $10\mu\text{l}/\text{min}$ por 5 minutos. Luego se mantuvo en una incubadora para que se formaran los pseudo-islotes, cambiando el medio del cultivo (DMEM) a las 24, 48 y 72 horas con un flujo de $10\mu\text{l}/\text{min}$. Para más detalles del medio y las concentraciones de las mezclas de células ver el Apéndice de Sokolowska, et al.(2021) [6].

C. Proliferación y viabilidad celular de los pseudo-islotes

Se realizaron medidas de proliferación en un *multiwell plate reader*, marca Tenca Infinite 200 Pro. Para esto se tomaron imágenes con medición de *fluorescence intensity* con una longitud de onda de excitación de 552nm y de emisión de 583nm. Además, para determinar la viabilidad celular se utilizaron dos colorantes: *propidium iodide* (PI) para señalar células muertas y *calcein-AM* (CAM) para señalar células vivas. Para esto se realizó una solución que incluyera ambos colorantes y células α y β , que luego se introdujo en el *microfluidic system*. Esto se incubó para ser observado con microscopía de fluorescencia,

utilizando 490nm y 515nm de longitud de onda de excitación y emisión (respectivamente) para CAM, mientras que para PI fue 535nm y 617nm respectivamente.

D. Immunofluorescencia

Para comprobar la participación de las células α de las β en el pseudo-islole y la morfología del mismo se utilizó el método de *immunofluorescence staining* con anticuerpos primarios y secundarios. Los anticuerpos primarios para la insulina y el glucagón formado por las células α y β se agregaron al *microfluidic system* y se dejó en el freezer a 4°C por 24 horas. Luego se lavó los pseudo-islotes con DPBS para retirar los restos del primer antibiótico y se agregó el segundo, *anti-mouse Alexa Fluor 594* y *anti-rabbit Alexa Fluor 488*. Se realizó un escáner 2D y 3D (escáner a lo largo del eje z, con diferentes capas) de los pseudo-islotes con un microscopio confocal *Fluoview FV10i*. El análisis se realizó con el programa asociado al microscopio: Olympus.

E. Cuantificación de insulina y glucagón secretados

Se estimuló con un agregado de glucosa el *microfluidic system* considerando dos niveles: bajo (2.75mM) y alto (16.5mM). Se introdujeron en dos cámaras diferentes a un flujo de $10\mu\text{l}/\text{min}$ por 3 minutos. Luego se lavó el *microfluidic system* y las muestras se colectaron en un tubo Eppendorf. Las muestras se almacenaron a -20°C y luego se les realizó el test de ELISA para reconocer la presencia de las hormonas. Específicamente se utilizó *Rat/Mouse Insulin ELISA Kit* y *Glucagon Chemiluminescent ELISA Kit*. Además se midió su absorbancia (450 y 590nm) y luminiscencia ($\sim 425\text{nm}$) en un *multiwell plate reader*.

III. RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los experimentos anteriores que buscan comprobar el buen funcionamiento del prototipo para la formación de los pseudo-islotes pancreáticos en 3D.

A. Microfluidic system

Se puede apreciar en la Figura 1C las cámaras obtenidas del diseño original. En los mamíferos el tamaño promedio de islotes pancreáticos va entre 100 y $200\mu\text{m}$ [7]. En el caso de las *microtraps* diseñadas, estas tienen un radio de $280 \times 280\mu\text{m}$, conformado por 7 *micropillar* de tamaño $145 \times 145\mu\text{m}$ (Figura 1B), por lo que en el paper se estima que con esa estructura se pueden obtener islotes de diámetro $\sim 185\text{nm}$. Utilizando el sistema CAD del diseño realizado, se realizó un test de estrés y distribución para diferentes flujos, para elegir aquel flujo suficientemente rápido para llevar todas las *microtraps* sin aplicar mucho estrés sobre las células, decidiéndose finalmente por el $15\mu\text{l}/\text{min}$ utilizado.

B. Three-dimensional cell culture in the microfluidic system

En la Figura 2 se puede observar la formación del islole de células después de 24 horas. Las células fuera de las *microtraps* fueron lavadas 'empujándolas' fuera del sistema al añadir un nuevo medio de cultivo. Diariamente se cambió el medio.

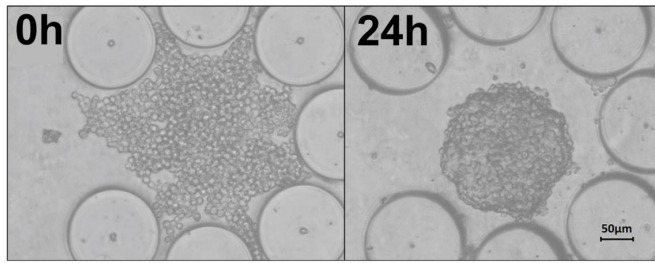


Fig. 2. Imagen tomada del paper de Sokolowska, et al.(2021) [6]. Se puede apreciar las células 0 y 24 horas después de haber sido introducidas al *microfluidic system*. El radio aproximado de los islotes a las 24 horas es de $\sim 175 \pm 10 \mu\text{m}$

C. Proliferación y viabilidad celular de los pseudo-islotes

Los resultados de los experimentos se pueden apreciar en la Figura 3. En el gráfico de la Figura 3B se ve que la viabilidad de las células disminuye a un 80% al tercer día, empezando a aumentar el conteo de células muertas. Sin embargo los autores mencionan que los islotes no presentan núcleos necróticos. En cuanto a la proliferación, como se puede ver en el gráfico de la Figura 3C, las células aumentan en un 20% para el tercer día. Los autores concluyen que el espacio entre *micropillar* permite correcta transferencia de nutrientes entre el medio y los islotes.

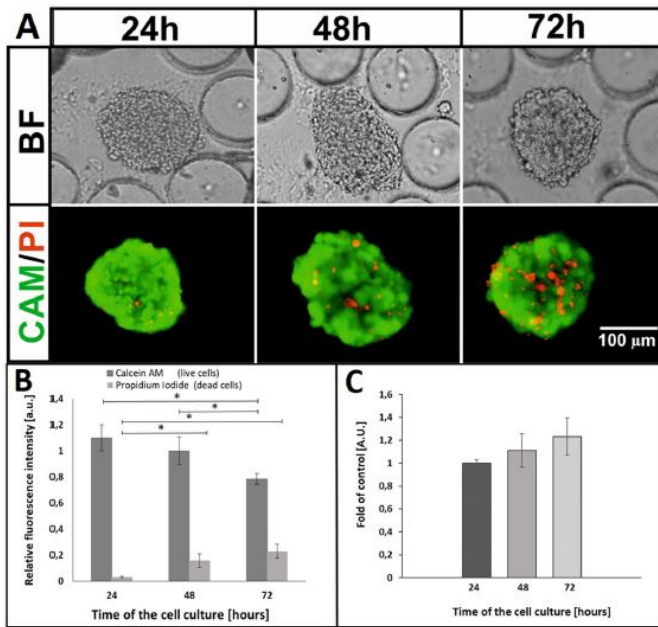


Fig. 3. Imagen tomada del paper de Sokolowska, et al.(2021) [6]. A) Imagen obtenida con microscopía de fluorescencia. Arriba muestra imágenes de *bright field*. Abajo muestra en verde las células vivas y en rojo las células muertas, marcadas con CAM y PI, respectivamente. B) Valores relativos de *fluorescence intensity* para diferentes días. C) Gráfico de proliferación de las células en diferentes días.

D. Inmunofluorescencia

En cuanto a la morfología original de los islotes pancreáticos, se esperaba una mayor concentración células α en

la periferia y células β en el centro del islote [6]. Además, estas células suelen tener una distribución del $\sim 25\%$ y $\sim 60\%$ del total de las células en el islote, respectivamente [7]. En la Figura 4 se puede apreciar la imagen tridimensional de uno de los pseudo-islotes obtenidos. En este se aprecia una clara permanencia de células α en la superficie (células rojas), mientras que al ver los planos de la Figura 4D se puede distinguir casi exclusivamente células β en el centro del islote (células verdes). Esto también se puede apreciar al ver los gráficos de *Fluorescence intensity* de la Figura 4C, donde el espectro de células rojas predomina en la periferia del plano evaluado mientras que las células verdes predominan en el centro.

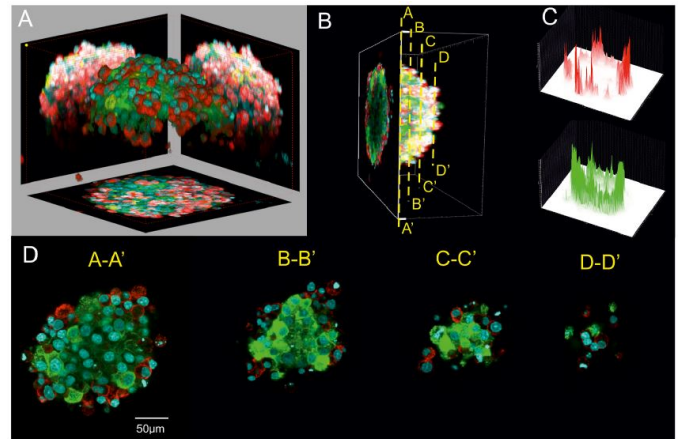


Fig. 4. Imagen tomada del paper de Sokolowska, et al.(2021) [6]. En rojo está marcado el glucagón (liberado por células α) y en verde la insulina (liberada por células β) A) Imagen tridimensional del islote obtenido. B) Imagen de microscopio confocal del pseudo-islote y sus planos transversales. C) *Fluorescence intensity* de un plano del pseudo-islote evaluado. D) Fotografía de la distribución espacial de las células para diferentes planos de un mismo pseudo-islote

E. Cuantificación de insulina y glucagón secretados

Se demostró la funcionalidad de los pseudo-islotes obtenidos por medio del test ELISA par reconocer la presencia de insulina y glucagón. Como se puede apreciar en la Figura 5, para niveles bajos de glucosa aumenta la aparición de glucagón, mientras que para niveles altos aumenta la insulina. Este comportamiento es el esperado en un islote pancreático.

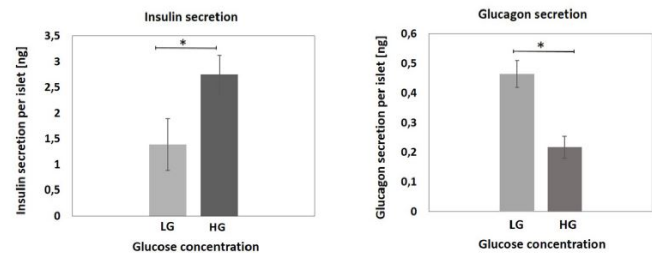


Fig. 5. Imagen tomada del paper de Sokolowska, et al.(2021) [6]. Nivel de insulina y glucagón liberados para las concentraciones bajas (LG) y altas (HG) de glucosa.

IV. CONCLUSIONES

Los autores lograron obtener un pseudo-islole pancreático que imitaba en funcionalidad, geometría y morfología a uno de roedor original. Algunas mejoras que podrían implementarse sería utilizando una mayor variedad de concentraciones de glucosa para encontrar una relación entre el nivel de glucosa y hormonas liberadas, además de intentar replicar el experimento con células humanas.

Para el correcto diseño de estos pseudo-isloles fue necesario el uso de muchos elementos que requieren un equipamiento de laboratorio relativamente común o fácil de obtener, como el uso de microscopía confocal o de fluorescencia, incubadoras y refrigeración o el kit de test ELISA. También fue de mucha utilidad, previo a la implementación del prototipo, realizar una simulación y diseño por computador para predecir el comportamiento de los agregados bajo ciertos flujos. Sin embargo, el elemento clave en este experimento es el uso de *microfluidic system*, que permite diseñar la interfaz necesaria para llevar a cabo los experimentos sin trasladar las células de un plato a otro y otorgándoles un modelo tridimensional en el que guiarse para la formación de los isloles. Con este diseño se reafirma la utilidad de este método de prototipado y su potencial para alcanzar soluciones que no son posibles de realizar en un cultivo tradicional.

Uno de los objetivos de los autores al presentar este paper es reducir el testeo en animales para comenzar a usar estos pseudo-isloles. Por ello, el texto original [6] se encuentra muy detallado sobre sus concentraciones, volúmenes y equipamiento necesario para realizar el experimento uno mismo. Difundir información de este tipo es de mucha utilidad para la comunidad científica y permite también que otros se puedan inspirar para basarse en sus diseños y trabajar en otro tipo agregados celulares del cuerpo. Un ejemplo de esto último es uno de los papers publicados que citan al de Sokolowska, llamado 'From cell spheroids to vascularized cancer organoids: Microfluidic tumor-on-a-chip models for preclinical drug evaluations'. De esta forma, un experimento que está pensado para tratar la diabetes puede inspirar a desarrollar otro que se enfoque en ayudar estudios contra el cáncer.

REFERENCES

- [1] Statista.com (2019). *Ranking de los países con mayor número de enfermos de diabetes en 2019*. Disponible en: [statista.com](https://www.statista.com)
- [2] Organización Mundial de la Salud, OMS (2021). *Diabetes*. Disponible en: [OMS-Diabetes](https://www.who.int/es/diabetes)
- [3] Medlineplus (2021). *Diabetes tipo 2*. Disponible en: medlineplus.gov
- [4] NIH: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney diseases (2018). *Transplante de isloles pancreáticos*. Disponible en: niddk.nih.gov
- [5] Jairo Rojano Rada, Marcelo Alejandro Storino Farina, Richard de Jesús Serrano López, Javier Contreras, Lina Almonte, Nidia Agreda, Ennis Blanca (2016). *Sobrevida de los isloles β pancreáticos y uso de hipoglucemiantes orales: un gran reto para el médico actual*. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo, vol. 14, núm. 1, pp. 5-15, 2016. Sociedad Venezolana de Endocrinología y Metabolismo. Disponible en: redalyc.org
- [6] Patrycja Sokolowska, Kamil Zukowski, Justyna Janikiewicz, Elzbieta Jastrzebska, Agnieszka Dobrzyn, Zbigniew Brzozka (2021). *Islet-on-a-chip: Biomimetic micropillar-based microfluidic system for three-dimensional pancreatic islet cell culture*. Biosensors and Bioelectronics, Volume 183, 113215, ISSN 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113215>.
- [7] Steiner, D.J., Kim, A., Miller, K., Hara, M. (2010). *Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition*. Islets 2 (3), 135-145.