

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DEL PERÚ**  
**Escuela de Posgrado**



Diseño e Implementación de una Plataforma de  
Microtitulación Elástica que genera Esfuerzos  
Cortantes y Elongaciones Homogéneas para Cultivo de  
Células Bidimensionales

Tesis para obtener el grado de Magíster en Ingeniería Biomédica  
que presenta:

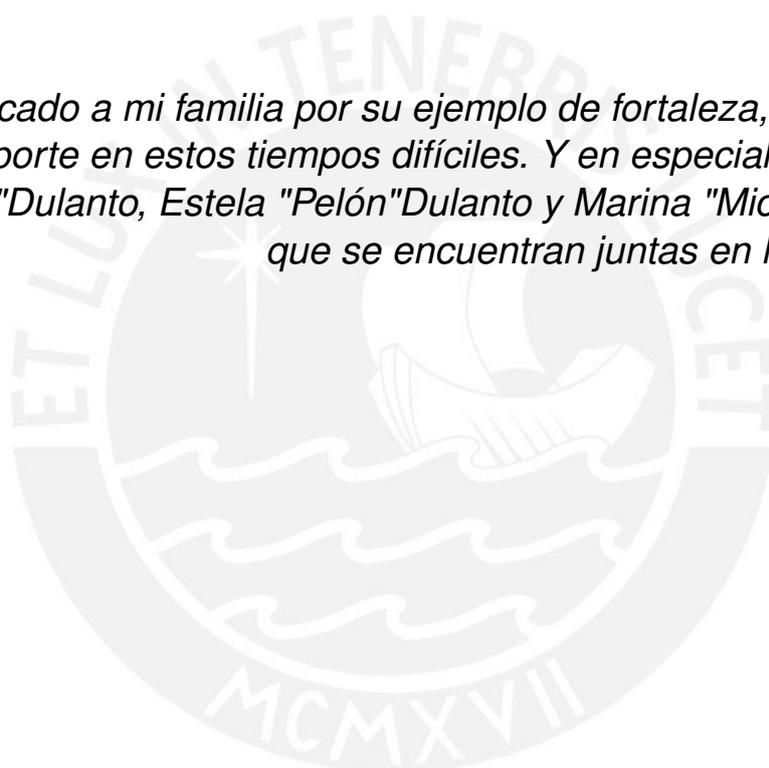
***Etsel Lemy Suarez Uribe***

Asesora:

***Dr. Fanny Lys Casado Peña***

Lima, 2022

*Dedicado a mi familia por su ejemplo de fortaleza, su apoyo y soporte en estos tiempos difíciles. Y en especial a Gregoria "Goya"Dulanto, Estela "Pelón"Dulanto y Marina "Micha"Dulanto que se encuentran juntas en la eternidad*



# *Resumen*

## **Diseño e Implementación de una Plataforma de Microtitulación Elástica que genera Esfuerzos Cortantes y Elongaciones Homogéneas para Cultivo de Células Bidimensionales**

por Etsel Lemy Suarez Uribe

Las variables bioquímicas y las modulaciones mecánicas influyen en el comportamiento celular. A la actualidad, los sistemas de microtitulación comerciales no ejercen modulaciones mecánicas homogéneas en regiones de cultivo celular independientes (superficies de pocillos). Esta homogeneidad es necesaria para estudiar con mayor precisión la respuesta biológica de las células a estas modulaciones y para ello, se requiere la mayor población celular bajo las mismas condiciones mecánicas. Por lo que en este proyecto de tesis, se presenta una plataforma de microtitulación que genera campos de elongaciones y esfuerzos cortantes homogéneos en las regiones de interés para cultivo celular, esto con el fin de obtener poca variabilidad de las magnitudes de estímulos mecánicos en una misma región de cultivo. Para lo cual, para el diseño de la plataforma se usaron las dimensiones estándares de sistemas de microtitulación comerciales y, con el objetivo de desarrollar campos mecánicos homogéneos, se empleó un software de cálculo por elementos finitos y herramientas de optimización topológica. Con la optimización realizada se obtuvo un incremento a aproximadamente 250 % en área de región de cultivo celular con esfuerzos cortantes homogéneos y un aumento al 177 % del área de cultivo bajo elongaciones homogéneas con respecto a sistemas de microtitulación con dimensiones comerciales. Se analizaron dos materiales: RTV1500 y Sylgard 184; y para la manufactura del diseño propuesto se empleó fabricación digital aditiva tradicional y fabricación con tecnología Polyjet. Los principios de accionamiento para lograr las elongaciones y esfuerzos cortantes se basaron en el accionamiento neumático y la minifluídica, respectivamente. Finalmente se verificó la capacidad del sistema de ser estéril y se validó funcionalmente, mediante el análisis de viabilidad de una línea celular comercial.

## *Agradecimientos*

En primer lugar agradecer a mi asesora de tesis, Dra. Fanny Casado por el tiempo y paciencia en su guía para el desarrollo de este trabajo de tesis. Además, agradecer al equipo del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada ICOBA-PUCP en especial a Marlon Morales, Heillen Calderón y Melanie Gonzales, al equipo de la sala de Manufactura Digital Sala VEO-PUCP en especial a Midori Sánchez y al área de CITE materiales PUCP, sobre todo a Carlos Romero, por el apoyo técnico y académico sin los cuales esta tesis no habría sido realizada.



# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>II</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Fundamento Teórico</b>	<b>4</b>
2.1. Cultivo Celular en Sistemas de Microtitulación . . . . .	4
2.1.1. Características generales de los cultivos celulares <i>in vitro</i> .	5
2.1.2. Proliferación, diferenciación y apoptosis . . . . .	5
2.1.3. Clasificación de las células usadas para cultivo celular . . .	6
De acuerdo a su método de obtención . . . . .	6
De acuerdo a su adherencia . . . . .	6
2.1.4. Componentes principales de un cultivo celular . . . . .	8
2.1.5. Materiales usados como andamiaje celular . . . . .	9
2.1.6. Esterilidad de los sistemas físicos para cultivo celular . . .	9
Métodos de esterilización . . . . .	10
Validación de esterilidad . . . . .	10
Validación de biocompatibilidad . . . . .	11
2.2. Mecanobiología Celular . . . . .	11
2.2.1. Excitaciones mecánicas en sistemas biológicos . . . . .	12
Mecanotransducción . . . . .	12
2.2.2. Movimientos físicos de los tejidos . . . . .	13
<b>3. Estado del Arte</b>	<b>15</b>
3.1. Modulación Mecánica Pasiva . . . . .	15
3.2. Modulación Mecánica Activa . . . . .	17

<b>4. Objetivos e Hipótesis</b>	<b>20</b>
4.1. Objetivos	20
4.1.1. Objetivo general	20
4.1.2. Objetivos específicos	20
4.2. Hipótesis	21
4.2.1. Hipótesis general	21
4.2.2. Hipótesis específicas	21
<b>5. Metodología</b>	<b>22</b>
5.1. Diseño	23
5.1.1. Requerimientos de diseño	23
5.1.2. Abstracción de ideas y definición de funciones	23
Entradas	24
Salidas	24
Funciones para el estímulo mecánico de elongación	25
Matriz morfológica para el estímulo mecánico de elongación	26
Definición del concepto de solución para el estímulo mecánico de elongación	26
Funciones para el estímulo mecánico de esfuerzos cortantes	27
Matriz morfológica para el estímulo mecánico de esfuerzos cortantes	28
Definición del concepto de solución para el estímulo mecánico de esfuerzos cortantes	29
5.1.3. Diseño preliminar	29
Procedimiento del usuario	29
Procedimiento de funcionamiento	30
Diseño preliminar	31
5.1.4. Principios de accionamiento	32
Accionamiento mecánico mediante presurización de la superficie del sistema de microtitulación para generar elongaciones	32
Accionamiento mecánico mediante flujos que generen esfuerzos cortantes en la superficie celular	33
5.1.5. Materiales	33
5.1.6. Proceso de manufactura	33
5.1.7. Resolución de la fabricación digital aditiva tradicional	34
5.1.8. Diseño inicial y optimización	34
Diseño inicial	34

Optimización . . . . .	35
Homogeneidad de esfuerzos cortantes . . . . .	36
Homogeneidad de elongaciones . . . . .	36
Integración de los resultados . . . . .	37
5.2. Verificación . . . . .	38
5.2.1. Verificación del campo de elongaciones en la superficie de los pocillos . . . . .	38
5.2.2. Verificación del campo de esfuerzos cortantes en la superficie de los pocillos . . . . .	38
5.2.3. Resistencia térmica del material . . . . .	39
5.2.4. Esterilidad de la plataforma propuesta . . . . .	39
5.3. Viabilidad Celular . . . . .	39
<b>6. Resultados</b>	<b>41</b>
6.1. Diseño del Soporte . . . . .	41
6.2. Optimización del Diseño . . . . .	42
6.2.1. Esfuerzos cortantes homogéneos . . . . .	42
Primera función objetivo: Componente $u$ . . . . .	44
Segunda función objetivo: Componente $w$ . . . . .	44
6.2.2. Elongaciones . . . . .	47
6.3. Verificación del Diseño Final del Sistema de Microtitulación . . . . .	49
6.3.1. Fabricación . . . . .	50
Moldes . . . . .	50
Materiales y mezclas usadas . . . . .	51
Ensamble del sistema completo . . . . .	51
6.3.2. Verificación del campo de elongaciones homogéneas y esfuerzos cortantes . . . . .	53
Elongaciones: Comparación entre el diseño optimizado y el diseño base . . . . .	53
Esfuerzos Cortantes: Comparación entre el diseño optimizado y el diseño base . . . . .	56
6.4. Análisis del Material Usado para el Componente del Módulo de Pocillos de la Plataforma . . . . .	57
6.4.1. Ensayo por calorimetría diferencial de barrido . . . . .	58
6.4.2. Ensayo de transparencia . . . . .	60
6.5. Ensayos de Esterilidad . . . . .	60
Resultados de los ensayos de esterilidad usando diferentes protocolos de esterilización . . . . .	62

6.6. Ensayo de Tracción . . . . .	62
6.7. Hinchamiento o Swelling . . . . .	64
6.8. Validación en una Línea Celular Comercial - Viabilidad Celular . .	65
<b>7. Conclusiones</b>	<b>66</b>
<b>8. Perspectivas y Trabajo Futuro</b>	<b>68</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>70</b>
<b>A. Planos del Sistema de Microtitulación Propuesto</b>	<b>79</b>
<b>B. Planos de los Moldes para la Fabricación del Sistema de Microtitulación Propuesto</b>	<b>86</b>



## Índice de figuras

3.1. Efecto del módulo de elasticidad del soporte físico sobre a) el área y b) la circunferencialidad, del núcleo celular de células madre mesenquimales. Adaptado de [47] . . . . .	16
3.2. a) Imágenes SEM de andamiajes de PLGA. Adaptado de Costello et al, 2014 [49]. b) Imágenes SEM de andamiajes usando estereolitografía de alta resolución. Adaptado de Creff et al, 2019 [50]. . . . .	16
3.3. Investigaciones relacionados a la generación de esfuerzos cortantes como consecuencia de los flujos sobre la superficie celular a) Adaptado de Kim et al, 2012 [53], b) Diseño de andamiaje, adaptado de Costello et al, 2017 [54] y c) Simulación de esfuerzos cortantes, adaptado de Costello et al, 2017 [54]. . . . .	17
3.4. Plataformas comerciales que generan elongaciones en los andamiajes celulares. a) Stage Flexer (Flexcell International Corp, USA) [63] and b) Stretch System STB-150 (STERX Inc., USA) [66]. Adaptado de Kamble et al, 2016 [57]. . . . .	18
5.1. Entradas y Salidas generales del sistema a diseñar. . . . .	24
5.2. Diagrama general del sistema propuesto en donde se observan las señales de los dos estímulos mecánicos. $s_1$ y $s_2$ son las señales de control para elongar y generar esfuerzos cortantes respectivamente. Por otro lado, $E_1$ y $E_2$ son las señales mecánicas que actúan sobre la superficie celular. . . . .	25
5.3. Estructura de las funciones para la parte del sistema que genera elongaciones en la superficie de cultivo celular. . . . .	26
5.4. Matriz morfológica del subsistema que genera estímulos mecánicos de elongación. . . . .	27

5.5. Estructura de las funciones para la parte del sistema que genera esfuerzos cortantes en la superficie de cultivo celular. . . . .	28
5.6. Matriz morfológica de la parte del sistema que genera estímulos mecánicos de esfuerzos cortantes. . . . .	29
5.7. Esquema base del sistema de microtitulación propuesto con seis módulos de cuatro pocillos. . . . .	35
5.8. Sección transversal de un pocillo, en el esquema se presenta los componentes de un pocillo del sistema de microtitulación en el que actúan flujos. . . . .	36
5.9. Esquema inicial de los componentes de un pocillo del sistema de microtitulación en el que actúan presiones neumáticas. . . . .	37
5.10. Representación esquemática del sistema completo para la generación de esfuerzos cortantes mediante flujo y elongaciones homogéneas. Se emplea una bomba peristáltica y una bomba de presurización como fuentes de energía mecánica. . . . .	37
6.1. Se presenta la base de la plataforma desarrollada. a) Base, b) Tapa comercial sobre base propuesta, c) Tapa comercial bajo base propuesta. . . . .	42
6.2. a) Mallado del volumen total de flujo aplicado sobre el diseño base del sistema de microtitulación propuesto, b) Gráfica de la gradiente de la velocidad $u$ (eje $x$ ) respecto a la dirección $y$ c) Gráfica de la gradiente de la velocidad $w$ (eje $z$ ) respecto a la dirección $y$ . . . . .	43
6.3. a) Optimización topológica del volumen de control usando como función objetivo la maximización de la magnitud del promedio de la gradiente de la componente $u$ de la velocidad con respecto a la vertical, b) Gráfica de la gradiente de la velocidad $u$ (eje $x$ ) respecto a la dirección $y$ c) Gráfica de la gradiente de la velocidad $w$ (eje $z$ ) respecto a la dirección $y$ . . . . .	45
6.4. a) Análisis computacional del diseño optimizado mejorado en un software CAD usando la maximización de la magnitud del promedio de la gradiente de la componente $u$ de la velocidad con respecto a la vertical, b) Gráfica de la gradiente de la velocidad $u$ (eje $x$ ) respecto a la dirección $y$ , c) Gráfica de la gradiente de la velocidad $w$ (eje $z$ ) respecto a la dirección $y$ . . . . .	45

6.5. a) Análisis computacional del diseño mejorado en un software CAD del diseño obtenido en COMSOL usando como función objetivo la maximización de la magnitud de la gradiente de la componente horizontal $w$ de la velocidad con respecto a la vertical $y$ , b) Gráfica de la gradiente de la velocidad $u$ (eje $x$ ) respecto a la dirección $y$ c) Gráfica de la gradiente de la velocidad $w$ (eje $z$ ) respecto a la dirección $y$ . . . . .	46
6.6. Comparación entre la magnitud y dirección del campo de esfuerzos cortantes. El signo negativo del campo de esfuerzos señala que el vector de la gradiente de velocidad con respecto a la velocidad se encuentra en el cuadrante $(-x, y)$ y una magnitud positiva se encuentra en el cuadrante $(x, y)$ a) Optimización 1 y b) Optimización 2. En los dos casos los valores resultantes fueron normalizados para mejor comparación de resultados. . . . .	46
6.7. Campo de elongaciones superficiales del pocillo sin optimización: a) componente radial, b) componente $z$ y c) la componente $\theta$ . . . .	47
6.8. Diseño paramétrico radial 2D del pocillo de radio 7.5 mm. La superficie $S+S'$ es el radio de la base circular del pocillo en donde estarán ubicadas las células. La región restante $R'$ es la que será optimizada usando Shape Optimization en COMSOL y con la función objetivo ya descrita. . . . .	48
6.9. Resultados de la optimización de la forma de la región $R'$ (ver Fig. 6.8). a) Forma optimizada, b) tensor de elongaciones de la componente radial, c) tensor de elongaciones de la componente vertical y d) tensor de elongaciones de la componente angular. . . . .	49
6.10. Esquemático de un módulo de cuatro pocillos de la plataforma propuesta en base a las optimizaciones realizadas, en las figuras, el volumen rojo representa el volumen del fluido y el volumen azul representa el volumen de fluido presurizado. a) Vista isométrica, b) vista inferior y c) vista frontal. . . . .	50
6.11. Proceso de integración y ensamble del diseño optimizado de un módulo de 4 pocillos. Esquema de ensamblaje con moldes simplificados para el entendimiento. . . . .	52
6.12. Partes del componente superior de la plataforma propuesta. a) Molde para tapa del sistema propuesto, b) tapa final de Sylgard 184, c) rigidizador de tapa y d) sujetador de tapa. . . . .	53

6.13. Sistema de microtitulación propuesto. a) Base de acero inoxidable y micropocillos de polímero elastomérico Sylgard 184 y RTV1500, b) base de Veroclear y micropocillos de polímero elastomérico Sylgard 184 y RTV1500, c) sistema mostrado en b) con tapa comercial y d) sistema mostrado en b) con tapa diseñada sin rigidizador ni sujetadores. . . . .	53
6.14. Esquemático de las posibles opciones de funcionamiento. Las flechas representan la dirección del flujo. . . . .	54
6.15. Esquemático del proceso de armado de la plataforma propuesta para el modo de generación de esfuerzos cortantes. a) Colocar el módulo en la base de Veroclear, b) ubicar la tapa de Sylgard 184 (ver Fig. 6.12b) y luego el rigidizador, c) colocar a presión los sujetadores. . . . .	54
6.16. Sistema de microtitulación propuesto bajo la generación de esfuerzos cortantes. a) Con tapa diseñada colocada sobre el sistema fabricado de Sylgard 184 sin rigidizador para observar el flujo y b) con rigidizador. En estas pruebas se usa agua colorada. . . . .	55
6.17. Análisis del diseño base (círculos), el diseño optimizado fabricado (triángulos) y el simulado (cuadrados). a) Gráfica de elongaciones radiales, b) gráfica de elongaciones radiales normalizadas, c) perfil de la vista lateral del pocillo a diferentes presiones neumáticas, d) ejemplo de imagen filtrada usando detección de bordes de la inflación de la membrana optimizada para cultivo celular y e) ejemplo de imagen procesada del conjunto de marcas a 0 y 30 kPa para el cálculo de las elongaciones radiales. Los dos diseños fueron fabricados con el material Sylgard 184. . . . .	56
6.18. Comparación entre la magnitud del campo de esfuerzos cortantes. En los dos casos, los valores resultantes fueron normalizados para mejor comparación de resultados y además se tiene un umbral mínimo de 0.7 (línea verde) y 0.5 (línea negra). a) Campo de esfuerzos en el diseño sin optimizar y b) campo de esfuerzos en el diseño optimizado. . . . .	57
6.19. Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido del polímero RTV1500, sintetizado en relación 1:1 en masa y a un vacío de -0.95 bar. Se observa una variación de -0.74 % a aproximadamente 320 °C. . . . .	58
6.20. Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido del polímero RTV1500, sintetizado en relación 1:1 en masa sin vacío. Se observa una variación de -0.27 % en masa a aproximadamente 200 °C. . . . .	59

6.21. Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido del polímero RTV1500, sintetizado en relación random en masa al vacío. Se observa una variación de -0.53% en masa a aproximadamente 200 °C. . . . .	59
6.22. Resultados de Calorimetría Diferencial de Barrido del material Sylgard 184 antes (línea roja) y después (línea morada) del autoclavado. 60	
6.23. Análisis de Transparencia. a) Material RTV1500, b) material Sylgard 184. . . . .	61
6.24. Ejemplos de resultados del Ensayo 2 usando los protocolos de esterilización presentados anteriormente. a) Acero Inoxidable usando el Protocolo 2, b) Veroclear usando el Protocolo 3, c) PLA usando el Protocolo 3, d) Sylgard 184 usando el protocolo 2, e) Veroclear usando el Protocolo 1, f) PLA usando el Protocolo 1. . . . .	63
6.25. Ensayo de tracción ASTM D412 del material Sylgard 184 (20:1). Línea roja: Ensayo de Tracción del polímero sin autoclavar. Línea Azul: Ensayo de Tracción del polímero luego del proceso de autoclavado. . . . .	64
6.26. Células HL60. a) Día 0, b) día 2 en plataforma comercial y c) día 2 en plataforma propuesta. . . . .	65

## Índice de tablas

2.1. Comparación de las características de cultivos de células adherentes y en suspensión. . . . .	7
2.2. Valores de elongación reportados en diferentes tejidos excitables. . . . .	13
5.1. Tabla de evaluación de conceptos de solución de la parte del sistema que genera estímulos mecánicos de elongación. C.S. Concepto de Solución. . . . .	27
5.2. Tabla de evaluación de conceptos de solución de la parte del sistema que genera estímulos mecánicos de elongación. C.S. Concepto de Solución. C.S.: Conceptos de Solución. . . . .	30
5.3. Diseños Preliminares teniendo como base el Concepto de Solución Óptimo. D.P.: Diseño Preliminar. . . . .	31
5.4. Evaluación Técnica y Económica de los Diseños Preliminares planteados en la Tabla 5.3. D.P.: Diseño Preliminar. . . . .	32
6.1. Características de las diferentes mezclas en peso del Sylgard™184. . . . .	51
6.2. Resultados de esterilidad obtenidos por protocolo de acuerdo a cada ensayo de validación. +: Se confirmó esterilidad, -: Se observaron microorganismos, o: Incompatibilidad de ensayo (flotación) o protocolo (el material no resiste el autoclavado). . . . .	63

# Capítulo 1

## Introducción

El área de investigación en el desarrollo de antibióticos a nivel mundial se encuentra, cada vez más seguido, con mayores dificultades a la hora de crear un nuevo producto, esto es debido al comportamiento denominado resistencia antibiótica originada por la evolución natural de los microorganismos sobre los cuales se desean aplicar estos productos. Existen dos tipos de métodos de desarrollo de antibióticos: las técnicas *in vivo* y las técnicas *in vitro*. Las técnicas *in vivo*, se basan en monitorear el efecto directo de los antibióticos candidatos en seres vivos, lo cual lleva a grandes gastos, seguir protocolos complicados y a un conflicto ético todavía totalmente no resuelto. En cambio, las técnicas *in vitro* necesitan menor cantidad de seres vivos ya que usan líneas celulares comerciales como objetos de prueba de los nuevos productos. Sin embargo, los protocolos actuales para la validación de funcionalidad de antibióticos ordenan, de todas maneras, una validación *in vivo* debido a la desventaja natural que presentan los tejidos y/o células cultivadas *in vitro* ya que no están en el mismo entorno biológico en comparación a como sí lo estuvieran en métodos *in vivo* por lo que no responden igual.

Actualmente, el avance tecnológico en el desarrollo de nuevos métodos *in vitro* de cultivo celular proclama que, en un futuro no tan lejano, ya no será necesaria la validación *in vivo*. Esto es debido a que las investigaciones actuales están direccionadas al diseño de plataformas de cultivo con morfologías, propiedades mecánicas, ambientes mecanobiológicos y características bioquímicas semejantes a la realidad biológica del ambiente en donde crecen naturalmente las células (matriz extracelular). Esta dirección que están tomando las investigaciones surge

debido a que se tiene evidencia de que los fenómenos de mecanotransducción y mecanobiología celular influyen considerablemente en la proliferación y diferenciación de las células.

En el sentido de las investigaciones actuales mencionadas anteriormente, estas usan diferentes técnicas para lograr esta aproximación deseada; por ejemplo, la morfología y el diseño en general son implementados mediante técnicas de microfabricación. Y debido a que el acceso a estas técnicas es limitado en lugares con laboratorios cuya ubicación geográfica sí permite el uso de recursos bioquímicos de la naturaleza local, grandes esfuerzos se están realizando para lograr la ubicuidad de tales técnicas mediante la fabricación digital.

Actualmente, el método más empleado para realizar cultivo celular *in vitro* es el uso de los sistemas de microtitulación. Estos sistemas son transparentes, biocompatibles y tienen diseños que permiten realizar diferentes ensayos biológicos y químicos en un mismo sistema, ya que están formados por arreglos matriciales de pocillos cilíndricos independientes, en donde la base circular de cada uno de estos pocillos es usada como una superficie de cultivo celular. Sin embargo, estos sistemas son estáticos, es decir, no producen excitaciones mecánicas sobre las células. Por lo que, esta desventaja ha llevado al desarrollo de sistemas para cultivo de células bidimensionales compuestos de materiales elásticos que producen deformaciones en la superficie de cultivo celular, y además, a diseños que generen esfuerzos cortantes en las células mediante la aplicación de flujos. Estos sistemas avanzados tienen mejores resultados que los sistemas de microtitulación convencionales, lo cual se ve reflejado en el comportamiento celular. Sin embargo, estos sistemas que son desarrollados con materiales elásticos producen elongaciones heterogéneas en una misma superficie de cultivo o los diseños de dispositivos de microfluídica no pertenecen al grupo de sistemas de microtitulación, dificultando el proceso de evaluación bioquímica de las células bajo estudio, en los cuales se analiza la población completa de células cultivadas; o no son sistemas multipropósito con superficies de cultivo independientes. Adicionalmente, la heterogeneidad también afecta la modulación de las excitaciones mecánicas aplicadas sobre estas células, ya que se buscan células que tengan las mismas variables controladas en una misma superficie de cultivo, pero los campos mecánicos generados en los sistemas actuales no brindan esa característica. Finalmente, cabe resaltar también que los sistemas actuales que producen elongaciones homogéneas requieren otros mecanismos activos adicionales volviendo impráctico el sistema.

Por lo tanto, este trabajo de investigación propone un procedimiento de diseño, simulación, verificación y validación de sistemas de microtitulación con el

objetivo de lograr excitaciones mecánicas homogéneas dentro de una misma región de interés lo cual aumentaría la cantidad de información adquirida por los investigadores para lograr una correcta caracterización del efecto del campo mecánico sobre las células con la finalidad de que en un futuro cercano, se logren diseñar plataformas que simulen exactamente el ambiente biológico de las células.



## Capítulo 2

# Fundamento Teórico

En la presente tesis, las áreas de investigación involucradas están enmarcadas en el área de ingeniería de tejidos, especialmente en los procedimientos de cultivo celular en sistemas de microtitulación comerciales y en el área de la mecanotransducción celular. Por lo que en este capítulo se abarcan conceptos y elementos que se usarán en este trabajo de investigación relacionados a estas dos áreas.

### 2.1. Cultivo Celular en Sistemas de Microtitulación

Los primeros conceptos presentados están relacionados al cultivo celular en sistemas de microtitulación, se mencionan las características generales del procedimiento involucrado en este tipo de cultivo, los diferentes comportamientos celulares que se pueden observar bajo los distintos parámetros controlados de este procedimiento y se presentan dos clasificaciones generales de las células usadas para estos análisis. Luego de presentar esos conceptos, se expondrán conceptos ingenieriles aplicados a este contexto, se mencionarán: los componentes principales de un cultivo celular en sistemas de microtitulación, los materiales usados como soporte físico de las células, los procesos de esterilización involucrados y la validación funcional requerida para estos sistemas.

### 2.1.1. Características generales de los cultivos celulares *in vitro*

En primer lugar se define el cultivo celular *in vitro* al conjunto de procedimientos realizados, bajo condiciones controladas tales como la temperatura del entorno, pH, % de  $O_2$  y  $CO_2$ , por mencionar algunas, para lograr el crecimiento de células fuera de un organismo vivo; convirtiendo al control de estas condiciones fisicoquímicas y fisiológicas externas en la principal ventaja de este método. Otra de las ventajas es la gran homogeneidad observada en el comportamiento de las células que están en estudio, debido a que esta característica no es observada en los animales ni plantas, pero es necesaria para un análisis más preciso ya que, para este, se requiere la mayor cantidad de población celular a las mismas condiciones.

Otra característica importante del cultivo celular mediante técnicas *in vitro* es la utilidad que estas tienen para la evaluación de la respuesta biológica de las células, tejidos y órganos a las interacciones con productos biomédicos y farmacológicos. Esto permite reducir el número de organismos vivos de prueba y otorgan un rápido, de bajo costo y confiable método de evaluación inicial [1].

### 2.1.2. Proliferación, diferenciación y apoptosis

El conjunto de condiciones (sobre todo las bioquímicas) que se aplican sobre las células en el cultivo celular *in vitro* depende mucho del objetivo de la investigación, por eso es necesario entender el comportamiento biológico resultante de una célula al ser expuesta a este ambiente. Este comportamiento puede ser: proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Para el alcance de esta investigación, se definirán la proliferación, diferenciación y apoptosis.

La proliferación se puede definir como la etapa de mitosis de las células en la cual cada una se divide en dos células hijas con las mismas características que la inicial. Usualmente, la proliferación es referida como crecimiento celular [2] así que en este documento se mencionarán los dos términos como sinónimos y se usarán indistintamente. Los factores que influyen en la proliferación celular son: la composición del medio de cultivo [3], el cual contiene hormonas de crecimiento; el entorno en el que las células se ubican, esto quiere decir por ejemplo, si las células se encuentran en un entorno de alta densidad celular (# de células/ml), estas no podrán proliferar [4] y hasta llegan a autodestruirse –apoptosis– [5] al encontrarse estresadas [6]; además de estos factores, se han identificado que las excitaciones mecánicas ejercidas en las células también afectan a la proliferación

celular [7], [8], las cuales generan expresiones de proteínas que estimulan el crecimiento.

En otro sentido, la diferenciación se refiere a la modificación del fenotipo celular inducido por cambios en el entorno en el cual las células están siendo cultivadas. Los factores que influyen en la diferenciación son los mismos que en la proliferación: composición del medio de cultivo, entorno en el que se ubican [9] y excitaciones mecánicas externas [10], [11]. Sin embargo, la diferenciación y proliferación son excluyentes entre sí, es decir, una alta proliferación celular inhibe la diferenciación y viceversa [12].

### **2.1.3. Clasificación de las células usadas para cultivo celular**

Para distinguir las condiciones o pre-tratamientos necesarios con el fin de lograr el cultivo celular y por ende obtener el conjunto de células con el comportamiento específico requerido en la investigación, es práctica común clasificar a las células. Se tienen en general dos clasificaciones para estas: la primera clasificación se basa en el método de obtención de las células y la otra se basa en la naturaleza adherente de la célula sobre las superficies de contacto.

#### **De acuerdo a su método de obtención**

En el sentido de la clasificación de las células de acuerdo a su método de obtención, se puede mencionar que provienen de dos grupos. El primer grupo comprende a las células inmortalizadas o también conocidas como células pertenecientes a una línea celular (de amplio uso), las cuales son productos comercializados y que posibilitan el estudio de las funciones básicas de las células [13]. Mientras que el segundo grupo involucra a las células primarias para cultivo, las cuales provienen directamente disociadas de un tejido animal o vegetal mediante medios mecánicos o enzimáticos y tienen propiedades similares a las células del tejido del sistema *in vivo*, logrando mejor predicción de los resultados de los fármacos o dispositivos implantables bajo investigación. Sin embargo, debido a los métodos de obtención de estas células poseen menor tiempo de vida para el análisis correspondiente [12].

#### **De acuerdo a su adherencia**

De acuerdo a la adherencia de las células, estas se pueden clasificar en dos: células adherentes y las células no adherentes (o en suspensión). La diferencia entre estos dos tipos de células radica en que las células adherentes tienen la

necesidad de adherirse a la superficie en donde se realizará el cultivo celular antes de proliferar, además se requiere de un tratamiento de la superficie en donde se realizará el cultivo antes del inicio del procedimiento. En la siguiente tabla (ver Tabla 2.1), se muestra una comparación entre estos tipos de cultivo [14].

TABLA 2.1: Comparación de las características de cultivos de células adherentes y en suspensión.

<b>Característica</b>	<b>Cultivo de Células Adherentes</b>	<b>Cultivo de Células en Suspensión</b>
Linaje celular	Células no hematopoyéticas incluyendo cultivos primarios	Células hematopoyéticas e inmunitarias
Monitoreo	Uso de microscopía invertida	Microscopía invertida o de luz directa
Tratamiento de subcultivo	Requiere tratamiento enzimático o mecánico	Centrifugación
Límites al crecimiento	Limitado por el área de cultivo	Limitado por la concentración de células en el medio
Tratamiento superficial	Requiere tratamiento antes del cultivo	No requiere tratamiento, pero requiere agitación
Aplicaciones	Citología	Producción de proteínas

Aunque en la tabla se muestran diferencias entre los tipos de células en este contexto, una célula en suspensión o no adherente puede diferenciarse y convertirse en una de tipo adherente, como por ejemplo la línea celular HL-60 [15].

La clasificación celular en base a su capacidad de adhesión a superficies es importante para conocer cuales son los canales para la generación de modulaciones mecánicas. En el caso específico de las células adherentes, la interfaz entre las células y su entorno es uno de estos canales, ya que cumple un rol importante en la comunicación intercelular y regulación para la diferenciación, proliferación y el ciclo de vida celular [16]; esto es debido a que la adhesión celular comprende la acción de moléculas transmembranales llamadas integrinas [17], las cuales se adhieren a la superficie del entorno extracelular transportando y traduciendo las señales mecánicas externas hacia el núcleo para la expresión de proteínas que generen la respuesta fenotípica específica [18].

La adhesión celular se puede presentar entre células o entre células y la matriz extracelular. Para este segundo caso, la superficie para el cultivo también interviene como soporte físico de la matriz, por lo que se requiere que esta tenga ciertas propiedades, como la hidrofiliidad y existencia de grupos funcionales y la compatibilidad de la célula a la adherencia a esta superficie.

### 2.1.4. Componentes principales de un cultivo celular

Saliendo del área biológica hacia un esquema físico más general e ingenieril para describir el proceso de cultivo celular *in vitro*, se pueden enumerar los siguientes componentes físicos o equipos necesarios:

- Células: Como se mencionó anteriormente las células pueden ser comerciales (línea celular) o proveniente de un cultivo primario.
- Sistema físico para el crecimiento celular: Los sistemas físicos usualmente utilizados para el crecimiento celular *in vitro* son conocidos como sistemas de microtitulación (micropocillos) y frascos T-25 usados como compartimentos y herramientas de replicabilidad de ensayos.
- Medio físico-químico de las células: Conocido también como andamiaje o andamio celular, el cual representa la interface intercelular o célula-sistema físico.
- Medio líquido de cultivo: Usado como nutriente para el crecimiento celular y la elección del adecuado depende de la hoja técnica de la línea celular o del tipo de célula del cultivo primario.
- Medio gaseoso de cultivo: Generado por un equipo en donde se regulan los parámetros de temperatura, % de  $CO_2$  y humedad relativa del entorno donde se realiza el crecimiento celular.
- Método de visualización por microscopía: Elemento para el monitoreo del crecimiento y densidad celular.

Tradicionalmente, se usan los sistemas de microtitulación como soporte físico del andamiaje de células adherentes, con lo que la morfología plana es adoptada por el andamio. Sin embargo, no se logra una aproximación mecánica adecuada al ambiente *in vivo* para las células bajo estudio. Por lo que, desde el punto de vista ingenieril, el diseño de sistemas físicos artificiales usando diversos materiales, geometrías y principios de accionamiento brinda la posibilidad de implementar plataformas que generen el comportamiento aproximadamente real en las células causado por el ambiente mecanobiológico artificial aproximado.

Por lo que a continuación se presenta un resumen de los materiales comúnmente usados y requisitos mínimos necesarios para diseñar e implementar una plataforma para cultivo celular *in vitro*.

### 2.1.5. Materiales usados como andamiaje celular

Las estructuras espaciales usadas como el soporte físico de las células en el procedimiento de cultivo *in vitro* se conocen como andamiajes celulares. Estos andamiajes deben brindar el componente mecánico y bioquímico externo necesario para que las células bajo análisis puedan proliferar, diferenciarse, trasladarse o morir, dependiendo del objeto de estudio. Debido a que se requiere que estos andamiajes brinden un mayor acercamiento biológico al ambiente *in vivo* de las células bajo estudio existen investigaciones dentro del campo de la ingeniería de tejidos que buscan desarrollar nuevos materiales. En este sentido, los materiales usados se dividen en tres grupos: Polímeros Naturales, Polímeros Sintéticos Biodegradables y Cerámicos.

Los polímeros naturales tales como el colágeno, fibrina, quitosano, alginato, agarosa, entre otros, pueden ser extraídos de plantas, animales o tejido humano. Estos polímeros usualmente exhiben gran biocompatibilidad y baja toxicidad. La principal desventaja es la dificultad del procesamiento y variabilidad de características que existen incluso entre dos mismos lotes de polímeros extraídos y procesados del mismo ser vivo [19], [20].

Por otro lado, se encuentran los polímeros sintéticos tales como el poliestireno, ácido poli-l-láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) y siliconas, por mencionar algunos. Las ventajas principales de estos polímeros es su facilidad de ser sintetizados para fabricar arquitecturas complejas y el conocimiento preciso de sus propiedades químicas y mecánicas las cuales pueden ser variadas (diseñadas) de acuerdo a la necesidad funcional, sin embargo, en general no son considerados biocompatibles [21].

En el caso de los materiales cerámicos, tales como la hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP) tienen poca elasticidad, alta dureza superficial y presentan biocompatibilidad por lo cual son usados para reparación de tejido óseo [21].

### 2.1.6. Esterilidad de los sistemas físicos para cultivo celular

Debido a que los sistemas de microtitulación son usados como soporte para el cultivo celular, estos deben estar libres de microorganismos externos que influyan en el comportamiento celular ocasionando resultados y análisis erróneos. Esta característica se denomina esterilidad [22] y para lograr esta, se hace uso de algún proceso de esterilización dependiendo del material del cual está hecho el dispositivo o el nivel de esterilización que se desea lograr.

## Métodos de esterilización

Existen varios métodos de esterilización los cuales tienen distintos principios de funcionamiento. Los métodos más usados son [23]: por radiación (gamma, rayos X), por aplicación de óxido de etileno (EO), por calor húmedo (vapor), por calor seco, por aplicación de peróxido de hidrógeno y por aplicación de dióxido de nitrógeno. Debido a que se desea una plataforma que sea útil en la mayoría de los laboratorios, es objetivo de esta tesis que el sistema de microtitulación propuesto pueda ser esterilizado mediante el método más común.

En este contexto, el método de calor húmedo es uno de los más usados para dispositivos de uso único y reusables; y se encuentra disponible en clínicas, hospitales, laboratorios, etc. Este método requiere de un ambiente controlado sobre el cual estará inmerso el dispositivo a esterilizar, este ambiente es producido por el sistema de autoclavado y los parámetros controlables son la temperatura (de 105 a 135 °C), presión (4.5 a 313 kPa), humedad relativa (hasta 100 %) y tiempo (entre 3 a 300 minutos). Entre los materiales compatibles con este método (es decir, que no son afectados por el ambiente del sistema de autoclavado) están los elastómeros, metales, cerámicos, líquidos, siliconas y vidrio. Sin embargo dependiendo del tipo de material pueden variar los efectos secundarios luego de que este material sea autoclavado varias veces [23].

## Validación de esterilidad

Para validar que el sistema de microtitulación haya sido esterilizado correctamente existen procedimientos estándar. Estos se pueden clasificar en: los que usan indicadores biológicos o los enmarcados en análisis microbiológicos.

Los métodos que involucran el uso de indicadores biológicos se desarrollan mediante la aplicación sobre el dispositivo, antes de ser esterilizado, de un número establecido de bacterias comerciales resistentes al método usado (por ejemplo, autoclavado). Posteriormente, se cuenta el número de bacterias una vez finalizado este procedimiento para, finalmente, obtener un índice en base logarítmica de estos dos números (antes y después de la esterilización) denominado Sterility Assurance Level - SAL [24].

La otra familia de métodos de validación de esterilidad es la que utiliza el análisis microbiológico. Uno de estos métodos sugiere la elección de una porción del dispositivo esterilizado para después sumergirlo en medio de cultivo, luego de un tiempo igual al tiempo de cultivo estándar, se observa la existencia o no de cambios físicos del medio (turbidez, decoloración, densidad, entre otros). Si el dispositivo ha sido esterilizado correctamente, no debe existir ningún cambio en

este medio. Debido a que este procedimiento es cualitativo, se puede convertir en un procedimiento cuantitativo si se adiciona el paso de conteo de microorganismos que puedan existir en el medio de cultivo [22]. Otro método involucra el hisopado del dispositivo luego de que este sea expuesto al proceso de esterilización. Este hisopo es colocado inmediatamente después en medio de cultivo por un periodo de 48-72 horas para finalmente poner el resultado de esta incubación en placas Petri por otras 48-72 horas. En este caso, se valida cualitativamente si es que se han desarrollado colonias de microorganismos en las placas. Si esto ha sucedido, el material no ha sido esterilizado. Aunque ambos métodos son similares, el medio de cultivo del primero es el medio de cultivo que se necesita para el crecimiento de las células que estarán en contacto con el dispositivo cuando este sea usado para la aplicación deseada. En el segundo caso, el medio de cultivo es un medio de cultivo estándar, caldo de soya.

### **Validación de biocompatibilidad**

Además de evaluar la esterilidad del sistema de microtitulación propuesto, se debe validar que el sistema no tenga efectos tóxicos sobre las células. Para esto existen métodos de evaluación cuantitativa [25] como por ejemplo el ensayo de red neutral (NR, por sus siglas en inglés), el ensayo MTT (por las siglas del compuesto usado) y el CVS (crystal violet staining).

Los ensayos mencionados anteriormente se basan en obtener por colorimetría el número de células que tienen actividad, es decir que están vivas y así calcular la viabilidad celular. Entre estos ensayos el ensayo MTT [26] es el más usado comprendiendo el uso del análisis de colorimetría mediante espectrofotometría y midiendo la absorbancia del ensayo sobre la absorbancia de un ensayo de control, obteniendo el % de viabilidad celular [27].

## **2.2. Mecanobiología Celular**

En esta sección se presentan conceptos que resaltan la importancia de la mecánica biológica como generador de diferentes comportamientos celulares. Explicando, además, que la existencia de estos comportamientos depende de los factores externos pertenecientes a las interacciones entre las células y el andamiaje y la interacción intercelular.

### 2.2.1. Excitaciones mecánicas en sistemas biológicos

Se sabe que los sistemas biológicos se encuentran naturalmente bajo excitaciones mecánicas las cuales son ejercidas por los mismos sistemas biológicos o ejercidas por el entorno al cual pertenecen. Un ejemplo es la gravedad, todos los seres vivos están sujetos al campo gravitacional; otros ejemplos son los músculos, ya que ejercen fuerzas sobre los huesos para lograr rotaciones en las articulaciones a través de los tendones; también se ha identificado que la pared interna de los vasos sanguíneos está bajo la influencia de elongaciones y esfuerzos cortantes causados por el flujo sanguíneo [28] o que el tejido epitelial interno del ducto gastrointestinal está bajo esfuerzos cortantes debido al transporte del bolo alimenticio y deformaciones longitudinales debido a los movimientos peristálticos [29] o como las cargas mecánicas inclusive influyen desde la etapa de desarrollo del ducto gastrointestinal en el embrión [30].

A nivel celular las excitaciones mecánicas ejercidas sobre las células originan cambios en la estructura, composición y función incluyendo síntesis de proteínas, crecimiento celular, diferenciación y muerte. En este sentido, la mecanobiología es el campo de investigación que estudia la relación entre estas respuestas biológicas y las excitaciones mecánicas [31].

#### Mecanotransducción

Antes de presentar el concepto básico del mecanismo de mecanotransducción, es necesario recordar algunos conceptos que se presentarán a continuación.

De forma general podemos decir que todas las células están compuestas de la membrana celular, citoplasma, núcleo y otros componentes celulares. Adicionalmente, el citoplasma contiene el citoesqueleto y varios organelos (núcleo, ribosomas, retículo endoplásmico y mitocondria). Una forma de identificar a las células es en base a sus características (fenotipo), las cuales están determinadas por la naturaleza de las proteínas componentes.

También se sabe que las células se localizan dimensionalmente dentro de la Matriz Extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), la cual está compuesta de proteínas funcionales: colágeno, glicoproteínas y elastina. Teniendo al colágeno como componente principal [32]. La ECM es dinámica y no solo sirve como soporte sino también como canal de comunicación entre células para el crecimiento y diferenciación [33], tal como se mencionó anteriormente.

Con estos conceptos básicos es posible explicar el fenómeno de la mecanotransducción. Este está relacionado a los mecanismos que convierten una señal

física en una señal biológica y al canal de comunicación entre las células y la ECM en donde ocurren estos [35]. El canal tiene como componente principal a la integrina, la cual cumple la función de traducir una señal física en química [34]. Estas integrinas pueden ser de varios tipos, las cuales tienen receptores de acuerdo a la proteína perteneciente a otra célula o a la ECM a la que podrá enlazarse.

Las señales físicas pueden ser deformaciones, fuerzas o propiedades mecánicas [36] que se generan en la ECM, las cuales son transmitidas hacia las células generando cambios en concentraciones de compuestos químicos dentro de estas. Otra señal física que también se debe tener en consideración es la topografía de la ECM, la cual también influye en el comportamiento celular [37], [38], [39], [40], [41].

### 2.2.2. Movimientos físicos de los tejidos

Como se mencionó anteriormente, los sistemas biológicos se ven afectados por excitaciones mecánicas, siendo estas excitaciones uno de los componentes que influyen en el crecimiento, diferenciación y apoptosis de las células de los tejidos. Las excitaciones se pueden dividir en tres: Elongaciones, esfuerzos de tracción y esfuerzos cortantes. Naturalmente, las elongaciones y los esfuerzos de tracción coexisten, debido a que tienen una relación bidireccional de causa y efecto. Investigaciones han propuesto desde modelamientos matemáticos que permiten predecir el comportamiento mecánico de los tejidos hasta técnicas de medición de las excitaciones mecánicas *in vivo*. En la siguiente tabla (ver Tabla 2.2) se muestran algunos valores de elongaciones, así como la frecuencia con que estas elongaciones son observadas.

TABLA 2.2: Valores de elongación reportados en diferentes tejidos excitables.

Tejido	% Máxima Elongación	Frecuencia
Tejido cardiaco (Ventrículo Izquierdo) Humanos	20 % [42]	1-1.6 Hz latidos por minuto
Tejido de Alveolo Pulmonar (Animales)	9-30 % [43]	0.2-0.3 Hz frecuencia respiratoria
Piel Humana	30 % [44]	–
Ducto Gastrointestinal	20 % [29]	7-12 Hz

Aunque se espera encontrar valores más precisos de las magnitudes de los componentes dinámicos de estos movimientos, todavía se desconoce a profundidad el mecanismo de acción o respuesta de las células debido a estos, aunque ya hay avances en ese sentido basados en estimaciones [45].



## Capítulo 3

# Estado del Arte

De lo presentado en el capítulo anterior, la mecanotransducción juega un rol importante en el comportamiento celular, que incluye desde la proliferación hasta la apoptosis. A la actualidad, las investigaciones en este campo proponen diferentes sistemas, usualmente conocidos como Lab-on-a-Chip, que generan excitaciones mecánicas sobre las células usando diferentes principios de funcionamiento o accionamiento. Estas excitaciones mecánicas se clasifican, en base a su variación temporal, en dos: modulación mecánica pasiva y modulación mecánica activa.

### 3.1. Modulación Mecánica Pasiva

La modulación mecánica pasiva se relaciona con el diseño y fabricación de andamiajes con propiedades específicas de acuerdo a las necesidades del estudio. Estas propiedades pueden ser: mecánicas, tales como el módulo de elasticidad, o geométricas, como por ejemplo, la topografía de la superficie de adherencia celular. Para esto, existen diversos métodos los cuales serán mencionados a continuación.

Los métodos usados para modificar las propiedades mecánicas del andamiaje son: la síntesis polimérica y la elección de los polímeros adecuados con el fin de obtener propiedades globales controladas [46], [47] (ver Fig. 3.1), o mediante la inclusión de nanomateriales para lograr la controlabilidad de estas propiedades a escala micrométrica [48].

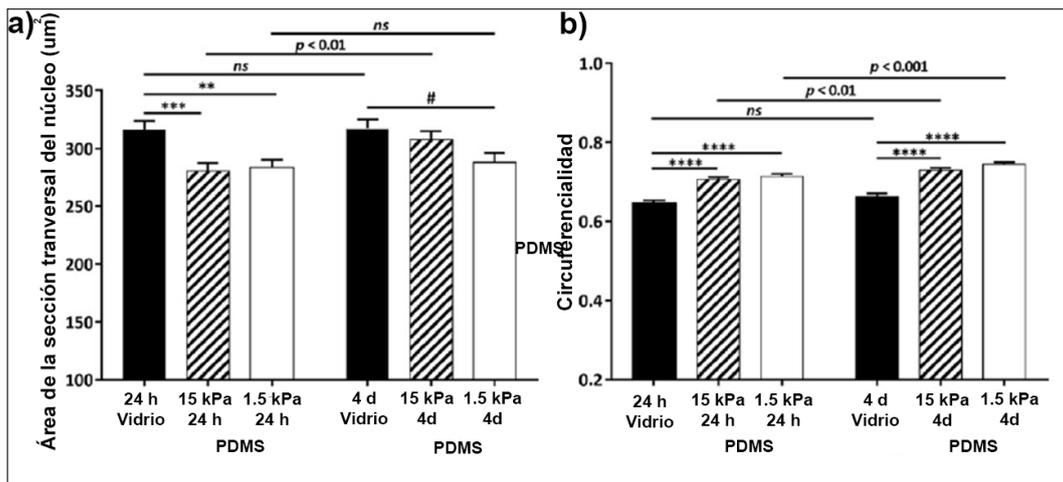


FIGURA 3.1: Efecto del módulo de elasticidad del soporte físico sobre a) el área y b) la circunferencialidad, del núcleo celular de células madre mesenquimales. Adaptado de [47]

Para la modificación de la topografía de los andamiajes celulares se usan técnicas de microfabricación las cuales, en síntesis, se basan en el uso de moldes de PDMS. En este sentido, por ejemplo se tiene el caso de investigaciones que desarrollan microestructuras en formas de vellosidades con el fin de aproximarse a la topografía fisiológica del ductor gastrointestinal [49], [50] (ver Fig. 3.2). Esto debido a que las microvellosidades son importantes, desde un punto de vista fisiológico, ya que aumentan el área de absorción de nutrientes a lo largo de todo el intestino, aumentando su eficiencia. En otras investigaciones, se estudia la mejora de la migración celular debido al direccionamiento de los andamios en forma unidimensional [51] y, también, la creación de compartimentos en los andamiajes para desarrollar cultivos tridimensionales [52].

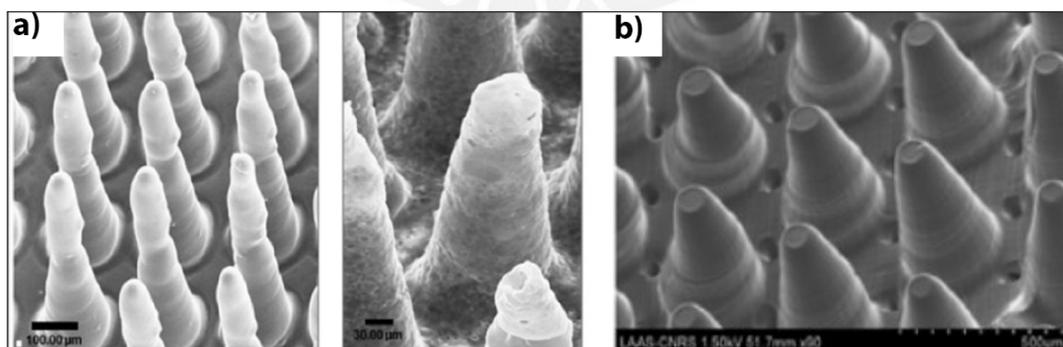


FIGURA 3.2: a) Imágenes SEM de andamiajes de PLGA. Adaptado de Costello et al, 2014 [49]. b) Imágenes SEM de andamiajes usando estereolitografía de alta resolución. Adaptado de Creff et al, 2019 [50].

## 3.2. Modulaci3n Mecánica Activa

Las modulaciones mecánicas activas se refieren a variaciones en el campo mecánico de esfuerzos y deformaciones que se generan indirectamente en las células mediante excitaciones mecánicas temporales desarrolladas en los andamiajes. Las dos excitaciones mecánicas encontradas en la literatura son los esfuerzos cortantes producidos por flujos sobre las células y las elongaciones.

En el caso de la generaci3n de esfuerzos cortantes sobre las células, estos son causados por flujos que entran en contacto con la superficie del cultivo expuesta al fluido. Para ello, en la literatura existen investigaciones basadas en el uso de la mini/microfluídica para generar estos campos de esfuerzos. Dos de los trabajos relevantes para la investigaci3n presentada en este documento son el de Kim et al, 2012 [53] y Costello et al, 2017 [54] (ver Fig. 3.3) en los cuales se usa un sistema de generaci3n de flujos y una sola superficie de cultivo plana rectangular.

En este mismo sentido, se pueden encontrar otras investigaciones como la desarrollada por Sinha et al, 2015 [55] y Shah et al, 2016 [56] las cuales se basan en el mismo principio de generaci3n de esfuerzos mediante flujos.

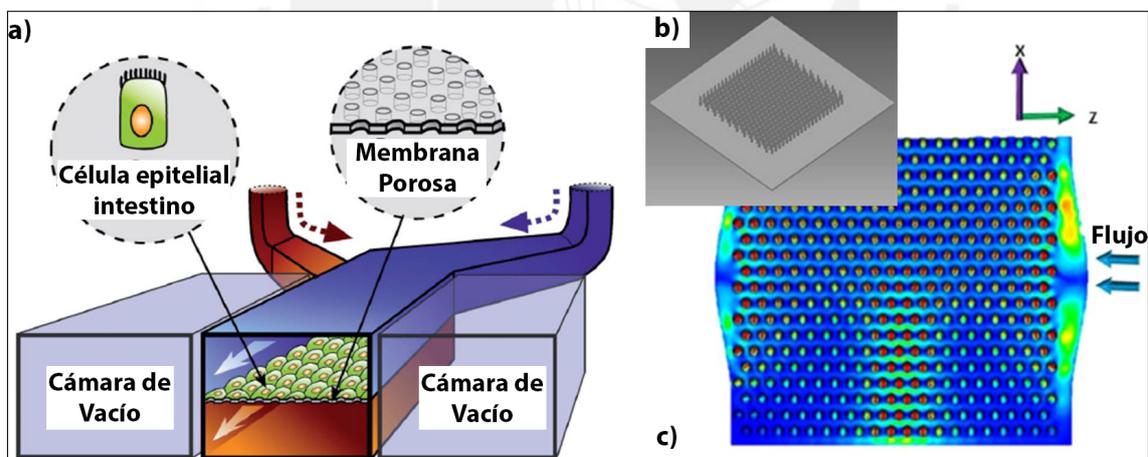


FIGURA 3.3: Investigaciones relacionados a la generaci3n de esfuerzos cortantes como consecuencia de los flujos sobre la superficie celular a) Adaptado de Kim et al, 2012 [53], b) Diseño de andamiaje, adaptado de Costello et al, 2017 [54] y c) Simulaci3n de esfuerzos cortantes, adaptado de Costello et al, 2017 [54].

En relaci3n a la generaci3n de elongaciones o esfuerzos en tracci3n en las células de cultivo, Kamble et al, 2016 [57] presenta un artículo de revisi3n de los accionamientos usados para producir estos. Se explica el accionamiento neumático, por ejemplo, usando el trabajo de Huh et al, 2010 [58], el accionamiento piezoelectrónico en Deguchi et al, 2015 [59], entre otros; para posteriormente concluir

que el accionamiento neumático brinda grandes ventajas, tales como el diseño relativamente sencillo y generación indirecta de las elongaciones requeridas.

Entre las investigaciones que proponen plataformas de cultivo con accionamientos mecánicos que indirectamente generen elongaciones en las células para controlar su crecimiento se tiene el dispositivo ampliamente usado y desarrollado por Huh et al, 2010 [58], adaptado por Kim et al, 2012 [53] (ver Fig. 3.3), Kreutzer et al, 2014 [60], Kasendra et al, 2018 [61] entre otros. El diseño de Huh et al, 2010 [58] propone el uso de esta plataforma para imitar la biomecánica del alveolo pulmonar usando microfabricación, Kim et al, 2012 [53] y Kasendra et al, 2018 [61] la usan para imitar la biomecánica de las células del intestino y Kreutzer et al, 2014 [60] para la diferenciación de células cardíacas. Además de esto, se realizó el análisis por elementos finitos y teoría mecánica del diseño de este dispositivo en Zhao et al, 2014 [62] para caracterizar el comportamiento de elongaciones en base a la excitación mecánica.

Existen también sistemas comerciales que producen estos campos mecánicos externos a las células. Por ejemplo, se tiene el sistema FlexCell® [63] que es usado en las investigaciones realizadas por Dhein et al, 2014 [64] y por Saito et al, 2020 [65] o la plataforma comercial llamada Stretch System STB-150 [66] (ver Fig. 3.4).

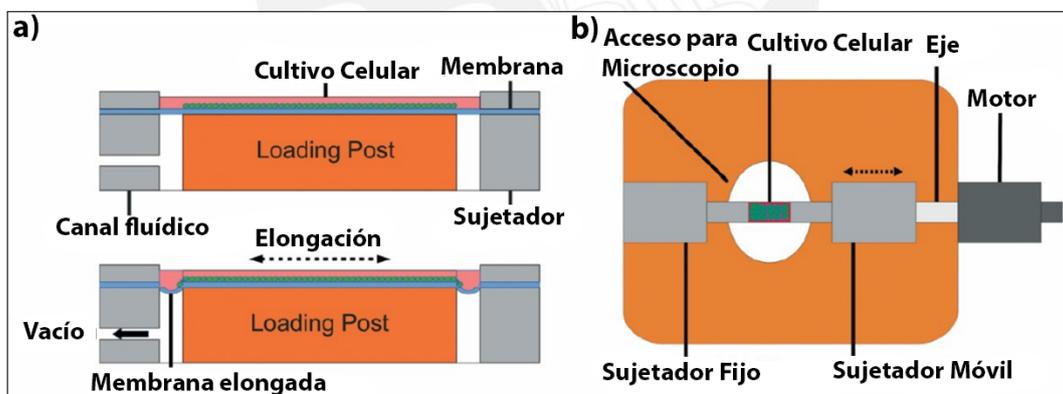


FIGURA 3.4: Plataformas comerciales que generan elongaciones en los andamios celulares. a) Stage Flexer (Flexcell International Corp, USA) [63] and b) Stretch System STB-150 (STERX Inc., USA) [66]. Adaptado de Kamble et al, 2016 [57].

De la literatura revisada por el autor, la mayoría de los dispositivos desarrollados en los laboratorios (presentados en publicaciones científicas) tienen características que solo permiten su fabricación y uso en los lugares de autoría, debido a sus dimensiones no estándares comparados con las plataformas de cultivo comerciales presentadas en la Fig. 3.4. Por lo que existe una necesidad de desarrollo de plataformas compatibles con estas dimensiones estándar. Por

otro lado, todavía no se han desarrollado plataformas que logren controlar de manera uniforme el campo mecánico generado en cada superficie independiente de cultivo celular, lo cual se puede validar por los estudios realizados en Matheson et al, 2006 [67], Zhao et al, 2014 [62] y Gilbert et al, 1994 [68] en los campos de elongación (al generar mayores elongaciones en la periferia y menores en la region central) y por Kreutzer et al, 2020 [60] en relación a esfuerzos cortantes. Esta homogeneidad es necesaria para la mejora del análisis bioquímico de la influencia de estas modulaciones sobre el comportamiento celular. Para lograr esta homogeneidad, hasta el conocimiento del autor, existe una investigación [69] de diseño de una plataforma de cultivo celular, sin embargo no logra integrar la homogenización de los esfuerzos cortantes y elongaciones en un sistema compatible con los sistemas de microtitulación comerciales.

Por lo tanto, el presente proyecto de tesis, propone un sistema que genera elongaciones y esfuerzos cortantes homogéneos en la máxima área de la región de interés de la superficie de cultivo celular y con el dimensionamiento externo que permita un acople o integración física con los sistemas de microtitulación comerciales. Este diseño se obtiene mediante el uso de herramientas de cálculo computacional, se presentan verificaciones del aumento del área homogénea, además de validaciones de esterilidad y funcionalidad del dispositivo mediante el análisis de viabilidad celular usando una línea celular comercial.

## Capítulo 4

# Objetivos e Hipótesis

### 4.1. Objetivos

#### 4.1.1. Objetivo general

- Diseñar e implementar una plataforma elástica de microtitulación que genera esfuerzos cortantes y elongaciones homogéneas para cultivo de células bidimensionales

#### 4.1.2. Objetivos específicos

- Diseñar una plataforma de microtitulación que genera esfuerzos cortantes y elongaciones homogéneas en las superficies de cultivo mediante optimización computacional.
- Fabricar la plataforma de microtitulación propuesta mediante fabricación digital.
- Verificar la homogeneidad del campo mecánico generado en la superficie de cultivo de la plataforma propuesta.
- Verificar la capacidad de la plataforma propuesta de ser esterilizable.
- Validar la funcionalidad del sistema mediante el cultivo de una línea celular comercial.

## 4.2. Hipótesis

### 4.2.1. Hipótesis general

- Es factible el diseño e implementación de una plataforma de microtitulación elástica que genera esfuerzos cortantes y elongaciones homogéneas para cultivo de células bidimensionales

### 4.2.2. Hipótesis específicas

- Es posible diseñar una plataforma de microtitulación elástica usando herramientas de optimización computacional para lograr esfuerzos cortantes y elongaciones homogéneas.
- Es factible construir una plataforma de microtitulación elástica, que genere esfuerzos cortantes y elongaciones homogéneas, mediante fabricación digital.
- Es factible medir los campos mecánicos homogéneos de elongaciones y esfuerzos cortantes en las superficies de cultivo celular de la plataforma propuesta.
- Es posible esterilizar la plataforma de microtitulación propuesta.
- La plataforma de microtitulación es funcionalmente válida cuando se usa una línea celular comercial no adherente.

## Capítulo 5

# Metodología

Para cumplir los objetivos de esta tesis, en este capítulo se presentan los procedimientos seguidos para el diseño, verificación y validación de la plataforma propuesta.

Para lograr el diseño óptimo se tienen cuatro etapas principales: La etapa de identificación de los requerimientos de diseño, el desarrollo y ejecución de una metodología de diseño, la identificación de las características del proceso de manufactura elegido y el diseño y optimización de la plataforma con el objetivo de obtener las excitaciones homogéneas sobre la superficie de cultivo celular. En el sentido de la metodología de diseño se sigue la sugerida por la norma VDI 2225. El primer paso de esta se refiere a la definición de las entradas y salidas del sistema, luego se especifican las funciones que el dispositivo propuesto debe cumplir. Seguidamente, se definen las matrices morfológicas que detallan las opciones correspondientes a cada función, se presentan las matrices de evaluación de conceptos y los proyectos preliminares; para finalmente definir el proyecto óptimo.

En otro sentido, la etapa de verificación comprende la evaluación de la resistencia térmica del material elegido, la caracterización y análisis de las excitaciones generadas sobre la superficie de cultivo celular y la comprobación de la esterilidad de los componentes propuestos. Y como último punto, la validación comprende el análisis de la influencia química y geométrica de la plataforma propuesta sobre el comportamiento de un tipo de línea celular comercial.

## 5.1. Diseño

### 5.1.1. Requerimientos de diseño

Para desarrollar el diseño de la plataforma, se identificaron los siguientes requerimientos iniciales:

- Dimensiones externas estándares para acoplamiento con sistemas de microtitulación disponibles comercialmente y manipulación conjunta. Debido a que el proyecto de investigación se basa en el diseño de un sistema de microtitulación capaz de generar excitaciones mecánicas homogéneas, las dimensiones que se respetarán son aquellas que cumplan con los siguientes requisitos: el diseño debe ser tan manipulable como los sistemas comercialmente disponibles e integrarse al arreglo en columna de estos (arreglo muy común en almacenamiento de laboratorios).
- Sistemas de microtitulación modulares: Se requiere que algunas de las superficies de cultivo estén influenciadas por las mismas excitaciones mecánicas; debido a que, existe la necesidad de realizar ensayos independientes (como mínimo 3) bajo las mismas condiciones controladas.
- Sistemas de microtitulación cuya fabricación pueda ser realizada en laboratorios con acceso a, al menos, equipos de fabricación digital aditiva de escritorio.
- Estas plataformas requieren ser esterilizables por lo menos una vez sin perder sus propiedades mecánicas ni composición química. Esto debido a que las plataformas serán usadas para el crecimiento celular, cuyos procedimientos requieren superficies de cultivo estériles.
- Modulaciones superficiales simulando el ambiente mecánico de crecimiento celular *in vivo*: En el estado del arte se ha validado que la mecanobiología celular influye en la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis celular [70], [71].

### 5.1.2. Abstracción de ideas y definición de funciones

Luego de la identificación de los requerimientos iniciales, se definen las entradas y salidas del sistema (ver Fig. 5.1) teniendo en cuenta que el dispositivo generará excitaciones mecánicas en la superficie de cultivo celular.

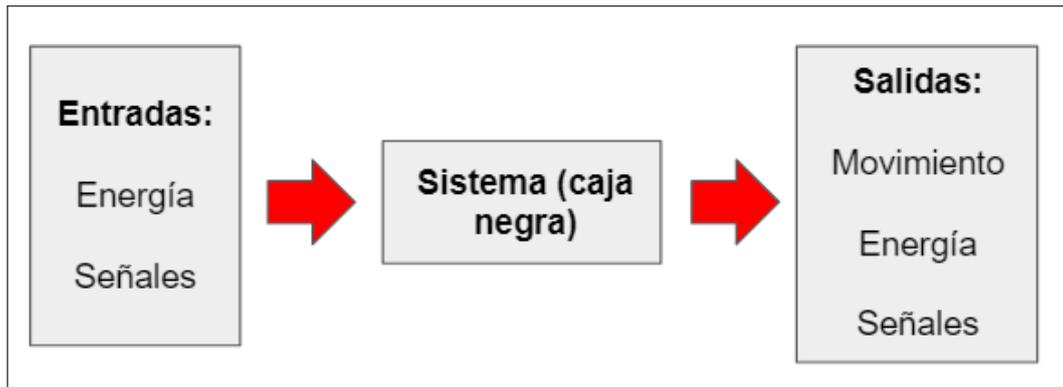


FIGURA 5.1: Entradas y Salidas generales del sistema a diseñar.

### Entradas

- **Energía:** Se refiere a la energía que usará el sistema para realizar el movimiento deseado. Como por ejemplo: Energía eléctrica o térmica.
- **Señales:** Se refiere a la información electrónica (analógica o digital) que se utiliza para la comunicación entre los diferentes elementos del sistema: actuadores, elementos de sensado y la unidad de control.

### Salidas

- **Movimiento:** Se utilizará para generar elongaciones en la superficie de cultivo celular. Este puede ser generado por: Cambio de posición o deformación que experimentará algún componente del sistema.
- **Esfuerzos Cortantes:** Se refiere a la generación de fuerzas cortantes sobre las superficies celulares que no están en contacto o adheridas al andamiaje.
- **Energía: Energía Residual:** Es el ruido o calor generado por el sistema.
- **Señales:** Es la información electrónica que circulará a través del sistema y que podrá ser utilizada desde este hacia otro sistema externo.

Debido a que el sistema planteado conlleva la generación de dos estímulos mecánicos: Elongaciones y Esfuerzos Cortantes, a continuación en la Fig. 5.2 se presenta el diagrama de flujos del sistema propuesto. Esto servirá para detallar y separar las entradas, salidas y funciones para la generación de cada estímulo mecánico.

En la Fig. 5.2 se muestran las señales provenientes del controlador  $s_1$  y  $s_2$  que están relacionados con la función de elongar y de generar esfuerzos cortantes,

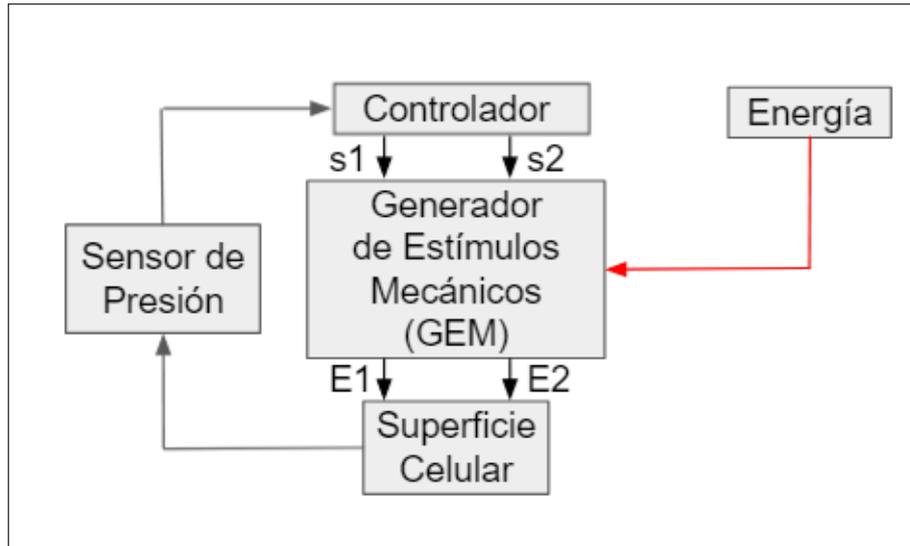


FIGURA 5.2: Diagrama general del sistema propuesto en donde se observan las señales de los dos estímulos mecánicos.  $s_1$  y  $s_2$  son las señales de control para elongar y generar esfuerzos cortantes respectivamente. Por otro lado,  $E_1$  y  $E_2$  son las señales mecánicas que actúan sobre la superficie celular.

respectivamente. Por otro lado, las salidas  $E_1$  y  $E_2$  corresponden a los estímulos mecánicos aplicados sobre la superficie celular.  $E_1$  es la elongación y  $E_2$  son los esfuerzos cortantes.

Debido a la independencia de estos dos estímulos mecánicos, se procede a separar las funciones del sistema en dos grupos, en el que cada uno de estos se relaciona con un estímulo mecánico.

### Funciones para el estímulo mecánico de elongación

Luego de definir las entradas y salidas, se procede a desarrollar el detalle de las funciones que transforman las primeras en las segundas con el fin de generar el estímulo mecánico de las elongaciones. Estas funciones están representadas en la Fig. 5.3.

- Transformar: Esto permitirá convertir la energía proveniente del exterior del sistema en movimiento.
- Accionar: Esto permitirá la apertura o cierre del flujo de energía a lo largo del sistema.
- Elongar: Esto permitirá generar elongaciones en las células.
- Configurar: Esto permitirá configurar las magnitudes de las elongaciones en las células. Esto depende del tipo de célula y del estudio deseado.

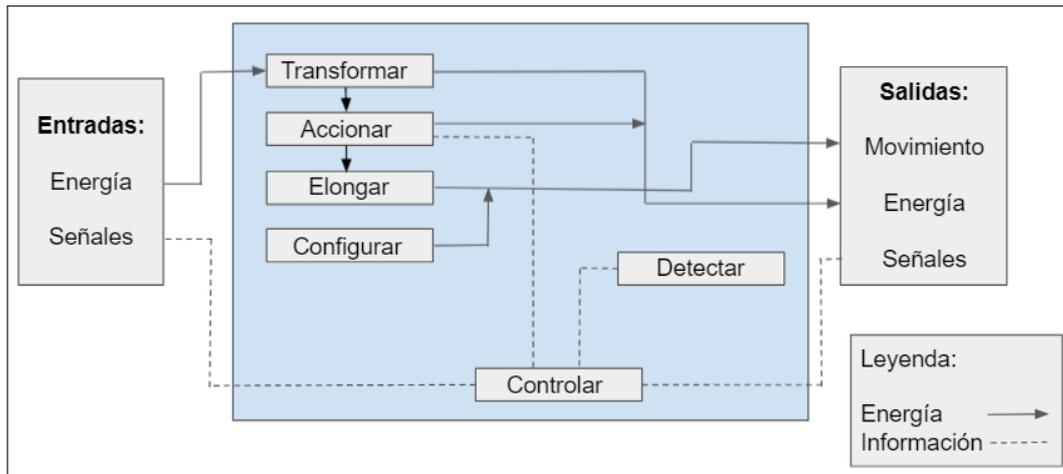


FIGURA 5.3: Estructura de las funciones para la parte del sistema que genera elongaciones en la superficie de cultivo celular.

- Detectar: Esto permitirá medir las variables físicas que ayudan a asegurar la precisión del sistema.
- Controlar: Es realizado por la unidad de control principal procesando señales de entrada y salida al sistema.

### Matriz morfológica para el estímulo mecánico de elongación

Tomando como base la estructura de funciones para la parte del sistema que genera el estímulo mecánico de elongación, se desarrolló la matriz morfológica (ver Fig. 5.4). Para cada función se presentan como máximo 4 opciones diferentes.

### Definición del concepto de solución para el estímulo mecánico de elongación

Con la matriz morfológica se procedió a definir los Conceptos de Solución C.S. teniendo en cuenta las diferentes opciones presentadas y buscando la mayor variabilidad de conceptos posibles.

Con los C.S. ya definidos, se evaluaron numéricamente cada uno de estos en función a criterios técnicos y económicos (ver Tabla 5.1). Se siguió la norma VDI 2225: 0 = No satisface, 1 = Aceptable, 2 = Suficiente, 3 = Bien y 4 = Muy bien (Ideal).

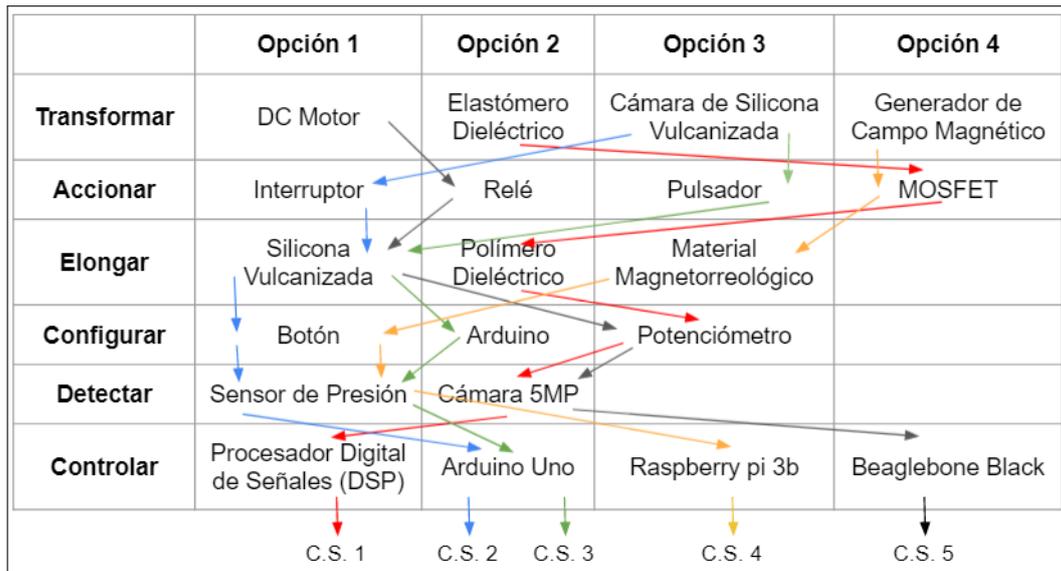


FIGURA 5.4: Matriz morfológica del subsistema que genera estímulos mecánicos de elongación.

TABLA 5.1: Tabla de evaluación de conceptos de solución de la parte del sistema que genera estímulos mecánicos de elongación. C.S. Concepto de Solución.

Nro	Criterios Técnicos y Económicos	C.S. 1	C.S. 2	C.S. 3	C.S. 4	C.S. 5
1	Facilidad de Ensamblaje	1	3	3	1	2
2	Costo de Tecnología	2	3	3	1	3
3	Costo de Operación	1	2	2	1	3
4	Seguridad	1	3	3	1	2
5	Estabilidad	1	2	2	1	3
6	Posibilidad de Automatización	2	2	2	1	2
7	Facilidad de Manejo	1	2	3	1	2
8	Peso	2	3	3	3	1
9	Disponibilidad de Repuestos	1	3	3	1	3
10	Tamaño	2	2	2	2	1
	<b>Suma Total</b>	14	25	<b>26</b>	13	22

### Funciones para el estímulo mecánico de esfuerzos cortantes

Análogamente al caso de la parte del sistema que genera estímulos mecánicos de elongación, se detallan las funciones correspondientes para convertir las

entradas del sistema en salidas y así generar esfuerzos cortantes. Estas funciones están representadas en la Fig. 5.5.

- **Transformar:** Esto permitirá convertir la energía proveniente del exterior del sistema en movimiento.
- **Accionar:** Esto permitirá la apertura o cierre del flujo de energía a lo largo del sistema.
- **Fluir:** Esto permitirá generar los esfuerzos cortantes en la superficie celular.
- **Configurar:** Esto permitirá configurar las magnitudes de los esfuerzos cortantes en las células. Esto depende del tipo de célula.
- **Controlar:** Es realizado por la unidad de control principal procesando señales de entrada y salidas al sistema.

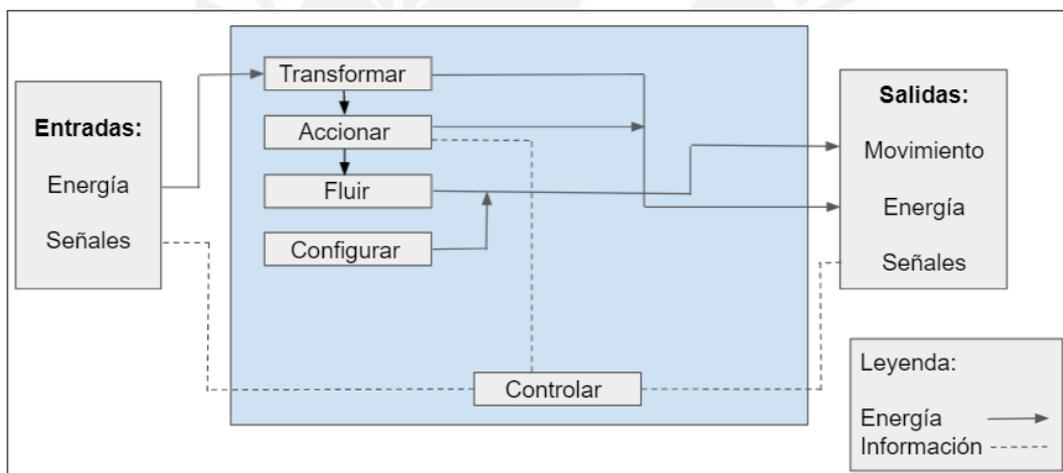


FIGURA 5.5: Estructura de las funciones para la parte del sistema que genera esfuerzos cortantes en la superficie de cultivo celular.

### Matriz morfológica para el estímulo mecánico de esfuerzos cortantes

Tomando como base la estructura de funciones para la parte del sistema que genera el estímulo mecánico de esfuerzos cortantes, se desarrolló la matriz morfológica (ver Fig. 5.6). Para cada función se presentan como máximo cuatro opciones diferentes.

	Opción 1	Opción 2	Opción 3	Opción 4
<b>Transformar</b>	Bomba Peristáltica	Bomba Motor DC	-	-
<b>Accionar</b>	Interruptor	Relé	Pulsador	MOSFET
<b>Fluir</b>	Ducto	Canal	-	-
<b>Configurar</b>	Botón	Programación	Potenciómetro	
<b>Controlar</b>	Procesador Digital de Señales (DSP)	Arduino Uno	Raspberry pi 3b	Beaglebone Black
	C.S. 1	C.S. 2	C.S. 3	C.S. 4

FIGURA 5.6: Matriz morfológica de la parte del sistema que genera estímulos mecánicos de esfuerzos cortantes.

### Definición del concepto de solución para el estímulo mecánico de esfuerzos cortantes

Con la matriz morfológica se procedió a definir los Conceptos de Solución C.S., teniendo en cuenta las diferentes opciones presentadas y buscando la mayor variabilidad de conceptos.

Con los C.S. ya definidos, se evaluaron numéricamente cada uno de estos en función a criterios técnicos y económicos (ver Tabla 5.2). Se siguió la norma VDI 2225: 0 = No satisface, 1 = Aceptable, 2 = Suficiente, 3 = Bien y 4 = Muy bien (Ideal).

### 5.1.3. Diseño preliminar

Luego de obtener el concepto de solución óptimo, se procede a profundizar en el detalle de este. En primer lugar se presentará el Procedimiento de Usuario y luego el Procedimiento de Funcionamiento.

#### Procedimiento del usuario

Dependiendo del estímulo mecánico requerido, se usará el sistema correspondiente:

Para el caso de elongaciones:

- Se coloca el sistema dentro de la cabina de flujo laminar.
- Se enciende el sistema de presurización.

TABLA 5.2: Tabla de evaluación de conceptos de solución de la parte del sistema que genera estímulos mecánicos de elongación. C.S. Concepto de Solución. C.S.: Conceptos de Solución.

Nro	Criterios Técnicos y económicos	C.S. 1	C.S. 2	C.S. 3	C.S. 4	C.S. 5
1	Facilidad de Ensamblaje	2	2	2	1	1
2	Costo de Tecnología	2	2	3	1	1
3	Costo de Operación	1	1	2	1	1
4	Seguridad	0	2	2	0	2
5	Estabilidad	0	2	2	0	2
6	Posibilidad de Automatización	2	2	2	1	1
7	Facilidad de Manejo	1	2	2	1	1
8	Peso	2	2	3	3	3
9	Disponibilidad de Repuestos	2	2	3	2	2
10	Tamaño	2	2	2	2	2
	<b>Suma Total</b>	14	19	<b>23</b>	12	16

- Se configura manualmente la magnitud de elongación deseada.

Para el caso de esfuerzos cortantes:

- Se coloca el sistema dentro de la cabina de flujo laminar.
- Se enciende el sistema de generación de flujo (el fluido usado es medio de cultivo).
- Se configura manualmente la magnitud del flujo.

### Procedimiento de funcionamiento

Dependiendo del estímulo mecánico requerido, se usará el sistema correspondiente:

Para el caso de elongaciones:

- La magnitud de elongación será almacenada en el Arduino.
- El Arduino, controla, mediante señales analógicas bombas de presurización.

- Las bombas de presurización, actúan sobre las cámaras y consecuentemente en la membrana donde se ubica el cultivo celular.

Para el caso de esfuerzos cortantes:

- La magnitud del flujo será configurada manualmente en la bomba peristáltica.
- La bomba peristáltica, genera el flujo que es transportado mediante tubos hacia la plataforma.
- Debido al diseño de la plataforma, este flujo genera esfuerzos cortantes sobre la superficie del cultivo celular.

### Diseño preliminar

Debido a que ya se tiene seleccionado el Concepto de Solución Óptimo para cada excitación mecánica requerida, es decir: elongación y esfuerzo cortante; se prosigue con el desarrollo de Diseños Preliminares que están enmarcados en este Concepto de Solución Óptimo con un enfoque más detallado en los componentes físicos de la plataforma a proponer. Estos diseños preliminares se muestran en la Tabla 5.3, en donde se observa que cada fila corresponde a un componente del sistema de microtitulación y cada columna a una posible solución disponible. En la Tabla 5.4, se muestra la Evaluación Técnico Económica de los Diseños Preliminares indicando que el Diseño Preliminar 3 es el óptimo y se usará para obtener el sistema de microtitulación con el diseño geométrico optimizado que permita generar excitaciones mecánicas homogéneas.

TABLA 5.3: Diseños Preliminares teniendo como base el Concepto de Solución Óptimo. D.P.: Diseño Preliminar.

	<b>D.P. 1</b>	<b>D.P. 2</b>	<b>D.P. 3</b>
<b>Base</b>	Acero Inoxidable	Silicona	VeroClear
<b>Sistema de</b>	Estructura de Silicona	Estructura de Silicona	Estructura de Silicona
<b>Tapa</b>	Comercial	Comercial	Tapa diseñada con perfil optimizado
<b>Cámara de Presurización</b>	Membrana Optimizada	Membrana Optimizada	Membrana Optimizada
<b>Fluídica</b>	Canales Internos	Canales Internos	Canales Internos
<b>Procesador</b>	Arduino Mega	Arduino Mega	Arduino Mega
<b>Sensores</b>	De presión	De presión	De presión

TABLA 5.4: Evaluación Técnica y Económica de los Diseños Preliminares planteados en la Tabla 5.3. D.P.: Diseño Preliminar.

<b>Nro</b>	<b>Criterios Técnicos y económicos</b>	<b>D.P. 1</b>	<b>D.P. 2</b>	<b>D.P. 3</b>
<b>1</b>	<b>Facilidad de Ensamblaje</b>	2	2	2
<b>2</b>	<b>Costo de Tecnología</b>	1	2	2
<b>3</b>	<b>Costo de Operación</b>	1	1	1
<b>4</b>	<b>Seguridad</b>	1	0	2
<b>5</b>	<b>Estabilidad</b>	2	0	2
<b>6</b>	<b>Posibilidad de Automatización</b>	2	2	2
<b>7</b>	<b>Facilidad de Manejo</b>	1	2	3
<b>8</b>	<b>Peso</b>	1	2	2
<b>9</b>	<b>Disponibilidad de Repuestos</b>	1	2	3
<b>10</b>	<b>Tamaño</b>	1	2	2
	<b>Suma Total</b>	13	15	<b>21</b>

#### 5.1.4. Principios de accionamiento

Luego de identificar los requerimientos de diseño y desarrollar la metodología presentada líneas arriba, se ha obtenido un Proyecto Óptimo (Diseño Preliminar 3). Entonces, se procede a seleccionar la tecnología base mediante la cual sea posible cumplir con los requerimientos mencionados. A continuación, se explican las técnicas de accionamiento elegidas:

##### **Accionamiento mecánico mediante presurización de la superficie del sistema de microtitulación para generar elongaciones**

Como se explicó en el capítulo anterior, existen varios tipos de accionamiento que pueden generar un campo de elongaciones de la matriz extracelular e indirectamente un campo de elongaciones en las células bajo análisis. Sin embargo, para este proyecto de tesis se ha elegido el accionamiento neumático debido al, relativamente, sencillo diseño necesitado, es decir, la implementación no requiere el uso de técnicas de fabricación digital avanzada, y a la no necesidad de contacto directo entre el medio o células y el fluido presurizado a utilizar [57].

### **Accionamiento mecánico mediante flujos que generen esfuerzos cortantes en la superficie celular**

La generación de esfuerzos cortantes sobre las superficies de cultivo debe ser realizada de tal forma que no necesite de un contacto directo entre esta y un sólido. Por lo tanto, se usará la generación de flujos como principio de accionamiento. En este sentido, el diseño geométrico del sistema de microtitulación propuesto debe ser capaz de definir un volumen por el cual se desarrolle un flujo que genere esfuerzos cortantes sobre la superficie de cultivo. El fluido usado para la generación de estos esfuerzos será el medio de cultivo requerido para el crecimiento celular, aunque para esta tesis se verificará el funcionamiento con agua destilada y desionizada.

#### **5.1.5. Materiales**

Los materiales de la plataforma propuesta deben soportar el proceso de esterilización más empleado en los laboratorios, este proceso de esterilización es el autoclavado. Según la norma AAMI TIR17, 2017 [23], los elastómeros de silicona son uno de los materiales compatibles con este proceso, además, debido a que el sistema debe tener poca resistencia a la deformación para aumentar la eficiencia energética del sistema, este material se convierte en el más apto para el propósito de la investigación.

Entre los elastómeros más usados se encuentran el Sylgard 184 y la familia comercial de las siliconas Vulcanizadas a Temperatura Ambiente (RTV, por sus siglas en inglés) de grado alimenticio. Las pruebas iniciales serán realizadas usando la silicona RTV1500 y el prototipo final se fabricará con el Sylgard 184, debido al mayor costo de este último.

#### **5.1.6. Proceso de manufactura**

Para fabricar los componentes de la plataforma propuesta, los cuales tienen al elastómero de silicona como su componente principal, se emplearán los procesos de mezcla, aplicación de vacío y curado del polímero. A continuación se presenta a detalle este procedimiento:

- Se calcula la cantidad de masa necesaria para fabricar el componente deseado.

- Dependiendo del tipo de elastómero de silicona, se realiza una mezcla mecánica de sus componentes en las proporciones en masa dadas por el fabricante. Usualmente el producto de la silicona viene en dos componentes: los monómeros y el agente polimerizador.
- Luego, la mezcla se somete al proceso de extracción de burbujas mediante la aplicación de vacío.
- Completada la extracción de burbujas, la mezcla es colocada en un recipiente con la forma negativa del diseño deseado, y después del periodo de curado a la temperatura indicada por el fabricante, se obtiene el componente final.

Para la última etapa del procedimiento de manufactura y lograr los componentes finales, son necesarios unos componentes intermedios llamados moldes. La fabricación de estos moldes puede ser realizada por diversos métodos, sin embargo debido a la facilidad y rapidez de prototipado se ha elegido a la fabricación digital aditiva como el proceso de manufactura más adecuado para estos.

### **5.1.7. Resolución de la fabricación digital aditiva tradicional**

Para la fabricación de los moldes se usará la fabricación digital aditiva o también denominada impresión 3D. Por ello, se deben tomar en cuenta las especificaciones técnicas generales relacionadas a la resolución máxima posible de una pieza fabricada mediante este método y así adaptar las dimensiones mínimas permisibles y los cálculos necesarios para obtener el diseño optimizado final.

En este sentido, se sabe que en las impresoras 3D convencionales, la resolución de la impresión se divide en dos direcciones, en la dirección del plano xy y la dirección del eje z (vertical). Los valores nominales de estas resoluciones son: 0.1 mm (altura de capa) y 0.4 mm (ancho de cabezal de la impresora), respectivamente.

### **5.1.8. Diseño inicial y optimización**

#### **Diseño inicial**

El primer paso para diseñar la plataforma con los requerimientos de diseño identificados, comprende el subsanar el requerimiento de la compatibilidad geométrica de esta plataforma con los sistemas de microtitulación comerciales. Con el fin de lograr esto, la plataforma propuesta en esta tesis debe estar diseñada de

acuerdo a estándares internacionales [72]. Sin embargo, como se requiere que la plataforma propuesta se acople/apile con los sistemas actuales, se utilizan solamente las dimensiones estándar de la base de un sistema de microtitulación comercial. Para ello, se propone trabajar con una plataforma compuesta de dos componentes principales: la base con dimensiones estándares, que se acopla con los sistemas de microtitulación comerciales (ver el plano en el Anexo A) y la parte interna, que tendrá el diseño optimizado para generar excitaciones homogéneas en las superficies de cultivo. Para la parte interna, se elige usar un sistema de 6x4 pocillos debido a la limitada resolución de la impresión 3D de escritorio. Además, como el componente interno de la plataforma debe ser modular se proponen módulos de 4 pocillos, por lo que se tendría 6 módulos de 4 pocillos (ver Figura 5.7).

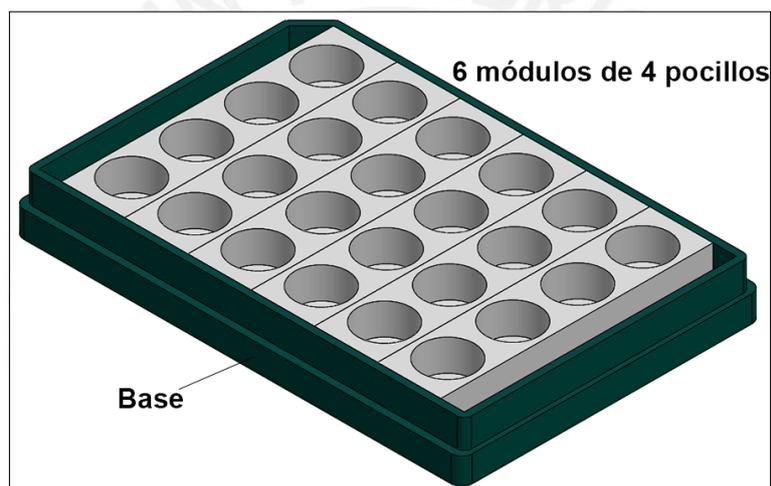


FIGURA 5.7: Esquema base del sistema de microtitulación propuesto con seis módulos de cuatro pocillos.

### Optimización

El diseño del sistema de microtitulación propuesto tiene como objetivo obtener una distribución homogénea de esfuerzos cortantes, esfuerzos en tracción y elongaciones sobre las células bajo estudio, las cuales están adheridas en la superficie plana. Sin embargo, el diseño estándar no logra esto; por lo que, con el fin de obtener esto, se realiza una optimización topológica del diseño inicial usando el software de cálculo y simulación por elementos finitos COMSOL 5.6. Adicionalmente, debido a que, ambos principios de accionamiento están dentro de la mecánica no lineal, se usa el algoritmo SNOPT (Sparse Non Linear Optimizer).

### Homogeneidad de esfuerzos cortantes

En primer lugar se realiza una optimización topológica del volumen de control del fluido que estará presente en cada pocillo (ver Figura 5.8) con el fin de que al fluir este, se genere el campo de esfuerzos cortantes homogéneo en la superficie celular del pocillo. Se usó el software de simulación COMSOL Multiphysics, los módulos CFD (Computer Fluid Dynamics) y Optimization; además se usa el tipo de Interpolación Darcy y Discretización Lineal. El material elegido como fluido es agua ya que se aproxima en propiedades mecánicas (viscosidad y densidad) al fluido real (medio de cultivo). Con estas configuraciones y eligiendo una correcta función de optimización, es posible obtener una aproximación de la forma del volumen de control necesario para lograr esfuerzos cortantes homogéneos tanto en dirección como en magnitud en la superficie de cultivo celular.

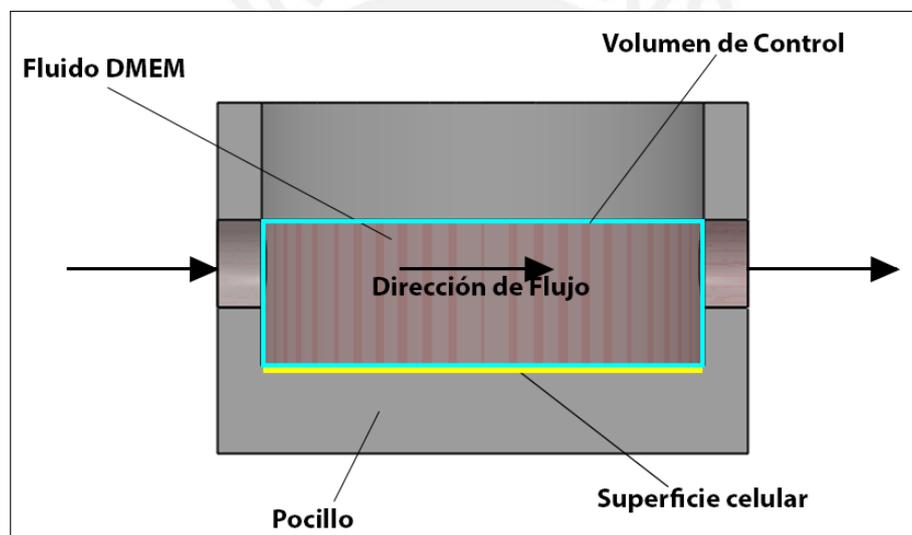


FIGURA 5.8: Sección transversal de un pocillo, en el esquema se presenta los componentes de un pocillo del sistema de microtitulación en el que actúan flujos.

### Homogeneidad de elongaciones

En el sentido del campo de elongaciones en la superficie de cultivo celular, se desea obtener el diseño optimizado de una membrana axisimétrica que mediante el accionamiento neumático (de acuerdo a lo explicado al inicio de este capítulo), genere el campo más homogéneo en la superficie superior de esta (la cual es la superficie de cultivo del pocillo). Para esto, se tomará el diseño inicial de un pocillo representado en la Figura 5.9. Con este diseño inicial se realizará la optimización usando el software COMSOL 5.6, el Diseño Paramétrico, el módulo de Optimization/Shape Optimization con el método de optimización SNOPT.

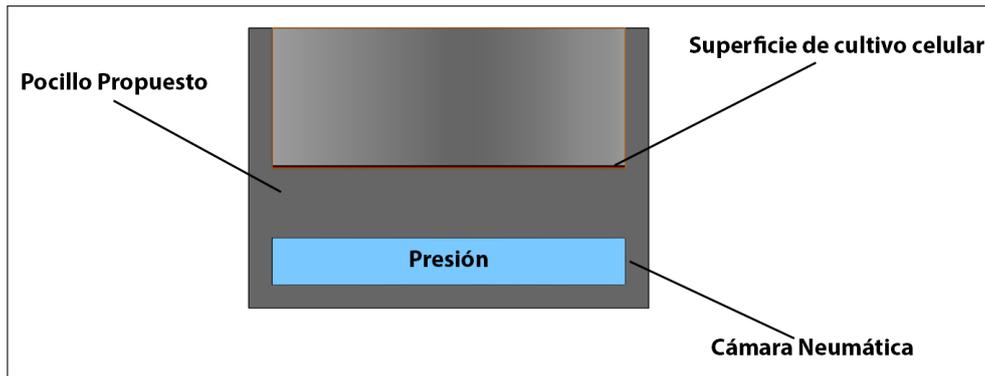


FIGURA 5.9: Esquema inicial de los componentes de un pocillo del sistema de microtitulación en el que actúan presiones neumáticas.

### Integración de los resultados

Una vez obtenidos los diseños optimizados para ambas excitaciones mecánicas, estos se integrarán en una sola plataforma con las dimensiones obtenidas independientemente en cada optimización y las restricciones de fabricación debidas a la impresión 3D. Este diseño final se registrará de acuerdo a los principios de accionamiento ya discutidos anteriormente. El esquema general de todo el sistema, se muestra en la Figura 5.10.

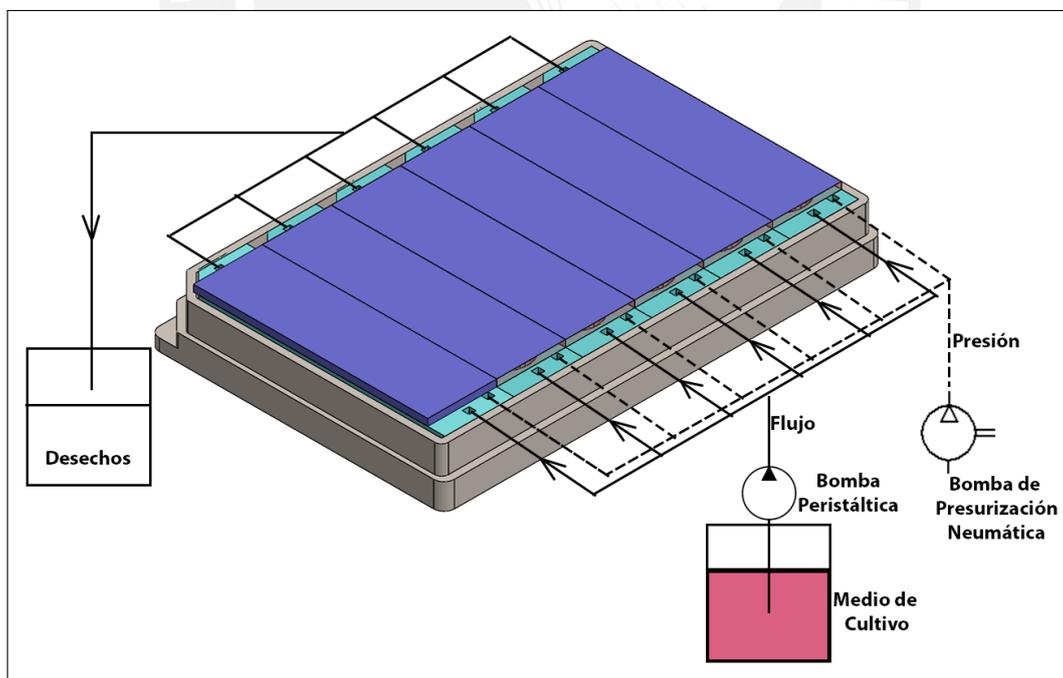


FIGURA 5.10: Representación esquemática del sistema completo para la generación de esfuerzos cortantes mediante flujo y elongaciones homogéneas. Se emplea una bomba peristáltica y una bomba de presurización como fuentes de energía mecánica.

## 5.2. Verificación

En esta sección, se procederá a presentar los experimentos que se realizarán para verificar técnicamente el cumplimiento de los requerimientos identificados al inicio de este capítulo. Estos experimentos permitirán la verificación de la homogeneidad del campo de elongaciones y esfuerzos cortantes, la resistencia térmica del material y la esterilidad del dispositivo.

### 5.2.1. Verificación del campo de elongaciones en la superficie de los pocillos

Se verifica el campo de elongaciones siguiendo el conjunto de procedimientos para calcular las elongaciones de la prueba denominada *bubble inflation*. En el cual, mediante una cámara con la resolución adecuada, se medirán las distancias entre los puntos dibujados en la superficie del pocillo donde se cultivarán las células. Con esta variación de distancias se podrá obtener el campo de elongaciones de la superficie.

### 5.2.2. Verificación del campo de esfuerzos cortantes en la superficie de los pocillos

En el estado del arte se mencionan varios procesos para medir esfuerzos cortantes en superficies sólidas generados por movimiento de fluidos. Las técnicas más usadas en el ámbito académico son las ópticas, las cuales miden cambios de posición o deformación de elementos adicionales ubicados en el volumen de control de la subcapa viscosa o laminar (espesor cercano al 10% del diámetro geométrico del ducto o canal). Los elementos pueden ser gotas de aceite, microvellosidades, entre otros. Sin embargo, el uso de estas técnicas escapa del alcance de este trabajo de investigación.

Para este proyecto de tesis el análisis se realizará mediante el desarrollo de simulaciones asistidas por computadora empleando el método de elementos finitos con el software Comsol 5.6. Para esto, en estas simulaciones se modela el fluido con las propiedades mecánicas del agua ya que tiene características físicas similares al medio de cultivo, el cual se propone como fluido final para la implementación y uso del sistema propuesto en la tesis.

### 5.2.3. Resistencia térmica del material

Uno de los primeros procesos de verificación se basa en validar la resistencia térmica del material elegido, ya que el proceso de esterilización elegido es el autoclavado. Para esto se realizará el análisis mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y Termogravimetría (TG). Además de estas pruebas, se revisará cuantitativamente si el material sufre alguna variación en sus propiedades físicas luego de realizar la esterilización por autoclavado, para esto se realizarán ensayos de tracción bajo la norma ASTM D412-06a en probetas del material elastomérico antes y después de ser expuestas al proceso de esterilización.

### 5.2.4. Esterilidad de la plataforma propuesta

Para la validación de la esterilidad lograda con el autoclavado, se usará el análisis cualitativo presentado en la norma ISO 11737-2 [22]. Se prepararán muestras iniciales, con características geométricas iguales al diseño final, a las cuales se las sumergirá en medio de cultivo en condiciones de cultivo celular estándares y se evaluará al menos 12 campos bajo un microscopio óptico en búsqueda de algún microorganismo. Este ensayo se complementará mediante el análisis por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. Además se realizará otro ensayo que comprende el proceso de hisopado de estos materiales para luego exponer el hisopo al cultivo en caldo de soya por dos días, seguido de una inspección visual en busca de evidencia de crecimiento de microorganismos. Seguidamente, se colocará el resultado de la incubación en placas Petri con agar para proceder a incubarlo por dos días más y finalmente realizar una inspección visual.

## 5.3. Viabilidad Celular

La validación funcional de la plataforma propuesta comprende el análisis de la viabilidad celular mediante el conteo de células por exclusión del tinte azul de Tripán. Para este análisis, el control será un sistema de microtitulación comercial y las condiciones de cultivo en las dos plataformas (comercial y propuesta) serán las mismas. Estas condiciones de cultivo se presentan a continuación:

- Las células se cultivarán en medio de cultivo en base a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento y antibióticos.

- Debido a que la plataforma propuesta tiene dimensiones de pocillo de una plataforma estándar comercial de 24, se usará esta última como control.
- La unidad mínima de análisis es un pocillo, esto es debido a que la impresión 3D es usada como método de fabricación y tiene limitada repetitividad para diseños con dimensiones del orden de las décimas de milímetro.
- El periodo de cultivo será de 72 horas con repique si es necesario para que la confluencia celular no sobrepase  $1 \times 10^6$  células/ml. Se medirá la viabilidad celular al finalizar el periodo de cultivo.
- La densidad inicial de cultivo y después de cada repique (si es que lo hubiera) será de  $1 \times 10^5$  células/ml.
- Para contar, se usará Azul de Tripán 0.4 %. Se tomarán 10 ul de la suspensión celular y se mezclará con 10 ul de Azul de Tripán .

Cabe resaltar que, para esta validación, la plataforma propuesta no ejercerá ninguna excitación mecánica sobre las células con el fin de que solo se comparen los materiales y las geometrías de ambas plataformas.

Las células a analizar provendrán de una línea celular comercial HL60 la cual está conformada por células mieloides humanas recuperadas de una muestra de sangre periférica de una paciente con leucemia promielocítica aguda [73]. En todos los ensayos (ensayos triplicados), se evaluará el % de viabilidad celular, de manera que valores mayores a 70 % indicarán un bajo potencial de citotoxicidad de acuerdo a la norma ISO 11737-2 [22].

## Capítulo 6

# Resultados

Los resultados que se muestran en este capítulo vienen a corresponder con las secciones y subsecciones del capítulo anterior. Los primeros resultados que se muestran se relacionan con el soporte general de la plataforma, seguidamente se presentan los resultados de la optimización para obtener los esfuerzos cortantes y elongaciones homogéneas en la superficie, mostrando también el análisis que lleva a elegir el diseño más adecuado. Luego, se presenta la verificación de la homogeneidad de los campos mecánicos generados por el diseño optimizado, el análisis de la resistencia térmica del material principal y la capacidad de esterilizar cada componente del diseño optimizado; para finalmente presentar la validación mediante el análisis de la viabilidad celular del cultivo de una línea celular comercial sobre el dispositivo.

### 6.1. Diseño del Soporte

Uno de los requerimientos de diseño es la integración de la plataforma con los sistemas de microtitulación comerciales. Esto se puede validar, usando la base propuesta, la cual tiene las dimensiones estándares (ver Anexo A, plano *Diseño de la base de la plataforma*) y haciendo el encaje con una tapa comercial. Se usarán dos materiales acero inoxidable (debido a su capacidad de soportar las temperaturas de autoclavado, 120 °C) y Veroclear (debido a su transparencia). Para fabricar la base de acero inoxidable se usó el proceso de fresado y la base de Veroclear fue fabricada con la impresora Objet500 Connex 3 (perteneciente a

la Sala VEO PUCP). Esta validación cualitativa para la base de acero inoxidable se observa en la Figura 6.1.

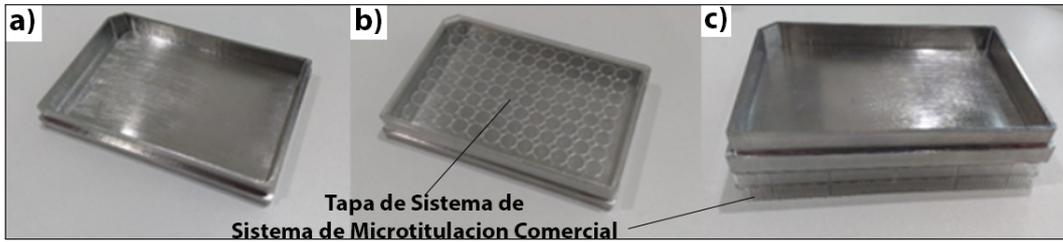


FIGURA 6.1: Se presenta la base de la plataforma desarrollada. a) Base, b) Tapa comercial sobre base propuesta, c) Tapa comercial bajo base propuesta.

## 6.2. Optimización del Diseño

De lo presentado en el capítulo anterior, se usa el software COMSOL 5.6 como herramienta para el proceso de optimización con la finalidad de obtener esfuerzos y elongaciones homogéneas. En primer lugar, se mostrará el procedimiento para obtener esfuerzos cortantes homogéneos y luego las elongaciones homogéneas usando los principios de accionamiento de generación de flujos y accionamiento neumático, respectivamente.

### 6.2.1. Esfuerzos cortantes homogéneos

Para el análisis del esfuerzo cortante, se procede a analizar la gradiente vertical (eje  $y$ ) de la velocidad horizontal en los ejes  $z$  (dirección del flujo) y  $x$  (dirección perpendicular al flujo que pertenece al plano horizontal). Esto es debido a que el esfuerzo cortante en la superficie de cultivo celular se puede calcular como:

$$\tau = \mu \frac{\delta u}{\delta y}_{y=0} \quad (6.1)$$

Donde  $\tau$  es el esfuerzo cortante,  $u$  es la velocidad en el plano horizontal y  $\mu$  es la viscosidad dinámica del fluido.

Para analizar que componente de las gradientes horizontales de la velocidad del flujo en la superficie para cultivo es la que tiene mayor influencia en la heterogeneidad del campo y así definir la función de optimización adecuada que permita minimizar esta influencia, se realiza en primer lugar el cálculo por elementos finitos mediante la simulación del diseño base mostrado en la Figura

6.2a y se analizan los campos de esfuerzos generados en la superficie de cultivo celular.

Graficando la gradiente vertical (eje  $y$ ) de la velocidad horizontal en los ejes  $x$  y  $z$  (ver Fig. 6.2b y Fig. 6.2c) se observa que la gradiente de velocidad  $u$  (dirección del eje  $x$ ) respecto a la vertical no es homogénea y varía desde  $-20$  a  $20 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$  y la gradiente de la velocidad  $w$  (dirección del eje  $z$ ) respecto a la vertical es homogénea en la zona central de la superficie y posee una variación total de  $0$  a  $50 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$ . Por lo tanto, la variabilidad del tensor resultante de las componentes  $u$  y  $w$  de la gradiente respecto a la vertical posee gran influencia de la componente  $u$  debido a que se identifica la existencia de componentes en dos direcciones antiparalelas para esta componente. Entonces, tal como se mencionó líneas arriba, esto se tomará en consideración para hallar las funciones objetivos necesarias para la optimización topológica del contorno del volumen de control y lograr la mejor homogeneidad en lo que respecta al campo mecánico de esfuerzos cortantes sobre la superficie.

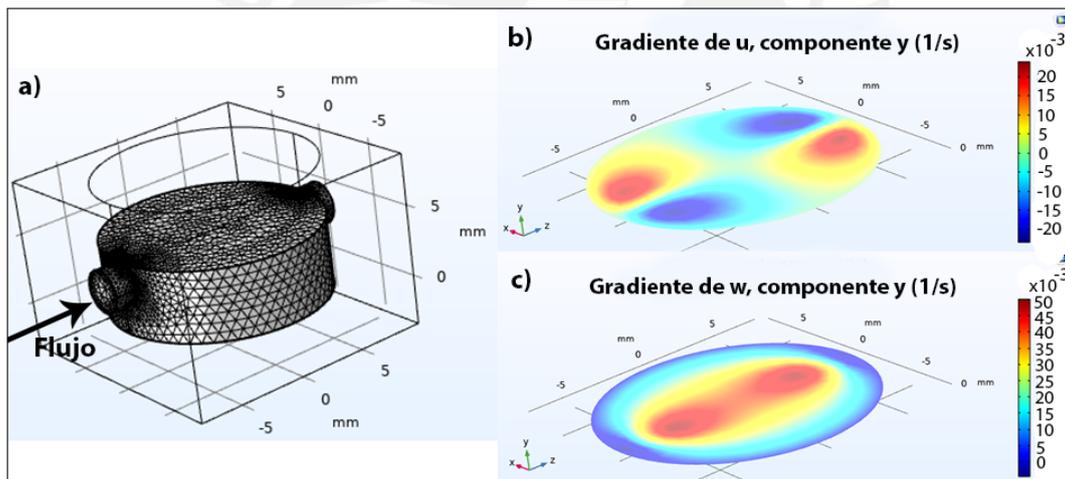


FIGURA 6.2: a) Mallado del volumen total de flujo aplicado sobre el diseño base del sistema de microtitulación propuesto, b) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $u$  (eje  $x$ ) respecto a la dirección  $y$  c) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $w$  (eje  $z$ ) respecto a la dirección  $y$ .

Para la optimización se usaron las siguientes fórmulas que están relacionadas con el flujo en medio poroso:

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = -\nabla p + \nabla \cdot \eta (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T) - \alpha(\gamma) \mathbf{u} \quad (6.2)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (6.3)$$

$$\alpha(\gamma) = \frac{\alpha_{max}(q(1 - \gamma))}{q + \gamma} \quad (6.4)$$

$$\alpha_{max} = \frac{\mu}{Da.L^2} \quad (6.5)$$

En la expresión 6.2, se muestra la ecuación de Navier-Stokes y en 6.3 se muestra la condición de conservación de masa suponiendo un fluido incompresible (los cálculos fueron realizados usando al agua como fluido). En 6.2,  $\alpha(\gamma)$  caracteriza al flujo en un medio poroso y el factor de penalización usado para hallar el volumen fuerza en la ecuación de Navier-Stokes. Si  $\alpha$  es cero, se corresponde con un flujo libre y si  $\alpha(\gamma)$  es  $\alpha_{max}$ , el flujo es restringido en la zona de estudio. Se establece un valor de  $Da = 1 \times 10^{-5}$  (si  $Da$  es próximo a 0, el material es impermeable) y  $L=5\text{mm}$  (altura inicial del volumen de control del pocillo).

Se analizaron dos funciones objetivos definidas en el dominio de la superficie para cultivo celular con el fin de encontrar el mejor contorno posible para el volumen de control. Ambas funciones objetivo son definidas bajo el operador de maximización de la magnitud de la gradiente de velocidad en cada una de las direcciones coplanares ( $u$  y  $w$ ) a la superficie de cultivo.

### Primera función objetivo: Componente $u$

Se propuso en primer lugar, utilizar una función objetivo que maximice la magnitud del promedio de la gradiente de velocidad de la componente  $u$  con respecto a la vertical (eje  $y$ ), debido a que de acuerdo a la Fig. 6.2b, se observa que esta componente es la que tiene mayor influencia en lo que corresponde a la no homogeneidad de la superficie, por lo tanto maximizando la magnitud del promedio de esta componente se logra un direccionamiento del campo de velocidad en la dirección  $u$ , lo que conlleva a lograr campos más homogéneos en la superficie, debido a la naturaleza plana de esta. En la Fig. 6.3, se observan los resultados obtenidos por el software.

Se observa en la Fig. 6.3 la solución, sin embargo, debido a que la superficie del contorno es abrupta o no suavizada (esto puede ser debido a que el parámetro  $L$  varía mientras la solución va iterando y también al número máximo de iteraciones configuradas), se procederá a diseñar en software CAD la solución factible tomando en consideración las limitaciones de la fabricación digital convencional (ver Fig. 6.4).

### Segunda función objetivo: Componente $w$

La siguiente función objetivo es en base a la maximización de la magnitud de la gradiente total de velocidad horizontal  $w$  con respecto a la vertical (eje  $y$ ), esto es debido a que la gradiente de la componente  $w$  (componente de la velocidad

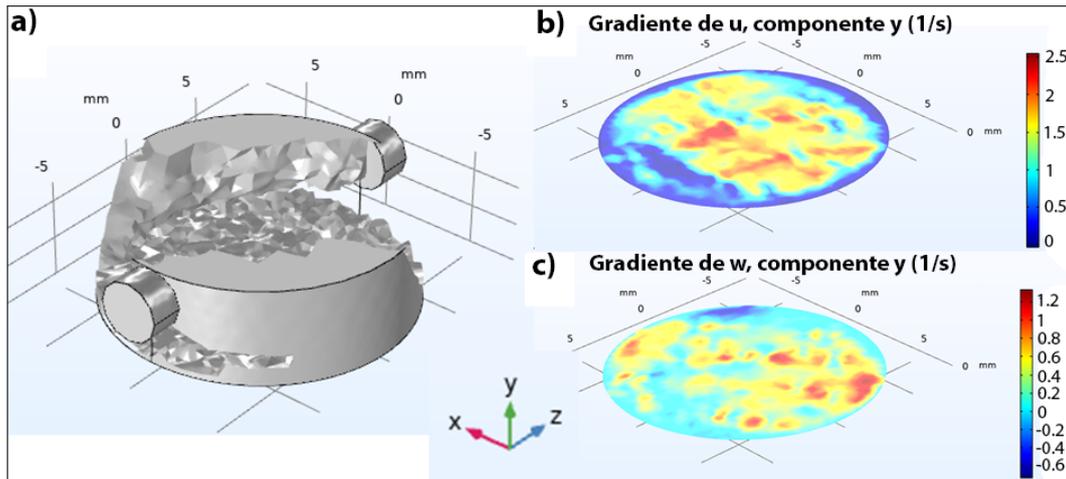


FIGURA 6.3: a) Optimización topológica del volumen de control usando como función objetivo la maximización de la magnitud del promedio de la gradiente de la componente  $u$  de la velocidad con respecto a la vertical, b) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $u$  (eje  $x$ ) respecto a la dirección  $y$  c) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $w$  (eje  $z$ ) respecto a la dirección  $y$ .

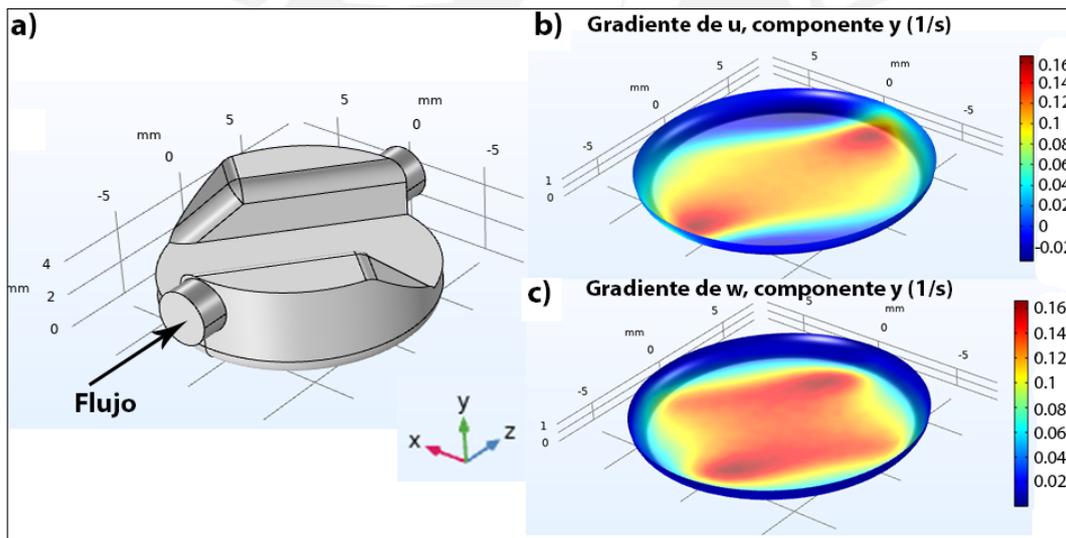


FIGURA 6.4: a) Análisis computacional del diseño optimizado mejorado en un software CAD usando la maximización de la magnitud del promedio de la gradiente de la componente  $u$  de la velocidad con respecto a la vertical, b) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $u$  (eje  $x$ ) respecto a la dirección  $y$ , c) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $w$  (eje  $z$ ) respecto a la dirección  $y$ .

paralela al flujo de ingreso) con respecto a  $y$  es la que posee mayor magnitud y por lo tanto afectará mayoritariamente en los resultados del esfuerzo cortante en la superficie. Con este resultado, el diseño fue mejorado en un software CAD teniendo en cuenta las limitaciones de la fabricación digital aditiva (ver Fig. 6.5).

Teniendo los dos resultados, i.e. Fig. 6.4 y Fig. 6.5; estos se deben comparar

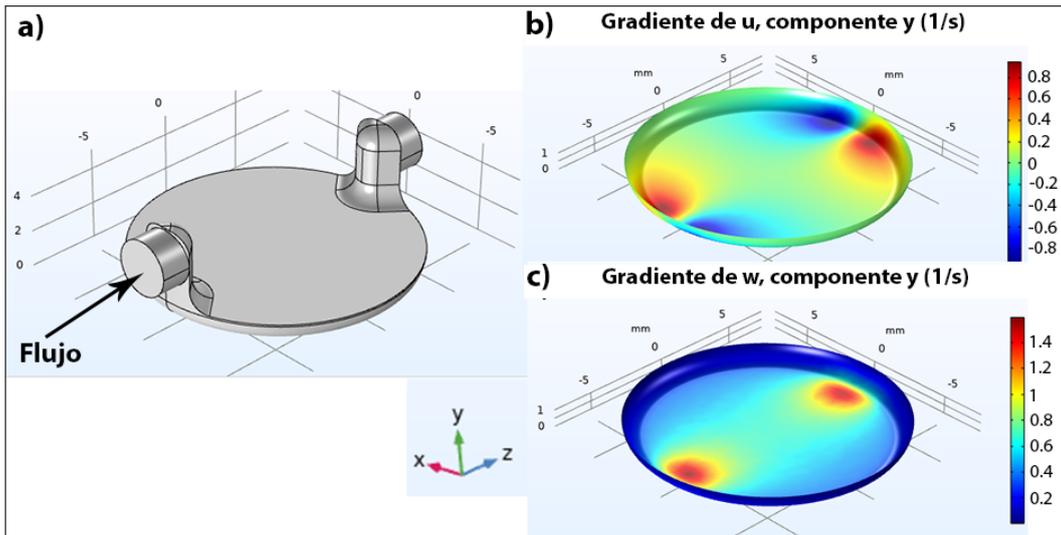


FIGURA 6.5: a) Análisis computacional del diseño mejorado en un software CAD del diseño obtenido en COMSOL usando como función objetivo la maximización de la magnitud de la gradiente de la componente horizontal  $w$  de la velocidad con respecto a la vertical  $y$ , b) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $u$  (eje  $x$ ) respecto a la dirección  $y$  c) Gráfica de la gradiente de la velocidad  $w$  (eje  $z$ ) respecto a la dirección  $y$ .

con el fin de lograr una región de interés homogénea lo más amplia posible, para lo cual se analiza tanto la magnitud como la dirección de la gradiente en ambos casos. En la Fig. 6.6 se muestran los dos gráficos de lo mencionado anteriormente.

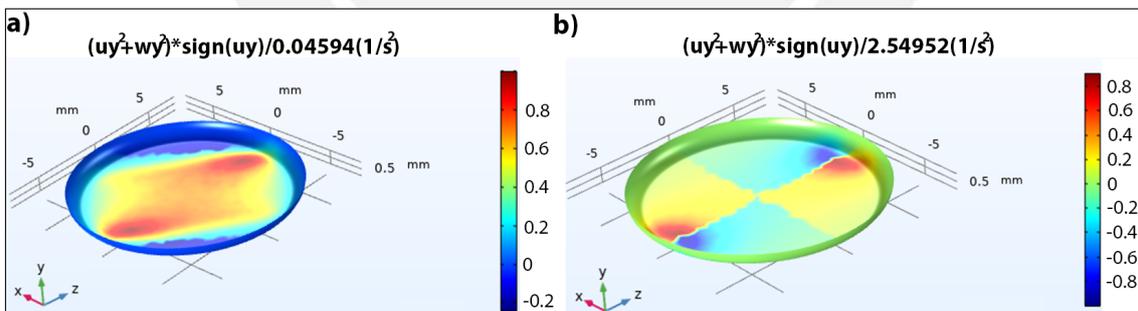


FIGURA 6.6: Comparación entre la magnitud y dirección del campo de esfuerzos cortantes. El signo negativo del campo de esfuerzos señala que el vector de la gradiente de velocidad con respecto a la velocidad se encuentra en el cuadrante  $(-x, y)$  y una magnitud positiva se encuentra en el cuadrante  $(x, y)$  a) Optimización 1 y b) Optimización 2. En los dos casos los valores resultantes fueron normalizados para mejor comparación de resultados.

De la Fig. 6.6, se observa que el campo de esfuerzos cortantes en la superficie tiene magnitud y dirección homogéneas en la optimización 1, mostrada en la Fig. 6.4 y por otro lado, la dirección de los esfuerzos cortantes en la optimización

2 es variable y simétrica con respecto al centro geométrico de la superficie de cultivo celular. Por lo tanto, el diseño obtenido en la optimización 1 es el elegido para obtener el campo de esfuerzos cortantes con mayor homogeneidad.

### 6.2.2. Elongaciones

Además del requerimiento de que el sistema propuesto genere esfuerzos cortantes homogéneos en la superficie de cultivo, también se requiere que este sistema pueda generar el campo de elongaciones en la superficie de cultivo más homogéneo posible mediante el accionamiento neumático. Para esto, se analiza el campo de deformaciones en coordenadas cilíndricas de un pocillo de espesor constante de 3 mm y 15 mm de diámetro a una presión de 75 kPa. En la Fig. 6.7, se muestra las simulaciones correspondientes a los campos de elongaciones obtenidos mediante simulación en el software COMSOL y se observa que el campo de elongaciones en la componente radial (ver Fig. 6.7a) y la componente vertical (ver Fig. 6.7b) son las que más influyen en la heterogeneidad del campo de elongaciones global. Esto es debido a que representan directamente a las deformaciones de la curvatura generada al presurizar la membrana. Por lo que se define la función objetivo con el fin de minimizar esta curvatura, mediante la minimización de la componente vertical y maximización de la componente radial (no se toma en consideración la componente angular o azimutal ya que es axisimétrica).

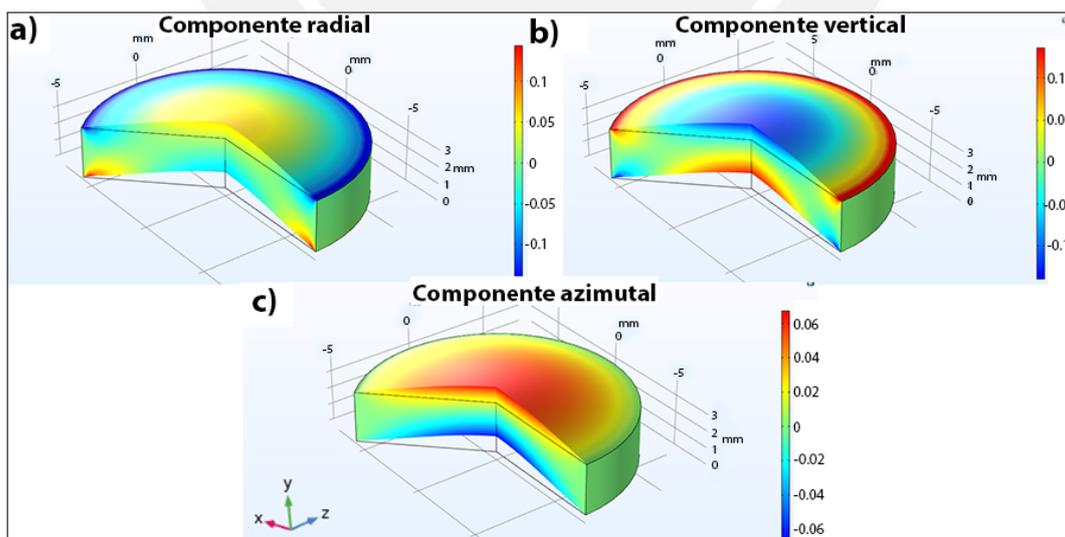


FIGURA 6.7: Campo de elongaciones superficiales del pocillo sin optimización: a) componente radial, b) componente  $z$  y c) la componente  $\theta$ .

Para esto se usa el software COMSOL 5.6, el Diseño Paramétrico y el módulo de Optimization/Shape Optimization. El método de optimización fue SNOPT y la función objetivo fue maximizar el valor de  $q$ , siendo

$$q = 2q_{maxR} - q_{maxZ} \quad (6.6)$$

$$q_{maxR} = \maxop1(\text{solid.eR}^2) \quad (6.7)$$

$$q_{maxZ} = \maxop1(\text{solid.eZ}^2) \quad (6.8)$$

Donde  $\text{solid.eR}$  y  $\text{solid.eZ}$  son los valores de elongación en el eje radial y vertical respectivamente,  $\maxop1$  es la función definida como el valor máximo en la región  $S$  (ver Figura 6.8) y los coeficientes 2 y 1 que acompañan a  $q_{maxR}$  y a  $q_{maxZ}$  en la ecuación 6.6 brindan los pesos que representan la influencia de cada uno de estos factores en la función objetivo. La superficie  $S'$  no fue incluida en el análisis debido a que forma parte de la optimización de la homogeneidad de los esfuerzos cortantes que resulta en un redondeo mostrado en la Fig. 6.4. Adicionalmente, para la iteración computacional se estableció como paso dimensional el valor de 0.5 mm, debido a las restricciones dadas por la fabricación digital aditiva.

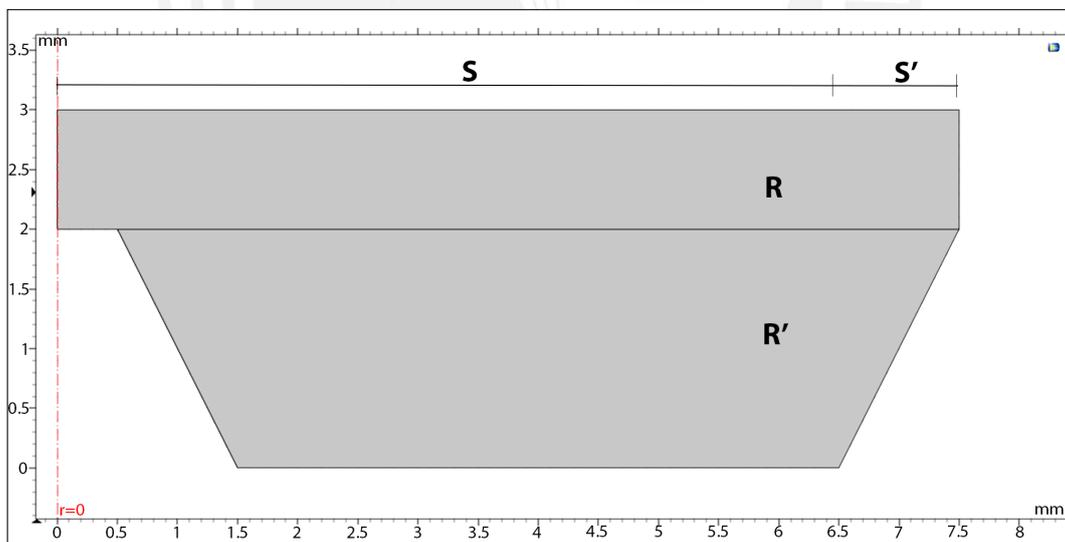


FIGURA 6.8: Diseño paramétrico radial 2D del pocillo de radio 7.5 mm. La superficie  $S+S'$  es el radio de la base circular del pocillo en donde estarán ubicadas las células. La región restante  $R'$  es la que será optimizada usando Shape Optimization en COMSOL y con la función objetivo ya descrita.

Luego de los cálculos computacionales de optimización, se observan los resultados en la Figura 6.9, en donde en la parte a, se observa la optimización de la forma de la región  $R'$  y en las partes b, c y d se presenta gráficamente el tensor

de elongaciones en cada coordenada cilíndrica. Cabe mencionar que se realiza el análisis usando coordenadas cilíndricas debido a que la superficie de adición celular es de área circular y la zona fija (sin movimiento) es el borde circular.

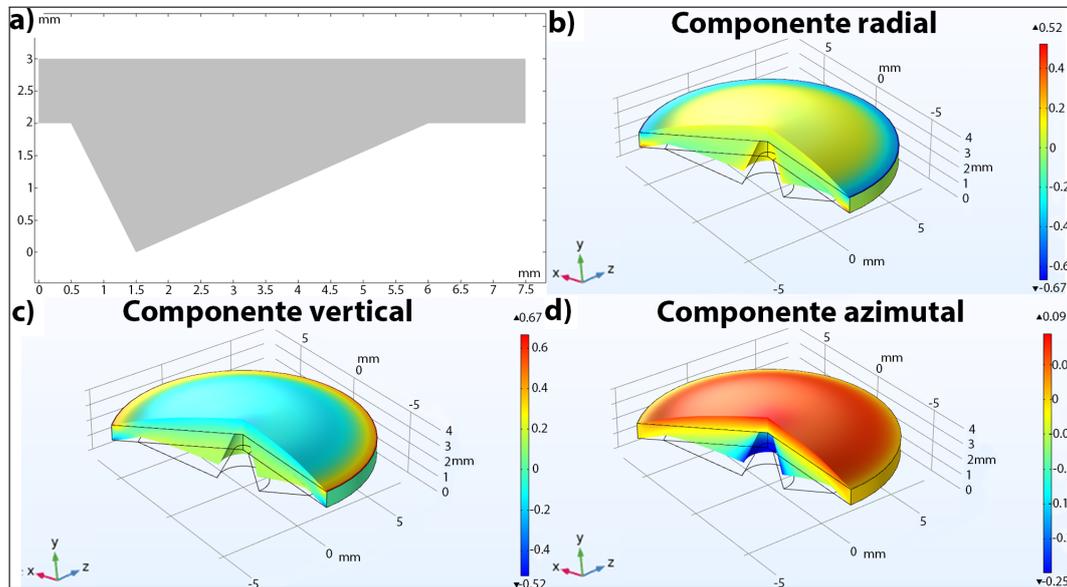


FIGURA 6.9: Resultados de la optimización de la forma de la región R' (ver Fig. 6.8). a) Forma optimizada, b) tensor de elongaciones de la componente radial, c) tensor de elongaciones de la componente vertical y d) tensor de elongaciones de la componente angular.

### 6.3. Verificación del Diseño Final del Sistema de Microtitulación

Después de obtener los diseños optimizados para la generación de esfuerzos cortantes y para las elongaciones homogéneas de forma separada, se procede a integrarlos en un solo diseño modular de cuatro pocillos. El diseño de estos se muestra en la Fig. 6.10, en donde se tiene que con el objetivo de definir el volumen de control del flujo con la forma obtenida en la optimización (ver Fig. 6.4), se debe diseñar un segundo componente que tenga el perfil de la parte superior de esta (Tapa con perfil de la Fig. 6.10). Los planos del diseño optimizado se encuentran en el Anexo A. En el Anexo en mención, los planos denominados *Diseño Optimizado* y *Diseño Optimizado Tapa* presentan las dimensiones básicas obtenidas en el proceso de optimización; y el plano denominado *Módulo de 3x4 pocillos y Tapa* muestra los diseños de un módulo de doce pocillos, este módulo básicamente consiste del ensamblaje de tres módulos de cuatro pocillos agregando perfiles que ayudan a obtener el sellado entre la base y la tapa y que no

exista escape de fluido, cuyos diseños se muestran en los planos *Sujetador* y *Rigidizador*.

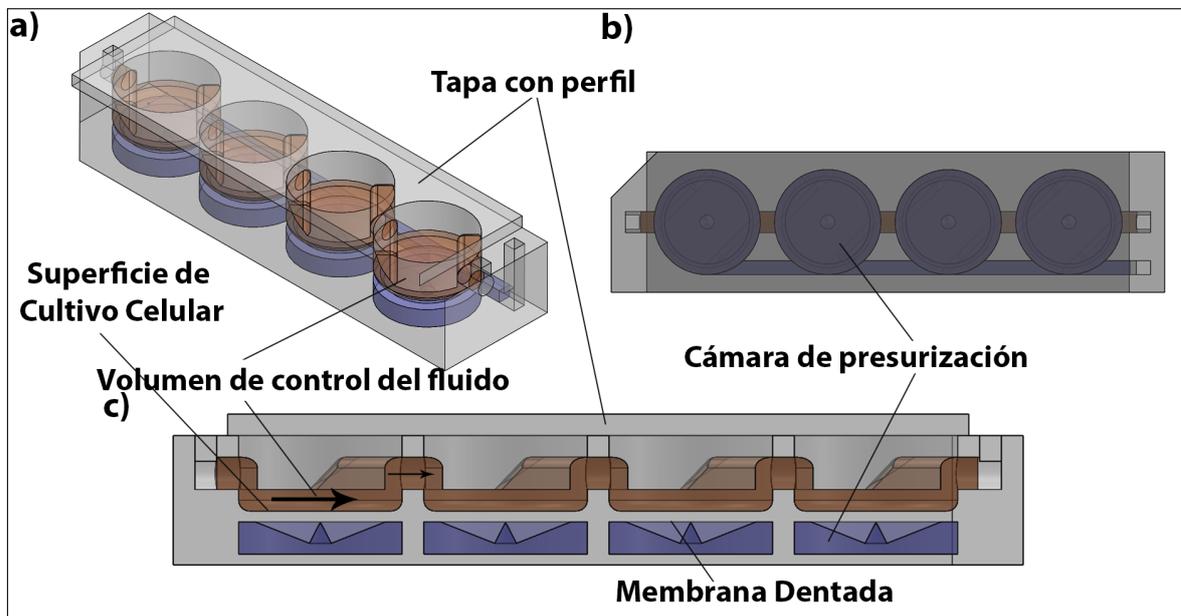


FIGURA 6.10: Esquemático de un módulo de cuatro pocillos de la plataforma propuesta en base a las optimizaciones realizadas, en las figuras, el volumen rojo representa el volumen del fluido y el volumen azul representa el volumen de fluido presurizado. a) Vista isométrica, b) vista inferior y c) vista frontal.

### 6.3.1. Fabricación

#### Moldes

Para fabricar el diseño optimizado, de acuerdo a lo expresado en el capítulo de la metodología, se procede a modelar en 3D los moldes y fabricarlos usando manufactura digital aditiva. Se probaron dos impresoras 3D: Anycubic i3 Mega y Objet 500 Connex i3, con el fin de evaluar si el grado de rugosidad de las paredes de los moldes impresos afecta la transparencia del sistema. Cabe mencionar que los moldes fabricados con la impresora Connex i3 deben ser post-procesados después de ser impresos. Este post-procesamiento consiste en: Limpiar las superficies del molde con alcohol isopropílico y luego calentar las piezas a una temperatura de 90 grados Celsius por 24 horas. Esto permite que los residuos de resina en la superficie del molde puedan evaporarse lo que causa que ya no exista inhibición de la polimerización, un problema muy común encontrado en los moldes impresos en resina.

### Materiales y mezclas usadas

Como ya se mencionó anteriormente, se ensayaron dos materiales: RTV 1500 y Sylgard™184. Para las mezclas usadas en la polimerización, en el caso del RTV 1500 se utilizó una mezcla 1:1 en peso y para el Sylgard™184 se ensayaron tres relaciones de mezcla pre-polímero:agente polimerizador: 10:1, 20:1 y 30:1 en peso, debido a que se encontró que la relación 10:1 brinda inconvenientes en el proceso de desmoldeo causados por la geometría de los moldes. En la siguiente tabla (ver Tabla 6.1) se muestra la comparación entre la facilidad de desmoldeo y los módulos de elasticidad de estas tres mezclas de Sylgard™184. Con la tabla presentada, se observa que las mezclas con proporciones en peso de 20:1 a más, poseen módulos de elasticidad menores a 500 kPa, este módulo de elasticidad está en el rango de los módulos de elasticidad de los tejidos blandos [74]. Por lo tanto, para el sistema propuesto se eligió la mezcla 20:1, aunque también se ha probado con la mezcla 30:1. Esta elección depende del módulo de elasticidad deseado en el soporte físico, lo cual a su vez depende de cual es el ambiente adecuado para la célula a estudiar.

TABLA 6.1: Características de las diferentes mezclas en peso del Sylgard™184.

<b>Mezcla Sylgard 184 Polímero:Agente</b>	<b>Facilidad de moldeo para el sistema propuesto</b>	<b>Módulo de elasticidad</b>
10:1	No	1.32-2.97 MPa [75]
20:1	Sí	500 kPa [76]
30:1	Sí	100 kPa [76]

### Ensamble del sistema completo

Debido a la existencia de varios componentes, estos se ensamblarán usando el mismo polímero antes de curarse. Los planos del diseño de los moldes se encuentran en el Anexo B tanto para el modelo básico optimizado y el modelo que se usa en el sistema de microtitulación. Además, en la Fig 6.11 se muestra el proceso de ensamble con los respectivos moldes en versión simplificada (no son los moldes reales sino una versión simplificada para entendimiento del proceso de ensamblaje) y en la Fig. 6.12 se muestra el diseño del componente superior (ver Anexo A). Este componente superior consiste de 3 sub-componentes: La tapa de Sylgard, cuyo molde se muestra en la Fig. 6.12a y el resultado en la Fig.6.12b, el rigidizador de la tapa fabricado de PLA (ver Fig. 6.12c) y los sujetadores de PLA (ver Fig. 6.12d).

El resultado final del proceso de fabricación se muestra en la Fig. 6.13 en donde en Fig. 6.13a se presenta la base de acero inoxidable y el sistema de microtitulación de 6x4 pocillos de Sylgard 184 y RTV 1500, en la Fig. 6.13b se presenta el sistema de microtitulación completo con la base de Veroclear y pocillos de Sylgard 184 y RTV 1500, en la Fig. 6.13c se presenta el sistema completo con tapa comercial y en la Fig. 6.13d se presenta el sistema propuesto con la tapa diseñada sin rigidizador ni sujetadores. En la Fig. 6.14 se muestran las posibles opciones de uso del sistema propuesto tanto para ejercer esfuerzos cortantes y elongaciones y en la Fig. 6.15 se muestra el proceso de armado de la plataforma con todos los componentes presentados. Finalmente, en la Fig. 6.16 se presenta el sistema propuesto con la tapa de Sylgard (ver Fig. 6.16a) y el sistema completo (ver Fig. 6.16b). La prueba del funcionamiento del diseño completo fue usando agua colorada como fluido.

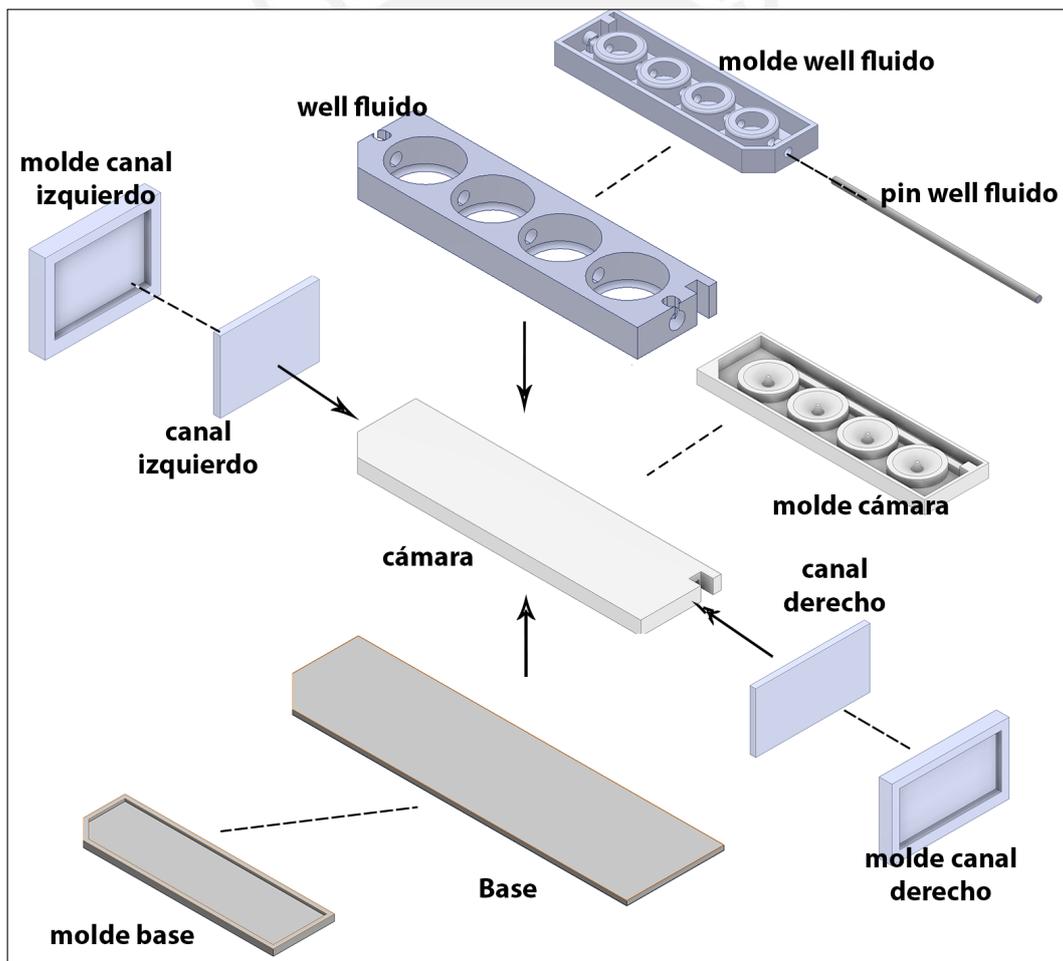


FIGURA 6.11: Proceso de integración y ensamble del diseño optimizado de un módulo de 4 pocillos. Esquema de ensamblaje con moldes simplificados para el entendimiento.

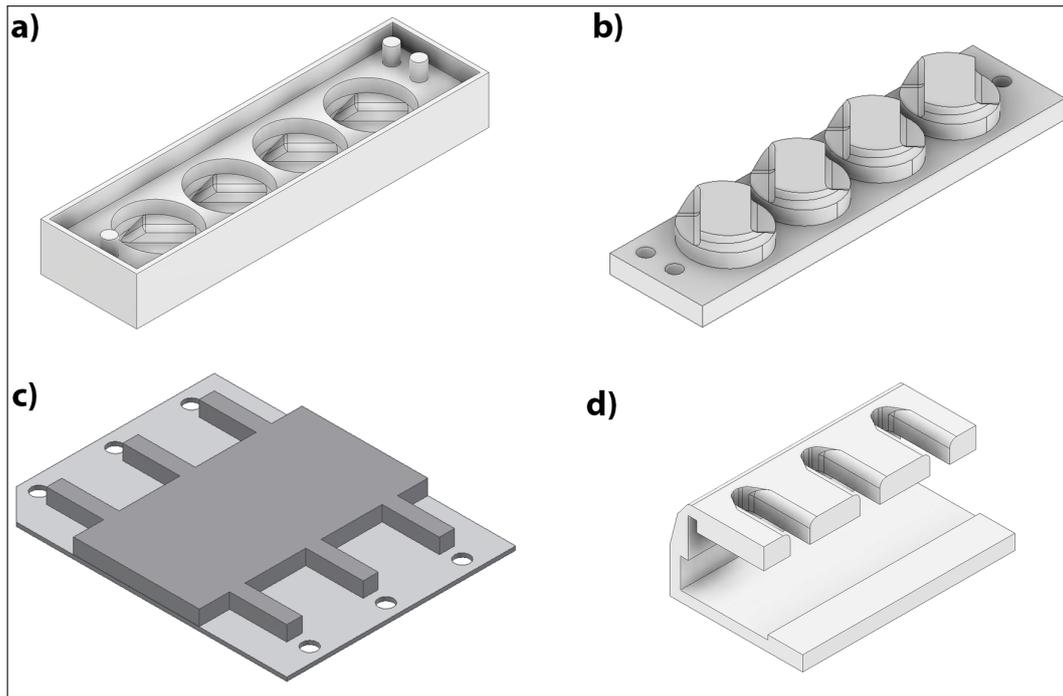


FIGURA 6.12: Partes del componente superior de la plataforma propuesta. a) Molde para tapa del sistema propuesta, b) tapa final de Sylgard 184, c) rigidizador de tapa y d) sujetador de tapa.

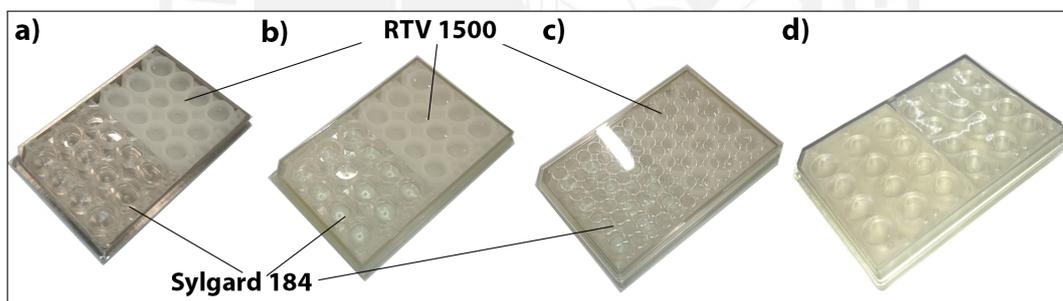


FIGURA 6.13: Sistema de microtitulación propuesta. a) Base de acero inoxidable y micropocillos de polímero elastomérico Sylgard 184 y RTV1500, b) base de Veroclear y micropocillos de polímero elastomérico Sylgard 184 y RTV1500, c) sistema mostrado en b) con tapa comercial y d) sistema mostrado en b) con tapa diseñada sin rigidizador ni sujetadores.

### 6.3.2. Verificación del campo de elongaciones homogéneas y esfuerzos cortantes

#### Elongaciones: Comparación entre el diseño optimizado y el diseño base

En este apartado se comparan los campos mecánicos de elongaciones generados por dos diseños en el sentido de analizar la homogeneidad en magnitud de estos, para lo cual se fabrican dos tipos de pocillo, el primero posee superficies

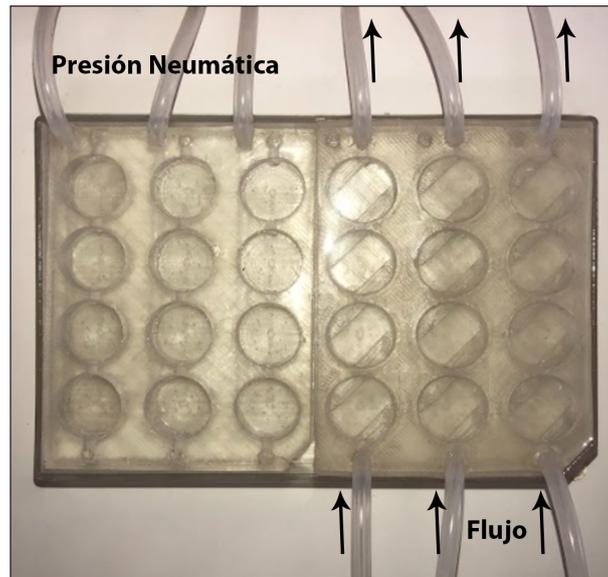


FIGURA 6.14: Esquemático de las posibles opciones de funcionamiento. Las flechas representan la dirección del flujo.

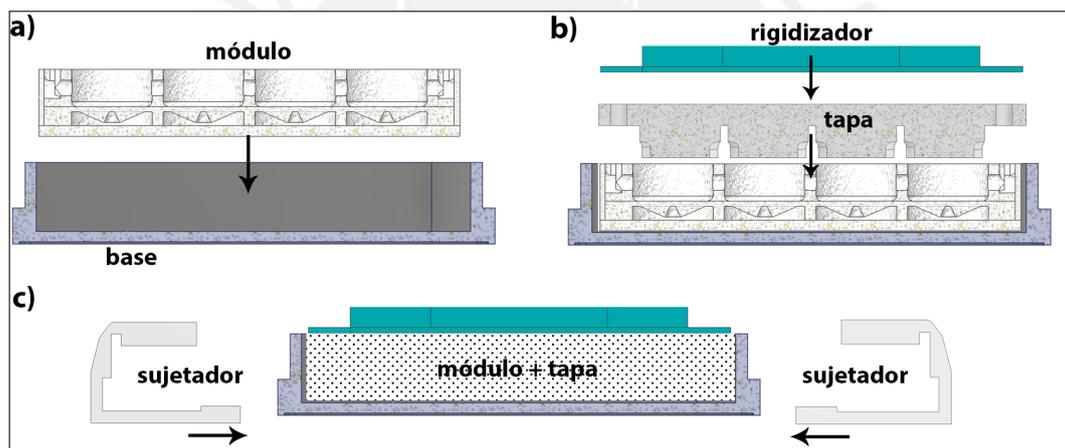


FIGURA 6.15: Esquemático del proceso de armado de la plataforma propuesta para el modo de generación de esfuerzos cortantes. a) Colocar el módulo en la base de Veroclear, b) ubicar la tapa de Sylgard 184 (ver Fig. 6.12b) y luego el rigidizador, c) colocar a presión los sujetadores.

planas tanto en la parte superior (superficie de cultivo) como la inferior (superficie en contacto con el aire presurizado) y el otro diseño fabricado tiene las dimensiones y forma del diseño optimizado. El diseño plano, tiene 1.8 mm de espesor constante, esto debido a que se busca lograr la misma cantidad de material en los dos pocillos bajo análisis. Además ambos diseños fueron fabricados usando el material Sylgard 184.

Para realizar la comparación se usa procesamiento de imágenes, para esto se usa y adapta la información proporcionada en [77] y se usan las vista superior

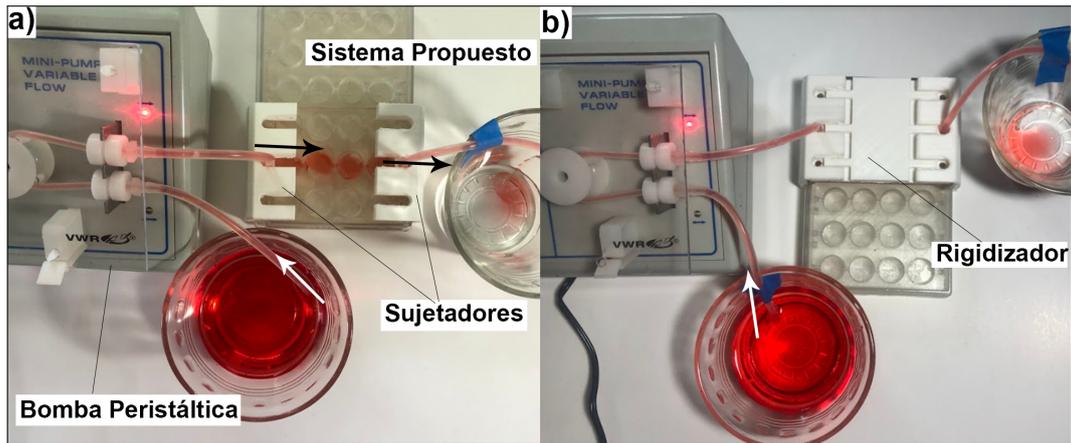


FIGURA 6.16: Sistema de microtitulación propuesto bajo la generación de esfuerzos cortantes. a) Con tapa diseñada colocada sobre el sistema fabricado de Sylgard 184 sin rigidizador para observar el flujo y b) con rigidizador. En estas pruebas se usa agua colorada.

y lateral de cada pocillo. Para la vista superior se marca un grid de puntos en la superficie superior y se analiza la elongación radial generada a diferentes presiones y para la vista lateral se obtiene el perfil de la curvatura generada a esas mismas presiones.

En la Figura 6.17 se presentan tres gráficas en las que se comparan las elongaciones radiales (ver Fig. 6.17a), las elongaciones radiales normalizadas (ver Fig. 6.17b) y el perfil generado en el eje vertical de la superficie superior (ver Fig. 6.17c) del diseño base fabricado, del diseño optimizado fabricado y también los resultados de la simulación del diseño optimizado. También se observa en la Fig. 6.17d el perfil generado al aplicar 30 kPa de presión en la cámara neumática del diseño optimizado fabricado y en la Fig. 6.17e se muestra el grid analizado luego de la aplicación de un filtro de Sobel para la detección de bordes y el filtro de mediana de este mismo diseño.

Para analizar cuál es el radio máximo de la región de interés con homogeneidad, se analiza el valor del radio a una atenuación de 0.7 en la gráfica de la elongación radial normalizada (ver Fig. 6.17b). Se observa que la homogeneidad del campo de elongaciones aumenta, en lo que se refiere al radio de la región de interés, desde 4.5 mm a 6 mm aproximadamente. Por lo que el área de homogeneización aumenta a 177%. También se observa que tanto el diseño optimizado fabricado como los resultados de la simulación de este diseño son similares. Sin embargo, en las zonas cercanas a la pared de los pocillos se muestran diferencias entre estos dos resultados, esto es debido a que el modelamiento en la simulación es diferente a lo observado en la realidad; sobre todo en lo que respecta al comportamiento de las aristas de la superficie de cultivo.

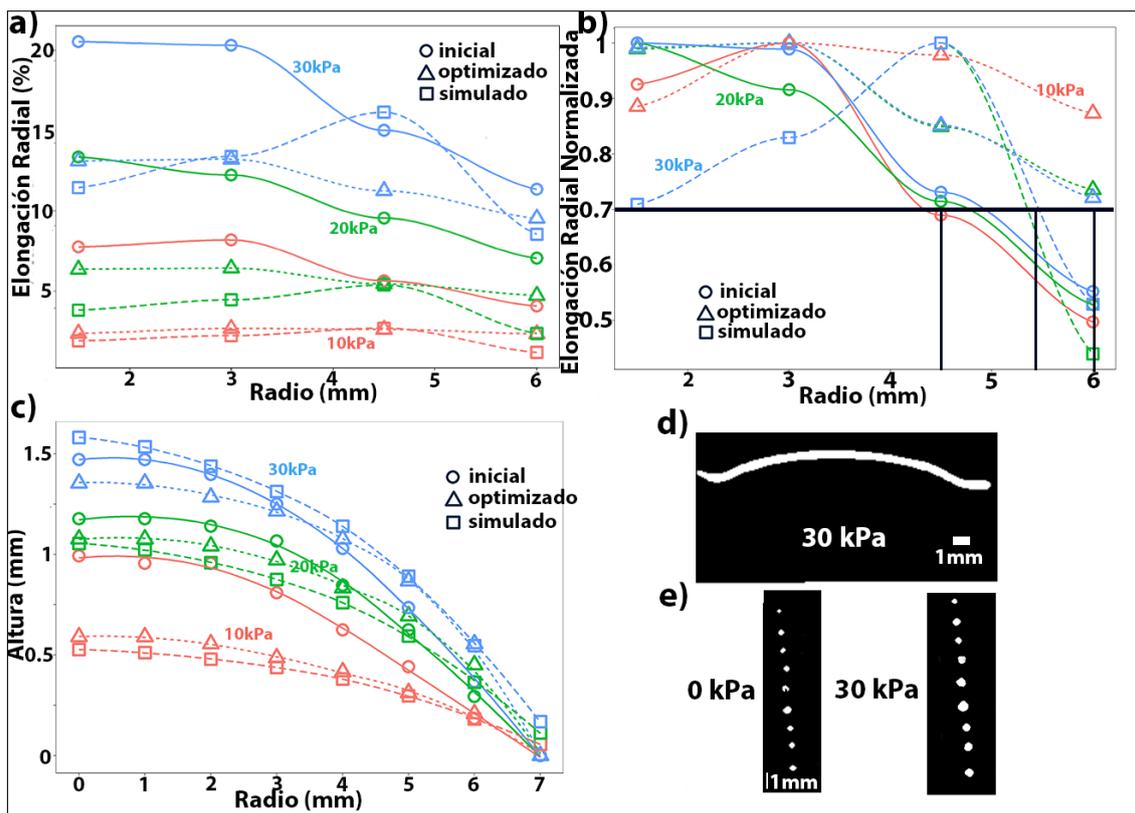


FIGURA 6.17: Análisis del diseño base (círculos), el diseño optimizado fabricado (triángulos) y el simulado (cuadrados). a) Gráfica de elongaciones radiales, b) gráfica de elongaciones radiales normalizadas, c) perfil de la vista lateral del pocillo a diferentes presiones neumáticas, d) ejemplo de imagen filtrada usando detección de bordes de la inflación de la membrana optimizada para cultivo celular y e) ejemplo de imagen procesada del conjunto de marcas a 0 y 30 kPa para el cálculo de las elongaciones radiales. Los dos diseños fueron fabricados con el material Sylgard 184.

### Esfuerzos Cortantes: Comparación entre el diseño optimizado y el diseño base

Finalmente, se realiza una comparación entre los campos mecánicos de esfuerzos cortantes obtenidos en la superficie celular de un micropocillo en el diseño base (ver Fig. 6.2) y en el diseño optimizado (ver Fig. 6.4). De acuerdo a lo presentado en el capítulo de la Metodología, esto se realiza mediante la comparación de los resultados computacionales empleando el análisis por el método de elementos finitos.

En la Figura 6.18, se observan estos dos campos de esfuerzos cortantes normalizados generados por estos dos diseños. Se eligieron dos límites: 0.7 (primera atenuación de la magnitud máxima) y 0.5 (segunda atenuación de la magnitud

máxima) como umbrales mínimos. El umbral de 0.7 está representado por la línea continua verde y el umbral de 0.5 por la línea continua negra. Se observa aproximadamente que en la Figura 6.18a se tiene un área de  $25 \text{ mm}^2$  y en la Figura 6.18b un área de  $63 \text{ mm}^2$ . Con estos valores aproximados se puede concluir que se obtiene un incremento al 250%.

Además de este incremento también se compara la magnitud máxima de esfuerzo cortante que se puede desarrollar. En el caso del diseño base (sin optimizar) se obtiene del cálculo computacional que el máximo valor del esfuerzo cortante es  $0.00259\mu$  y para el caso del diseño optimizado es de  $0.05465\mu$ ; donde  $\mu$  es la viscosidad dinámica del fluido. Se obtuvo un incremento de aproximadamente 21 veces el valor inicial.

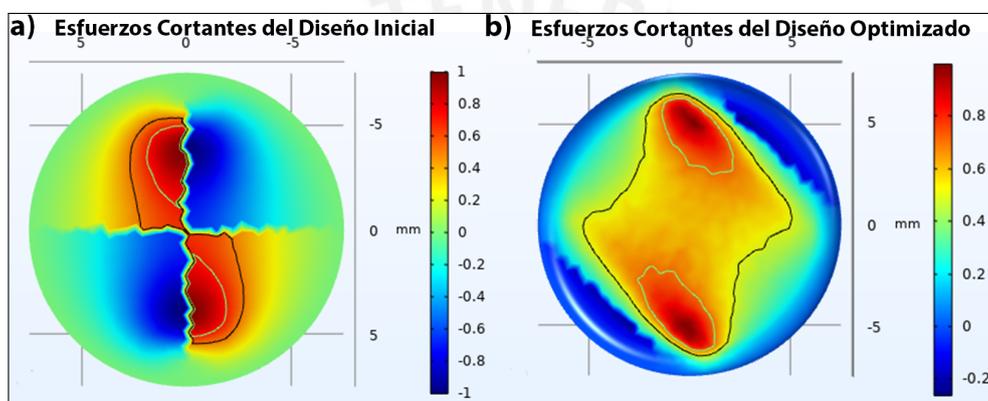


FIGURA 6.18: Comparación entre la magnitud del campo de esfuerzos cortantes. En los dos casos, los valores resultantes fueron normalizados para mejor comparación de resultados y además se tiene un umbral mínimo de 0.7 (línea verde) y 0.5 (línea negra). a) Campo de esfuerzos en el diseño sin optimizar y b) campo de esfuerzos en el diseño optimizado.

#### 6.4. Análisis del Material Usado para el Componente del Módulo de Pocillos de la Plataforma

En el capítulo anterior se menciona que el material elegido para las pruebas es de tipo polímero elastómero. De acuerdo a las especificaciones técnicas del producto adquirido, el material posee una resistencia térmica de hasta al menos  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Sin embargo, se realizaron estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y de ensayos de tracción, con el fin de comprobar que ni la síntesis, la fabricación, curado ni autoclavado afecten esta propiedad.

### 6.4.1. Ensayo por calorimetría diferencial de barrido

En primer lugar, se analizó mediante el ensayo de calorimetría diferencial de barrido la resistencia térmica del material a la degradación. Para esto, el primer material analizado es el RTV1500, ya que no posee hoja de datos, para este polímero se ensayaron tres diferentes técnicas de síntesis. La primera síntesis fue la convencional, usando relaciones de 1:1 en masa y con la aplicación de vacío, -0.95 bar (ver Figura 6.19), en la segunda síntesis se usó la relación 1:1 en masa y sin la aplicación de vacío (ver Figura 6.20), y en la tercera se usó una relación inexacta en masa y sin el uso del sistema de vacío (Figura 6.21).

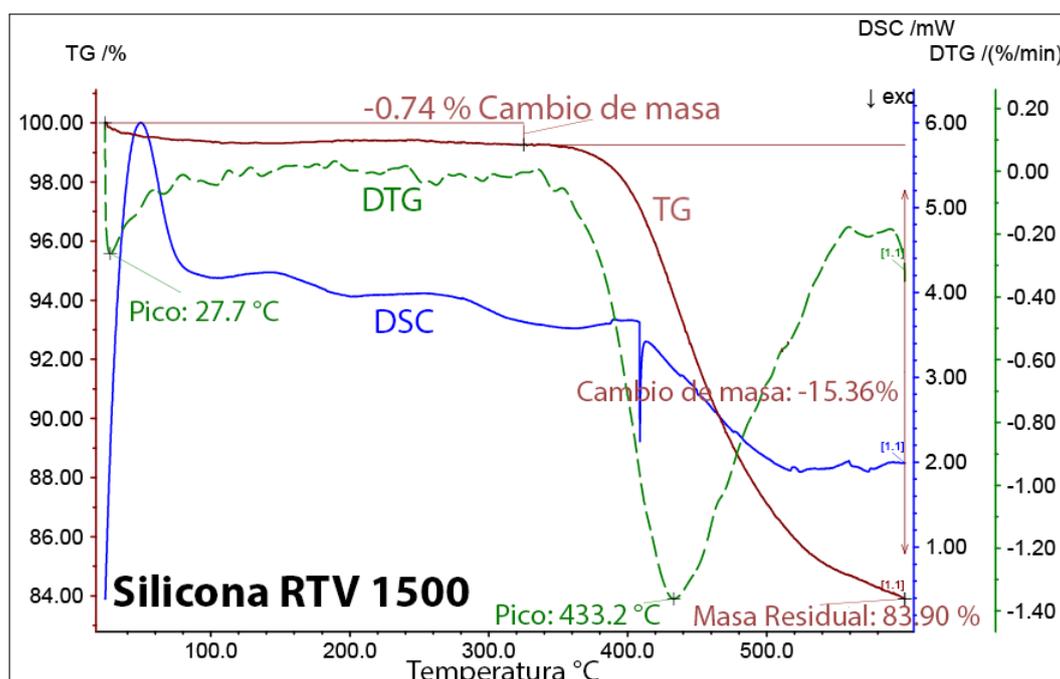


FIGURA 6.19: Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido del polímero RTV1500, sintetizado en relación 1:1 en masa y a un vacío de -0.95 bar. Se observa una variación de -0.74% a aproximadamente 320 °C.

De las Fig. 6.19, 6.20 y 6.21 se concluye que la síntesis polimérica del RTV1500 con relación de masa 1:1 realizada con balanza analítica y con vacío de -0.95 bar logra mejor resistencia térmica; para este caso se obtiene un decaimiento en masa de 0.74% a aproximadamente 320 °C. Este procedimiento de síntesis es el que es usado en el proceso de fabricación final, debido a que el proceso de esterilización indicado para el producto es el de autoclavado el cual genera un ambiente de aproximadamente 120 °C.

En otro sentido, también se realizó el ensayo de Calorimetría Diferencial de Barrido del material Sylgard 184. En este caso, la preparación de este material fue usando una proporción en peso de 20 a 1 (mencionado anteriormente) y en

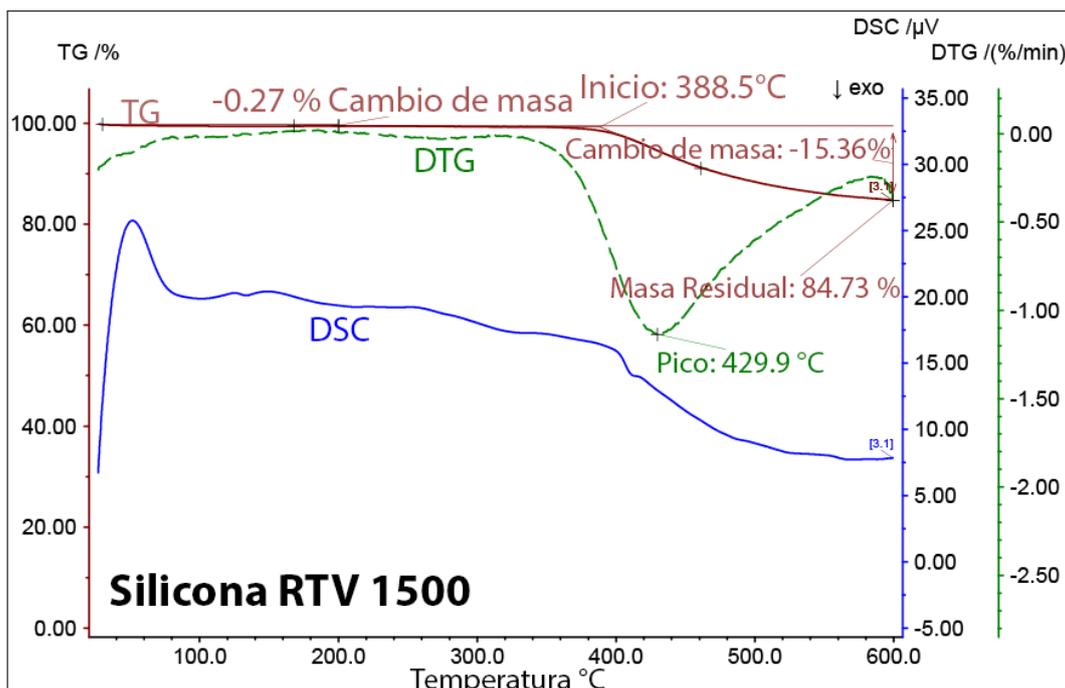


FIGURA 6.20: Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido del polímero RTV1500, sintetizado en relación 1:1 en masa sin vacío. Se observa una variación de -0.27 % en masa a aproximadamente 200 °C.

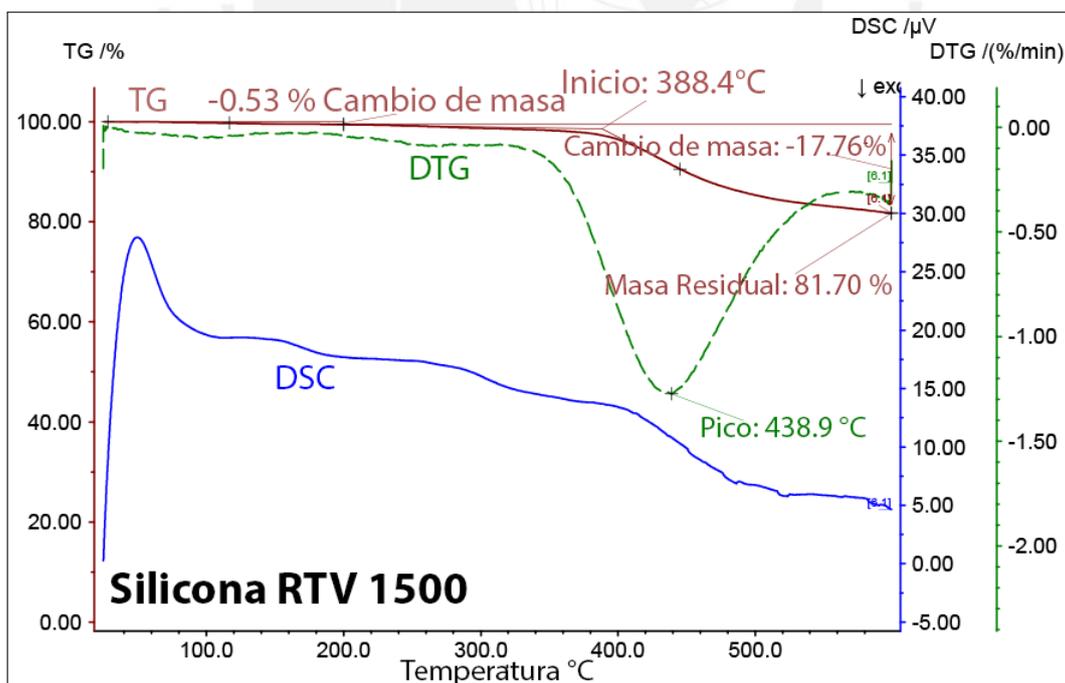


FIGURA 6.21: Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido del polímero RTV1500, sintetizado en relación random en masa al vacío. Se observa una variación de -0.53 % en masa a aproximadamente 200 °C.

vacío de -0.95 bar (debido a los resultados obtenidos en el caso del RTV1500). La comparación se realizó entre el polímero autoclavado y no autoclavado cuyos resultados se muestran en las curvas de la Fig. 6.22.

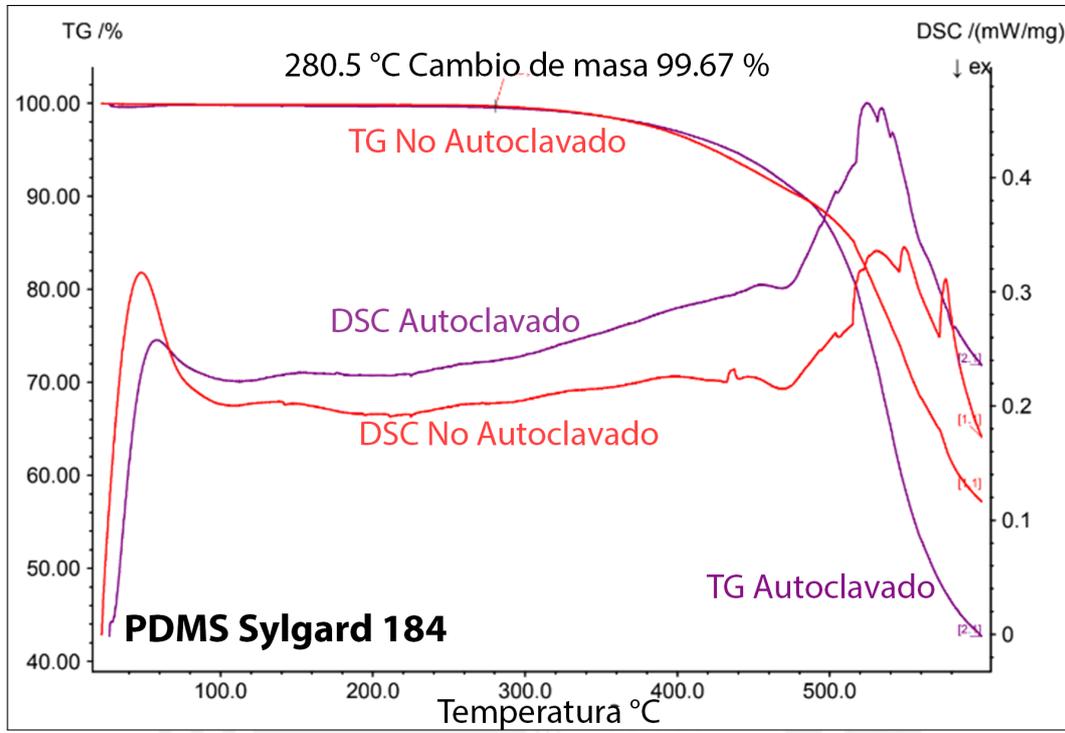


FIGURA 6.22: Resultados de Calorimetría Diferencial de Barrido del material Sylgard 184 antes (línea roja) y después (línea morada) del autoclavado.

#### 6.4.2. Ensayo de transparencia

Se requiere que el sistema propuesto tenga la suficiente transparencia para poder usarse con microscopía. Por ello, se comparó, cualitativamente, la transparencia de los dos materiales: Sylgard 184 y RTV1500, usando el microscopio vertical óptico Olympus CX31. Para esto, como punto de análisis se usa un punto de tinta de plumón permanente. En la Fig. 6.23 se muestran los resultados obtenidos donde se observa menor opacidad en la plataforma fabricada de Sylgard 184.

### 6.5. Ensayos de Esterilidad

Luego de realizar la evaluación visual de los dos materiales (Sylgard 184 y RTV 1500), se decidió trabajar con el material Sylgard 184 debido a su menor

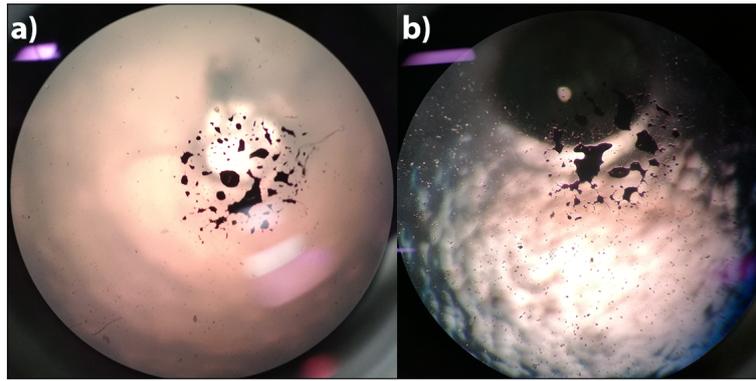


FIGURA 6.23: Análisis de Transparencia. a) Material RTV1500, b) material Sylgard 184.

opacidad. Entonces, se procedió a realizar las evaluaciones de esterilidad de este y de los materiales componentes de las piezas que intervienen en la fabricación del sistema de microtitulación propuesto.

Primero, se definió el protocolo de esterilización adecuado para estos materiales. Cabe mencionar que siguiendo la norma ISO 11737-2, se emplean probetas que tengan los diseños finales o características geométricas similares a la plataforma propuesta. Se probaron tres protocolos de esterilización, los cuales se mencionan a continuación:

- **Protocolo de Esterilización 1:** El primer protocolo probado consiste en la limpieza y desinfección del material. La limpieza consiste en aplicar alcohol isopropílico (IPA, por sus siglas en inglés) a todas las superficies expuestas y dejar por 10 min el elemento bajo una campana de extracción con el objetivo de evaporar el IPA. Luego, se procedió con la desinfección del material. Para esto se sonicó en etanol 70 % por 30 min (1 periodo de 15 min, 1 periodo de enfriamiento de 2 min y 1 periodo de 15 min). Finalmente, se almacenó por dos días a temperatura ambiente en placas Petri previamente estériles y selladas.
- **Protocolo de Esterilización 2:** El segundo protocolo de esterilización consiste en realizar el Protocolo de Esterilización 1 y luego someter el material al proceso de autoclavado (equipo Steelco Tronic) en un programa de DESCONTAMINACIÓN que consiste en una presión máxima de 2 bar y una temperatura de hasta 137 °C.
- **Protocolo de Esterilización 3:** Este protocolo de esterilización incluye el protocolo de esterilización 1 seguido de la exposición de las probetas a los vapores de pastillas de formalina (agente bactericida) en un contenedor herméticamente sellado por al menos seis horas.

Se probaron los protocolos de esterilización anteriormente descritos, y se realizaron dos ensayos cualitativos para comprobar el nivel de esterilidad de las muestras de los distintos materiales. Los ensayos se mencionan a continuación:

- **Ensayo 1:** Se fabricaron dos sistemas de microtitulación 4x6, uno de Sylgard 184 y uno de RTV 1500. Luego, se usaron dos medios de cultivo: Solución en base a DMEM y solución en base a Tryptic Soy Broth en volumen de 500 ul/pocillo. Luego, se procedió a realizar los ensayos en triplicidad en pocillos independientes para cada una de las diferentes configuraciones de material y medio. Después de 48 horas se midió la densidad óptica de cada uno de estos medios. El equipo usado para este ensayo es Eppendorf BioPhotometer® D30.
- **Ensayo 2:** Análisis microbiológico de superficies mediante hisopado. Este ensayo consiste en realizar el hisopado en las superficies con mayor probabilidad de contaminarse. En la plataforma propuesta se tienen varios materiales entre ellos se encuentran: Sylgard 184, RTV 1500, PTFEN y silicona (material de tubos), Veroclear y PLA. El Ensayo comprende 2 etapas: La primera consiste en el hisopado y la colocación del hisopo en 10 ml de solución en base a Tryptic Soy Broth en tubo Falcon. Luego de 2 días, 1ml del medio resultante es colocado en placas Petri que previamente tienen 20 ml de Agar y luego de otros 2 días se realizó la inspección visual de las placas Petri buscando la existencia de microorganismos.

### **Resultados de los ensayos de esterilidad usando diferentes protocolos de esterilización**

En la siguiente tabla (ver Tabla 6.2) se muestra el resumen de los resultados obtenidos. Cabe resaltar que los materiales PTFEN, PLA, Veroclear y Silicona Manguera fueron analizados bajo el Ensayo 2 debido a que son materiales cuyas probetas para análisis son de dimensiones más grandes que los pocillos en donde se probaría. Adicionalmente, en la Fig. 6.24, se muestran algunos resultados para ejemplificar el resultado del Ensayo 2.

## **6.6. Ensayo de Tracción**

Otro de los ensayos realizados en el material elegido, Sylgard 184, es el ensayo de tracción. Este ensayo se realizó siguiendo la norma ASTM D412 y se ensayaron (en ensayos sextuplicados) el polímero autoclavado y no autoclavado.

TABLA 6.2: Resultados de esterilidad obtenidos por protocolo de acuerdo a cada ensayo de validación. +: Se confirmó esterilidad, -: Se observaron microorganismos, o: Incompatibilidad de ensayo (flotación) o protocolo (el material no resiste el autoclavado).

Material	Ensayo	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Sylgard 184	Ensayo 1	-	+	+
	Ensayo 2	-	+	+
RTV 1500	Ensayo 1	-	+	+
	Ensayo 2	-	+	+
PTFEN	Ensayo 1	o	o	o
	Ensayo 2	-	+	+
PLA	Ensayo 1	o	o	o
	Ensayo 2	-	o	+
Veroclear	Ensayo 1	o	o	o
	Ensayo 2	-	o	+
Silicona Manguera	Ensayo 1	o	o	o
	Ensayo 2	-	+	+

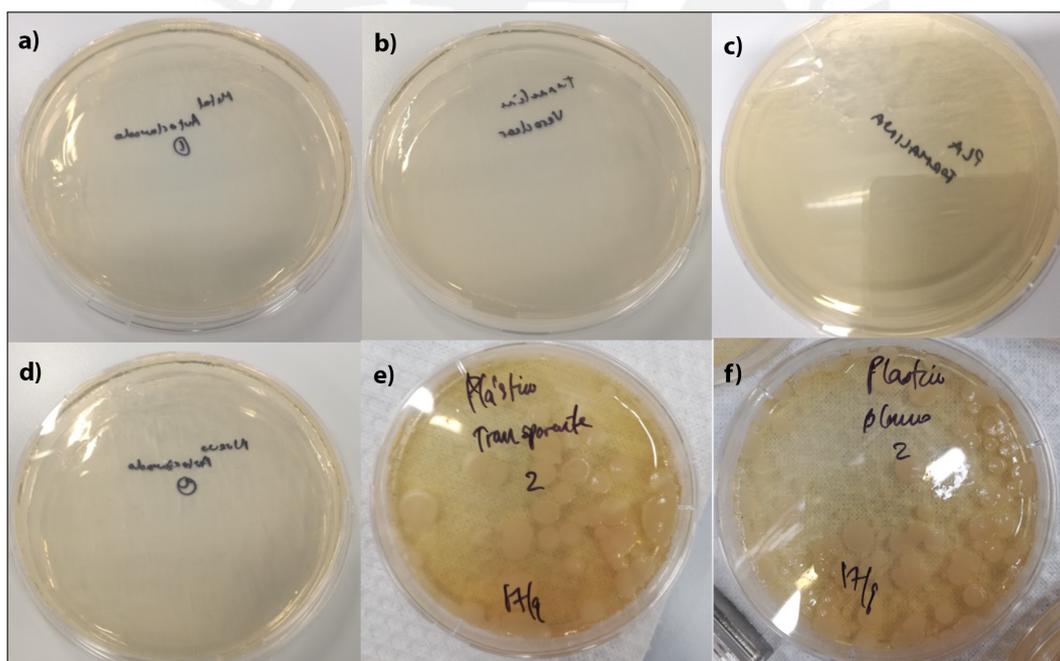


FIGURA 6.24: Ejemplos de resultados del Ensayo 2 usando los protocolos de esterilización presentados anteriormente. a) Acero Inoxidable usando el Protocolo 2, b) Veroclear usando el Protocolo 3, c) PLA usando el Protocolo 3, d) Sylgard 184 usando el protocolo 2, e) Veroclear usando el Protocolo 1, f) PLA usando el Protocolo 1.

En la Fig. 6.25 se presentan los resultados obtenidos, observando que no existe una diferencia notable en las propiedades mecánicas de tracción de este material al ser afectado por el proceso de autoclavado.

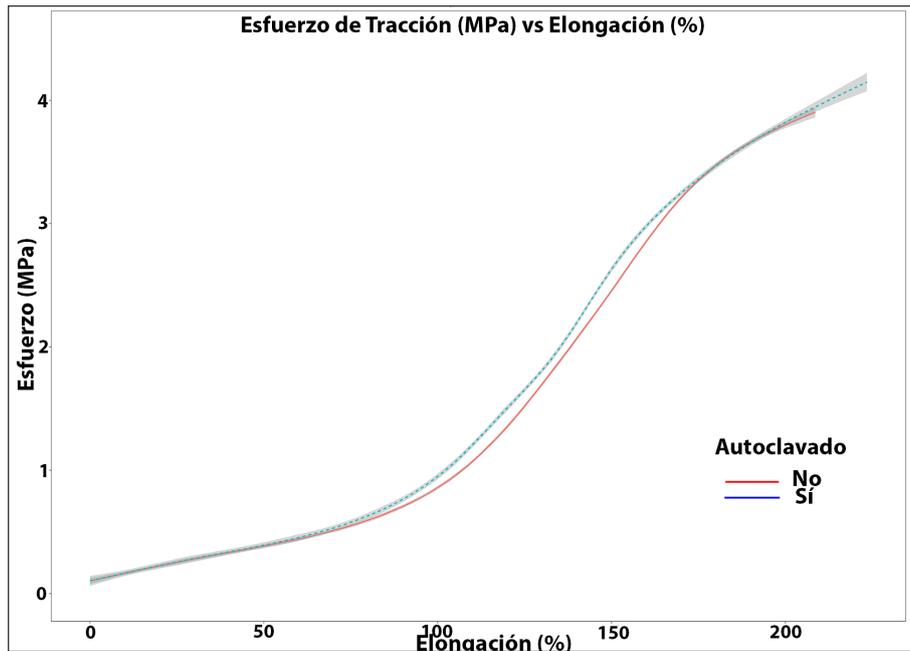


FIGURA 6.25: Ensayo de tracción ASTM D412 del material Sylgard 184 (20:1). Línea roja: Ensayo de Tracción del polímero sin autoclavar. Línea Azul: Ensayo de Tracción del polímero luego del proceso de autoclavado.

## 6.7. Hinchamiento o Swelling

El ensayo de hinchamiento/swelling se realizó con el fin de analizar si es que el material, debido a su porosidad, absorbe moléculas del fluido. En este caso se usó como fluido agua destilada y desionizada, los ensayos se hicieron por triplicado y se incubó por un periodo de tiempo de dos días. La fórmula usada para este ensayo es:  $\frac{w_f - w_i}{w_i} \times 100\%$ . Donde  $w_i$  es el peso inicial de la plataforma y  $w_f$  es el peso final luego del proceso de incubación. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Para la plataforma comercial:  $0.0558 \pm 0.3536\%$ .
- Para la plataforma propuesta Sylgard 184 (Módulo de 12 micropocillos):  $0.0813 \pm 0.3117\%$ .

Se procedió a utilizar la prueba  $t$  de Student para observar si hay una diferencia significativa entre las dos muestras obtenidas. De acuerdo a esto, se obtuvo que el valor de  $t$  es igual a 0.06691 y los grados de libertad son 4; además, se escogió un nivel de significancia de 0.05. Mediante las tablas correspondientes, el umbral para este estudio es 2.78; y comparando este último valor con el valor de  $t$ , se concluye que no hay, estadísticamente hablando, diferencia significativa entre ambas muestras, Es decir, son resultados comparables.

## 6.8. Validación en una Línea Celular Comercial - Viabilidad Celular

Finalmente, la prueba presentada en esta sección conlleva a analizar la viabilidad del sistema, evaluando el efecto de la geometría y material sobre el crecimiento celular. Para lo cual, se usan células suspendidas para no considerar el efecto que tendría el proceso de desadherencia ya que genera estrés en las células y pudieran dar una lectura equivocada en el análisis de viabilidad. Debido a los motivos expuestos anteriormente, se usó una línea celular de células suspendidas: HL 60.

Para las pruebas se usaron dos plataformas de microtitulación: comercial y la propuesta en esta tesis. Se usaron tres micropocillos por cada plataforma en donde se colocó 500  $\mu$ l de medio de cultivo con una concentración inicial de  $1 \times 10^5 \text{ cel/ml}$  y cada micropocillo fue usado para contar por triplicado. El conteo fue realizado luego de 48 horas de iniciado el proceso de cultivo (ver Fig. 6.26).

- Para la plataforma comercial se obtuvo una viabilidad de 82.16 % con una desviación estándar de 10.04 %.
- Para la plataforma propuesta se obtuvo una viabilidad de 84.13 % con una desviación estándar de 9.35 %.

De forma análoga al caso anterior, se realizó la prueba *t* de Student para determinar si hay una diferencia significativa entre las muestras. Para estas, se tiene 16 grados de libertad y un valor *t* de 0.4295. Para un nivel de significancia de 0.05 y mediante el uso de la tabla correspondiente, el umbral para este estudio es 2.12. Entonces, se concluye que los resultados también son comparables.



FIGURA 6.26: Células HL60. a) Día 0, b) día 2 en plataforma comercial y c) día 2 en plataforma propuesta.

## Capítulo 7

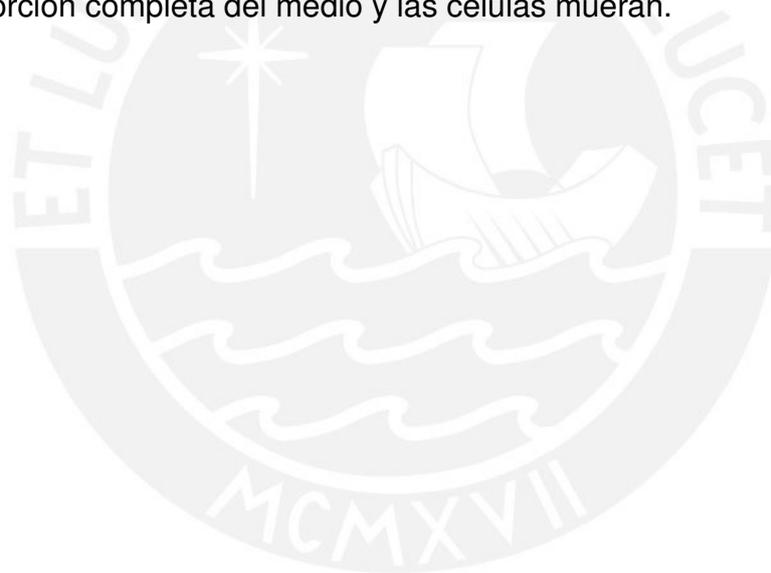
# Conclusiones

Con respecto al diseño usando análisis computacional, experimentos de verificación y validación implementados en este trabajo de tesis, se concluye que:

- El uso de un software de cálculo por elementos finitos y herramientas de optimización topológica permitió el diseño de un sistema de microtitulación, cuyos campos mecánicos de esfuerzos cortantes y elongaciones generados son homogéneos sobre una mayor área en comparación a un diseño estándar. Esto aumenta la población celular que se encontraría bajo las mismas condiciones de cultivo; y por ende, permitirá menor variabilidad de resultados en futuros análisis bioquímicos para estudiar los efectos de los mismos campos mecánicos generados artificialmente durante el crecimiento celular.
- Tanto la silicona de grado alimenticio de la familia RTV (Vulcanizados a Temperatura Ambiente): RTV1500 y el polímero PDMS Sylgard 184 mantienen sus propiedades luego de ser autoclavados gracias a su alta resistencia térmica, de manera que cumplen muy bien este requerimiento. El material Sylgard 184 y el RTV1500 son materiales que son esterilizables usando el Protocolo de Esterilización 2. Por otro lado, los materiales Veroclear y el PLA pueden ser esterilizados usando el Protocolo de Esterilización 3.
- Se observó una coloración del polímero Sylgard 184 al ser utilizado en los ensayos microbiológicos (pruebas de esterilidad) y ensayos biológicos (pruebas de viabilidad celular) que se relaciona con la absorción del medio

de cultivo. Se concluye que esto se debe a la hidrofobicidad de los materiales y del medio de cultivo.

- Entre los materiales estudiados (Sylgard 184 y RTV1500), el material Sylgard brinda mayor transparencia para análisis cuantitativos mediante microscopía. Cabe mencionar que, debido a la altura propuesta de la superficie de cultivo celular del sistema, no fue posible observar a las células HL60 directamente a través del microscopio, pero se realizó de manera indirecta.
- Los ensayos de viabilidad usando las células HL60 y usando como base de comparación un sistema de microtitulación comercial, muestran que tanto la plataforma propuesta como la comercial tienen viabilidades comparables, 83 % aproximadamente. Sin embargo, se observa que en el caso del sistema de microtitulación propuesto hay mayor absorción de medio de cultivo, lo que requiere monitorear el cultivo diariamente para que no se produzca la absorción completa del medio y las células mueran.



## Capítulo 8

# Perspectivas y Trabajo Futuro

Finalmente, se pueden obtener perspectivas y posibles trabajos futuros de este proyecto de tesis, las cuales se enumeran a continuación.

- La metodología de diseño basada en el uso de la optimización topológica presentada en esta tesis tiene como objetivo el incrementar el área de cultivo celular con campos homogéneos de elongaciones y esfuerzos cortantes en sistemas de microtitulación. Sin embargo, es posible extrapolar esta metodología con el fin de obtener diseños de plataformas de cultivo celular que generen elongaciones en una dirección o con patrones espaciales y temporales específicos con el fin de mimetizar el ambiente mecanobiológico encontrado en los sistemas *in vivo*. De forma análoga, se puede seguir la misma metodología para la generación de esfuerzos cortantes específicos.
- Si bien se logró generar elongaciones y esfuerzos cortantes homogéneos en la superficie donde se sembrarán las células, es necesario mejorar la optimización del sistema para que este pueda ser usado directamente bajo microscopía invertida y así evitar el traslado de las células a sistemas de microtitulación comerciales para su análisis, ya que este traslado aumenta el estrés celular generado por los métodos de desadherencia requeridos. Por lo que, para esta mejora, se requiere cambiar el diseño base y añadir un parámetro adicional que permita minimizar la altura de superficie de cultivo. Sin embargo, la plataforma propuesta en esta tesis se acomoda a técnicas de caracterización celular que no requieren transparencia como inmunofluorescencia o espectrofotometría.

- Los elastómeros de silicona usados en esta tesis sirven como soporte estructural, canales de transporte de fluidos o medio de transmisión indirecto de las excitaciones mecánicas. Sin embargo, es posible profundizar en el campo de ingeniería y ciencia de los materiales con el fin de brindarle al material otras características, como por ejemplo, la fabricación de componentes con porosidad controlada [78] o uso de nanomateriales con el fin de aumentar la rugosidad de la superficie de cultivo [79].
- Las pruebas de hinchamiento usando agua destilada y desionizada indicaron que este fenómeno no se produce. Sin embargo, se observa absorción en los pocillos que se usaron para las pruebas de viabilidad, por lo que se requieren más pruebas con otros fluidos, como por ejemplo, el medio de cultivo, ya que este contiene altas concentraciones de proteínas e iones en solución acuosa y, por ende, difiere del fluido usado en las pruebas de esta tesis.
- Las pruebas de cultivo iniciales se realizaron con enterocitos primarios aislados en el laboratorio de ICOBA. Sin embargo, la morfología de estos, luego de 24 horas, era diferente a la observada en un sistema de microtitulación comercial y a la observada en células recién aisladas. Esto sugiere que aún falta optimizar las condiciones del medio de cultivo relacionadas a la interacción bioquímica entre las células sembradas y la superficie del material de cada pocillo y un estudio sobre el pretratamiento más adecuado en esta última para brindarle las características químicas óptimas. Para esto último, existen algunas opciones que pueden ser implementadas y probadas, tales como: Recubrimiento con fibronectina, colágeno o laminina o Tratamiento Superficial con UV o plasma de oxígeno [80].

## Bibliografía

- [1] I. Olabarrieta, B. L'Azou, S. Yuric, J. Cambar y M. Cajaraville, «In vitro effects of cadmium on two different animal cell models,» *Toxicology in Vitro*, vol. 15, n.º 4-5, págs. 511-517, 2001. DOI: 10.1016/s0887-2333(01)00056-x.
- [2] D Hughes, *Cell proliferation & apoptosis*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2003, ISBN: 9781859961933.
- [3] R. T. Wall, L. A. Harker, L. J. Quadracci y G. E. Striker, «Factors influencing endothelial cell proliferation in vitro,» *Journal of Cellular Physiology*, vol. 96, n.º 2, págs. 203-213, 1978. DOI: 10.1002/jcp.1040960209.
- [4] A. I. McClatchey y A. S. Yap, «Contact inhibition (of proliferation) redux,» *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 24, n.º 5, págs. 685-694, 2012. DOI: 10.1016/j.ccb.2012.06.009.
- [5] M. Al-Rubeai y R. P. Singh, «Apoptosis in cell culture,» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 9, n.º 2, págs. 152-156, 1998. DOI: 10.1016/s0958-1669(98)80108-0.
- [6] K. Vermeulen, Z. N. Berneman y D. R. V. Bockstaele, «Cell cycle & apoptosis,» *Cell Proliferation*, vol. 36, n.º 3, págs. 165-175, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x.
- [7] K. S. Kang, S.-J. Lee, H. Lee, W. Moon y D.-W. Cho, «Effects of combined mechanical stimulation on the proliferation and differentiation of pre-osteoblasts,» *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 43, n.º 6, pág. 367, 2011. DOI: 10.3858/emm.2011.43.6.040.

- [8] A. Grossi, K. Yadav y M. A. Lawson, «Mechanical stimulation increases proliferation, differentiation and protein expression in culture: Stimulation effects are substrate dependent,» *Journal of Biomechanics*, vol. 40, n.º 15, págs. 3354-3362, 2007. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2007.05.007.
- [9] M. Ding, H. Andersson, S. Martinsson, A. Sabirsh, A. Jonebring, Q.-D. Wang, A. T. Plowright y L. Drowley, «Aligned nanofiber scaffolds improve functionality of cardiomyocytes differentiated from human induced pluripotent stem cell-derived cardiac progenitor cells,» *Scientific Reports*, vol. 10, n.º 1, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70547-4.
- [10] D. Dado, M. Sagi, S. Levenberg y A. Zemel, «Mechanical control of stem cell differentiation,» *Regenerative Medicine*, vol. 7, n.º 1, págs. 101-116, 2012. DOI: 10.2217/rme.11.99.
- [11] P. Urdeix y M. H. Doweidar, «Mechanical stimulation of cell microenvironment for cardiac muscle tissue regeneration: a 3D in-silico model,» *Computational Mechanics*, vol. 66, n.º 4, págs. 1003-1023, 2020. DOI: 10.1007/s00466-020-01882-6.
- [12] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells*. John Wiley y Sons, Inc., 2010. DOI: 10.1002/9780470649367.
- [13] B. Quinn, «Preparation and Maintenance of Live Tissues and Primary Cultures for Toxicity Studies,» en *Biochemical Ecotoxicology*, Elsevier, 2014, págs. 33 -47. DOI: 10.1016/b978-0-12-411604-7.00003-9.
- [14] Thermofisher Scientific, *Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture*, 2020. dirección: {<https://www.thermofisher.com/pe/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>}.
- [15] ATCC®, *HL-60 (ATCC® CCL-240™)*, 2020. dirección: {<https://www.atcc.org/products/all/CCL-240.aspx{\#}documentation>}.
- [16] S. Huang y D. E. Ingber, «The structural and mechanical complexity of cell-growth control,» *Nature Cell Biology*, vol. 1, n.º 5, E131-E138, 1999. DOI: 10.1038/13043.
- [17] M. T. A. Saif, C. R. Sager y S. Coyer, «Functionalized Biomicroelectromechanical Systems Sensors for Force Response Study at Local Adhesion Sites of Single Living Cells on Substrates,» *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 31, n.º 8, págs. 950-961, 2003. DOI: 10.1114/1.1591189.

- [18] A. Khalili y M. Ahmad, «A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, n.º 8, págs. 18 149-18 184, 2015. DOI: 10.3390/ijms160818149.
- [19] J. Haycock, *3D cell culture : methods and protocols*. New York, NY: Humana Press, 2011, ISBN: 9781607619840.
- [20] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong y M. Xing, «3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances,» *Bioactive Materials*, vol. 3, n.º 2, págs. 144-156, 2018. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008.
- [21] F. J. O'Brien, «Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,» *Materials Today*, vol. 14, n.º 3, págs. 88-95, 2011. DOI: 10.1016/s1369-7021(11)70058-x.
- [22] International Standard Organization, *ISO 11737-2, Sterilization of health care products -Microbiological methods - Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process*, 2019.
- [23] Association for the Advancement of Medical Instrumentation, *AAMI TIR17, Compatibility of materials subject to sterilization*, 2017.
- [24] International Standard Organization, *ISO 11138-7, Sterilization of health care products -Biological indicators - Part 7: Guidance for the selection, use and interpretation of results*.
- [25] K Chiba, K Kawakami y K Tohyama, «Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells,» *Toxicology in Vitro*, vol. 12, n.º 3, págs. 251-258, 1998. DOI: 10.1016/s0887-2333(97)00107-0.
- [26] International Organization for Standardization, *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, 2017.
- [27] A. Zare Mirakabadi, Z. Shahramyar, H. Morovvati, M. Lotfi y A. Nouri, «Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cell Line (HL60) by Animal's Venom Derived Peptides (ICD-85).,» *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, vol. 11, págs. 931-938, 3 2012, ISSN: 1735-0328, ppublish.
- [28] C. Michiels, «Endothelial cell functions,» *Journal of Cellular Physiology*, vol. 196, n.º 3, págs. 430-443, 2003. DOI: 10.1002/jcp.10333.
- [29] C. P. Gayer y M. D. Basson, «The effects of mechanical forces on intestinal physiology and pathology,» *Cellular Signalling*, vol. 21, n.º 8, págs. 1237-1244, 2009. DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.02.011.

- [30] N. R. Chevalier, T.-M. de Witte, A. J. M. Cornelissen, S. Dufour, V. Proux-Gillardeaux y A. Asnacios, «Mechanical Tension Drives Elongational Growth of the Embryonic Gut,» *Scientific Reports*, vol. 8, n.º 1, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-24368-1.
- [31] D. E. Ingber, «Cellular Basis of Mechanotransduction,» *The Biological Bulletin*, vol. 194, n.º 3, págs. 323-327, 1998. DOI: 10.2307/1543102.
- [32] E. Canty y K. Kadler, «Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights,» *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, vol. 133, n.º 4, págs. 979-985, 2002. DOI: 10.1016/s1095-6433(02)00212-x.
- [33] M. Lukashov, «ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour,» *Trends in Cell Biology*, vol. 8, n.º 11, págs. 437-441, 1998. DOI: 10.1016/s0962-8924(98)01362-2.
- [34] M. A. Schwartz y D. W. DeSimone, «Cell adhesion receptors in mechanotransduction,» *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 20, n.º 5, págs. 551-556, 2008. DOI: 10.1016/j.cceb.2008.05.005.
- [35] D. E. Jaalouk y J. Lammerding, «Mechanotransduction gone awry,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, n.º 1, págs. 63-73, 2009. DOI: 10.1038/nrm2597.
- [36] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney y D. E. Discher, «Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification,» *Cell*, vol. 126, n.º 4, págs. 677-689, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [37] L. Yin, H. Bien y E. Entcheva, «Scaffold topography alters intracellular calcium dynamics in cultured cardiomyocyte networks,» *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 287, n.º 3, H1276-H1285, 2004. DOI: 10.1152/ajpheart.01120.2003.
- [38] H. Miyoshi y T. Adachi, «Topography Design Concept of a Tissue Engineering Scaffold for Controlling Cell Function and Fate Through Actin Cytoskeletal Modulation,» *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 20, n.º 6, págs. 609-627, 2014. DOI: 10.1089/ten.teb.2013.0728.
- [39] A. Zareidoost, M. Yousefpour, B. Ghaseme y A. Amanzadeh, «The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium,» *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 23, n.º 6, págs. 1479-1488, 2012. DOI: 10.1007/s10856-012-4611-9.

- [40] B. Zhou, X. Gao, C. Wang, Z. Ye, Y. Gao, J. Xie, X. Wu y W. Wen, «Functionalized PDMS with Versatile and Scalable Surface Roughness Gradients for Cell Culture,» *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 7, n.º 31, págs. 17181-17187, 2015. DOI: 10.1021/acsami.5b04032.
- [41] A. M. Ross, Z. Jiang, M. Bastmeyer y J. Lahann, «Physical Aspects of Cell Culture Substrates: Topography, Roughness, and Elasticity,» *Small*, vol. 8, n.º 3, págs. 336-355, 2011. DOI: 10.1002/smll.201100934.
- [42] M. Lotfi-Tokaldany, S. Majidi, F. Nikdoust, Z. S. Roomi, M. Sheikhfathollahi y H. Sadeghian, «Normal Values for Longitudinal Tissue Velocity and Strain Rate Imaging in Individual Segments of the Left and Right Ventricles of Healthy Adult Hearts,» *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 32, n.º 3, págs. 463-474, 2013. DOI: 10.7863/jum.2013.32.3.463.
- [43] E. Roan y C. M. Waters, «What do we know about mechanical strain in lung alveoli?» *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 301, n.º 5, págs. L625-L635, 2011. DOI: 10.1152/ajplung.00105.2011.
- [44] R. Maiti, L.-C. Gerhardt, Z. S. Lee, R. A. Byers, D. Woods, J. A. Sanz-Herrera, S. E. Franklin, R. Lewis, S. J. Matcher y M. J. Carré, «In vivo measurement of skin surface strain and sub-surface layer deformation induced by natural tissue stretching,» *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 62, págs. 556-569, 2016. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.05.035.
- [45] W. R. Legant, J. S. Miller, B. L. Blakely, D. M. Cohen, G. M. Genin y C. S. Chen, «Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices,» *Nature Methods*, vol. 7, n.º 12, págs. 969-971, 2010. DOI: 10.1038/nmeth.1531.
- [46] N. Gjorevski, N. Sachs, A. Manfrin, S. Giger, M. E. Bragina, P. Ordóñez-Morán, H. Clevers y M. P. Lutolf, «Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture,» *Nature*, vol. 539, n.º 7630, págs. 560-564, 2016. DOI: 10.1038/nature20168.
- [47] H. Gerardo, A. Lima, J. Carvalho, J. R. D. Ramos, S. Couceiro, R. D. M. Travasso, R. P. das Neves y M. Grãos, «Soft culture substrates favor stem-like cellular phenotype and facilitate reprogramming of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) through mechanotransduction,» *Scientific Reports*, vol. 9, n.º 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-45352-3.

- [48] A. R. A. Fattah y A. Ranga, «Nanoparticles as Versatile Tools for Mechano-transduction in Tissues and Organoids,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00240.
- [49] C. M. Costello, J. Hongpeng, S. Shaffiey, J. Yu, N. K. Jain, D. Hackam y J. C. March, «Synthetic small intestinal scaffolds for improved studies of intestinal differentiation,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 111, n.º 6, págs. 1222 -1232, 2014. DOI: 10.1002/bit.25180.
- [50] J. Creff, R. Courson, T. Mangeat, J. Foncy, S. Souleille, C. Thibault, A. Besson y L. Malaquin, «Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography,» *Biomaterials*, vol. 221, pág. 119404, 2019. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119404.
- [51] A. D. Doyle, F. W. Wang, K. Matsumoto y K. M. Yamada, «One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration,» *Journal of Cell Biology*, vol. 184, n.º 4, págs. 481-490, 2009. DOI: 10.1083/jcb.200810041.
- [52] Y. Wang, A. A. Ahmad, C. E. Sims, S. T. Magness y N. L. Allbritton, «In vitro generation of colonic epithelium from primary cells guided by microstructures,» *Lab Chip*, vol. 14, n.º 9, págs. 1622-1631, 2014. DOI: 10.1039/c3lc51353j.
- [53] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton y D. E. Ingber, «Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow,» *Lab on a Chip*, vol. 12, n.º 12, pág. 2165, 2012. DOI: 10.1039/c2lc40074j.
- [54] C. M. Costello, M. B. Phillipsen, L. M. Hartmanis, M. A. Kwasnica, V. Chen, D. Hackam, M. W. Chang, W. E. Bentley y J. C. March, «Microscale Bioreactors for in situ characterization of GI epithelial cell physiology,» *Scientific Reports*, vol. 7, n.º 1, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-12984-2.
- [55] R. Sinha, S. L. Gac, N. Verdonschot, A. van den Berg, B. Koopman y J. Rouwkema, «A medium throughput device to study the effects of combinations of surface strains and fluid-flow shear stresses on cells,» *Lab on a Chip*, vol. 15, n.º 2, págs. 429-439, 2015. DOI: 10.1039/c4lc01259c.
- [56] P. Shah, J. V. Fritz, E. Glaab, M. S. Desai, K. Greenhalgh, A. Frchet, M. Niegowska, M. Estes, C. Jäger, C. Seguin-Devauux, F. Zenhausern y P.

- Wilmes, «A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human–microbe interface,» *Nature Communications*, vol. 7, n.º 1, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11535.
- [57] H. Kamble, M. J. Barton, M. Jun, S. Park y N.-T. Nguyen, «Cell stretching devices as research tools: engineering and biological considerations,» *Lab on a Chip*, vol. 16, n.º 17, págs. 3193-3203, 2016. DOI: 10.1039/c6lc00607h.
- [58] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin y D. E. Ingber, «Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip,» *Science*, vol. 328, n.º 5986, págs. 1662-1668, 2010. DOI: 10.1126/science.1188302.
- [59] S. Deguchi, S. Kudo, T. S. Matsui, W. Huang y M. Sato, «Piezoelectric actuator-based cell microstretch device with real-time imaging capability,» *AIP Advances*, vol. 5, n.º 6, pág. 067110, 2015. DOI: 10.1063/1.4922220.
- [60] J. Kreutzer, L. Ikonen, J. Hirvonen, M. Pekkanen-Mattila, K. Aalto-Setälä y P. Kallio, «Pneumatic cell stretching system for cardiac differentiation and culture,» *Medical Engineering and Physics*, vol. 36, n.º 4, págs. 496-501, 2014. DOI: 10.1016/j.medengphy.2013.09.008.
- [61] M. Kasendra, A. Tovaglieri, A. Sontheimer-Phelps, S. Jalili-Firoozinezhad, A. Bein, A. Chalkiadaki, W. Scholl, C. Zhang, H. Rickner, C. A. Richmond, H. Li, D. T. Breault y D. E. Ingber, «Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids,» *Scientific Reports*, vol. 8, n.º 1, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-21201-7.
- [62] F. Zhao, J. Kreutzer, S. Pajunen y P. Kallio, «Mechanical Analysis of a Pneumatically Actuated Concentric Double-Shell Structure for Cell Stretching,» *Micromachines*, vol. 5, n.º 4, págs. 868-885, 2014. DOI: 10.3390/mi5040868.
- [63] Flexcell International Corporation, *Cell Stretching Bioreactors*, 2020. dirección: {<https://www.flexcellint.com/>}.
- [64] S. Dhein, A. Schreiber, S. Steinbach, D. Apel, A. Salameh, F. Schlegel, M. Kostelka, P. M. Dohmen y F. W. Mohr, «Mechanical control of cell biology. Effects of cyclic mechanical stretch on cardiomyocyte cellular organization,» *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 115, n.º 2-3, págs. 93-102, 2014. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.006.
- [65] R. Saito, T. Kajihara, M. Takamura, H. Tochigi, T. Sato y O. Ishihara, «High stretch cycling inhibits the morphological and biological decidual process in human endometrial stromal cells,» *Reproductive Medicine and Biology*, vol. 19, n.º 4, págs. 378-384, 2020. DOI: 10.1002/rmb2.12341.

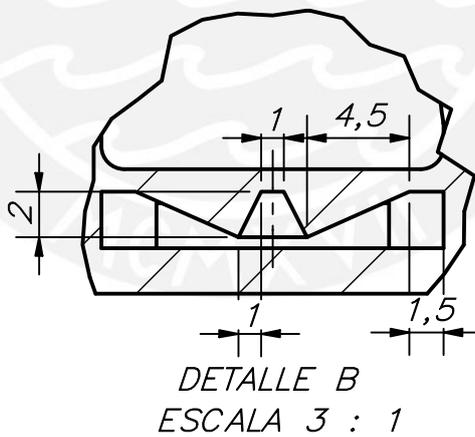
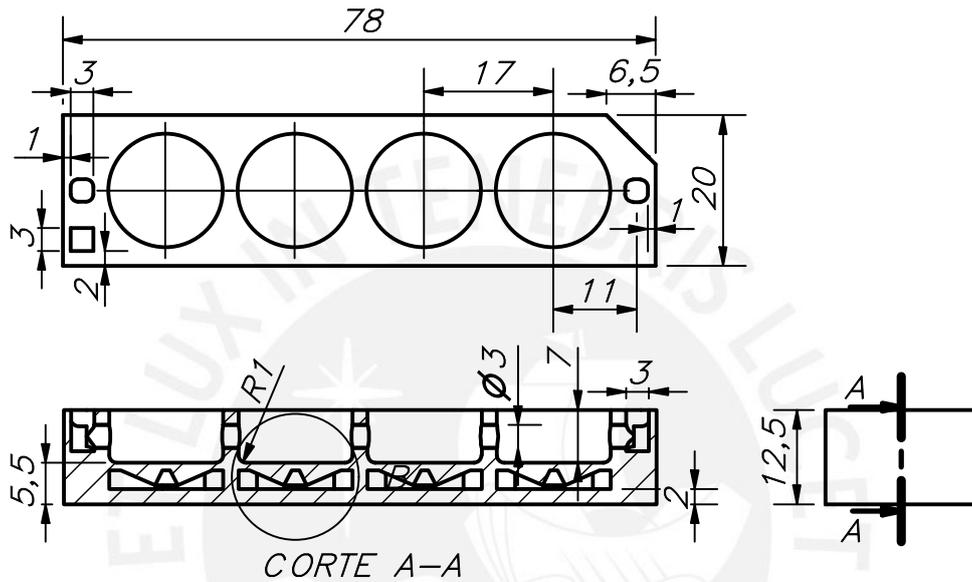
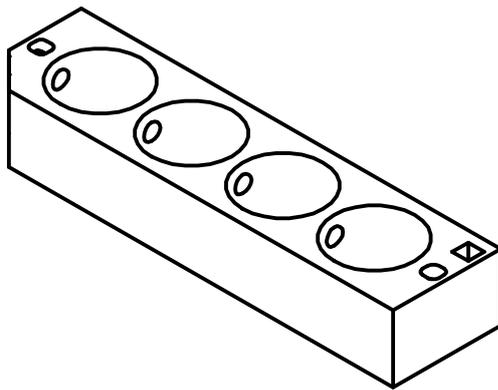
- [66] S. USA, *Cell Stretching Systems*, 2020. dirección: <https://strexcell.com/cell-stretching-system/>.
- [67] L Matheson, N. J. Fairbank, G Maksym, J. P. Santerre y R Labow, «Characterization of the Flexcell™ Uniflex™ cyclic strain culture system with U937 macrophage-like cells,» *Biomaterials*, vol. 27, n.º 2, págs. 226-233, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.070.
- [68] J. Gilbert, P. Weinhold, A. Banes, G. Link y G. Jones, «Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro,» *Journal of Biomechanics*, vol. 27, n.º 9, págs. 1169 -1177, 1994. DOI: 10.1016/0021-9290(94)90057-4.
- [69] C. P. Ursekar, S.-K. Teo, H. Hirata, I. Harada, K.-H. Chiam e Y. Sawada, «Design and Construction of an Equibiaxial Cell Stretching System That Is Improved for Biochemical Analysis,» *PLoS ONE*, vol. 9, n.º 3, A. J. Kabla, ed., e90665, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0090665.
- [70] V. Vogel y M. Sheetz, «Local force and geometry sensing regulate cell functions,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, n.º 4, págs. 265-275, 2006. DOI: 10.1038/nrm1890.
- [71] J. Eyckmans, T. Boudou, X. Yu y C. S. Chen, «A Hitchhiker's Guide to Mechanobiology,» *Developmental Cell*, vol. 21, n.º 1, págs. 35-47, 2011. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.06.015.
- [72] American National Standard Institute, *NSI SLAS 1-2004 (R2012) for Microplates -Footprint Dimensions*, 2011.
- [73] S. J. COLLINS, R. C. GALLO y R. E. GALLAGHER, «Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture,» *Nature*, vol. 270, n.º 5635, págs. 347-349, 1977. DOI: 10.1038/270347a0.
- [74] J. Liu, H. Zheng, P. Poh, H.-G. Machens y A. Schilling, «Hydrogels for Engineering of Perfusable Vascular Networks,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, n.º 7, págs. 15997-16016, 2015. DOI: 10.3390/ijms160715997.
- [75] I. D. Johnston, D. K. McCluskey, C. K. L. Tan y M. C. Tracey, «Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering,» *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 24, n.º 3, pág. 035017, 2014. DOI: 10.1088/0960-1317/24/3/035017.

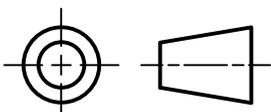
- [76] E. Gutierrez y A. Groisman, «Measurements of Elastic Moduli of Silicone Gel Substrates with a Microfluidic Device,» *PLoS ONE*, vol. 6, n.º 9, J. Langowski, ed., e25534, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025534.
- [77] Image Analyst - Mathworks, *Image Segmentation Tutorial*, 2015. dirección: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/25157-image-segmentation-tutorial?focused=03921bd7-efd5-7879-34b8-900682f73608&tab=function>.
- [78] Q. Li, T. Duan, J. Shao y H. Yu, «Fabrication method for structured porous polydimethylsiloxane (PDMS),» *Journal of Materials Science*, vol. 53, n.º 16, págs. 11 873-11 882, 2018. DOI: 10.1007/s10853-018-2396-z.
- [79] H. Hashemzadeh, A. Allahverdi, M. Sedghi, Z. Vaezi, T. T. Moghadam, M. Rothbauer, M. B. Fischer, P. Ertl y H. Naderi-Manesh, «PDMS Nano-Modified Scaffolds for Improvement of Stem Cells Proliferation and Differentiation in Microfluidic Platform,» *Nanomaterials*, vol. 10, n.º 4, pág. 668, 2020. DOI: 10.3390/nano10040668.
- [80] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gómez-Sjöberg y R. M. Fleming, «Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 63, págs. 218-231, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029.

## **Apéndice A**

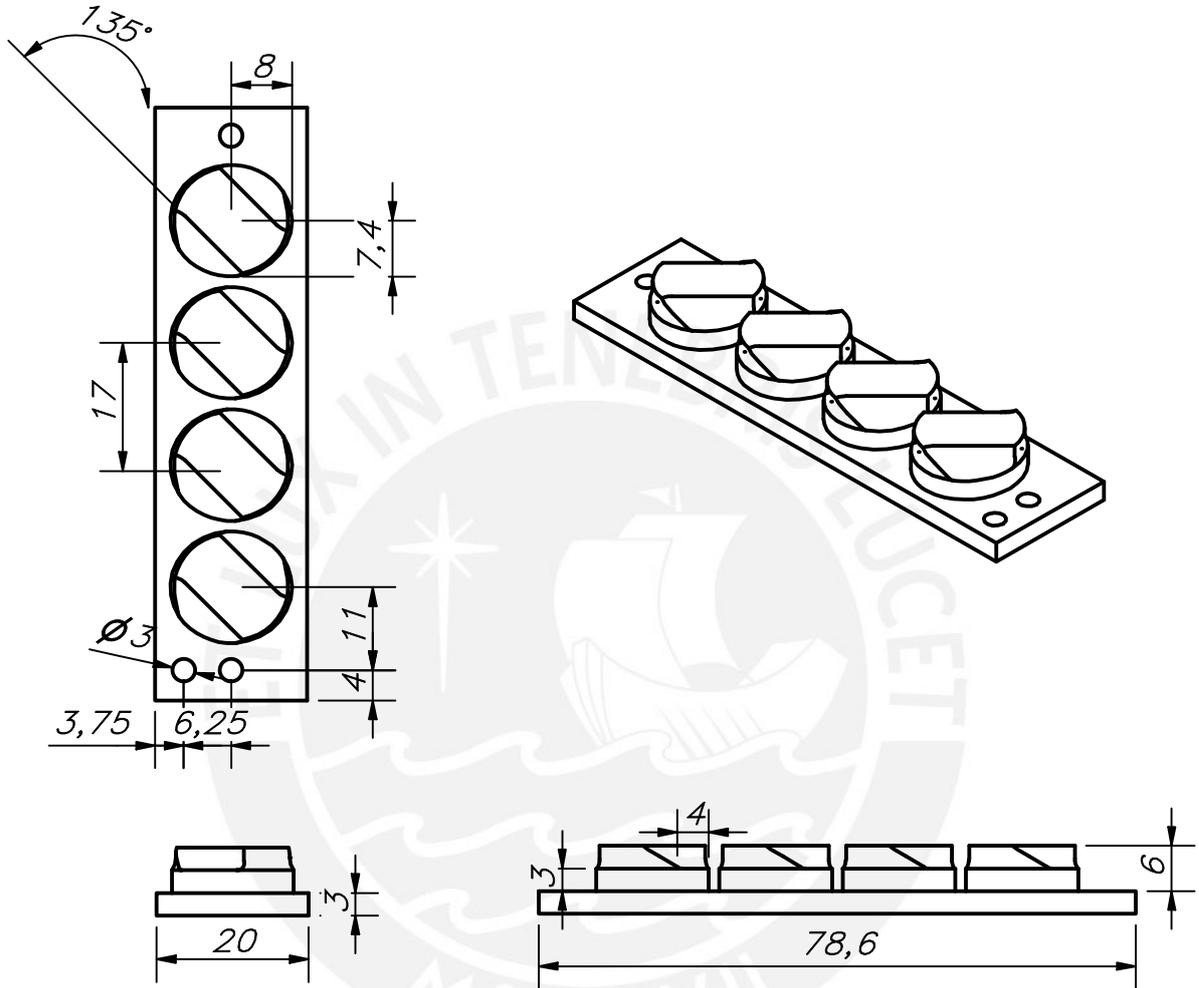
# **Planos del Sistema de Microtitulación Propuesto**

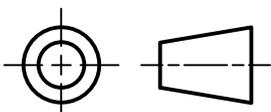




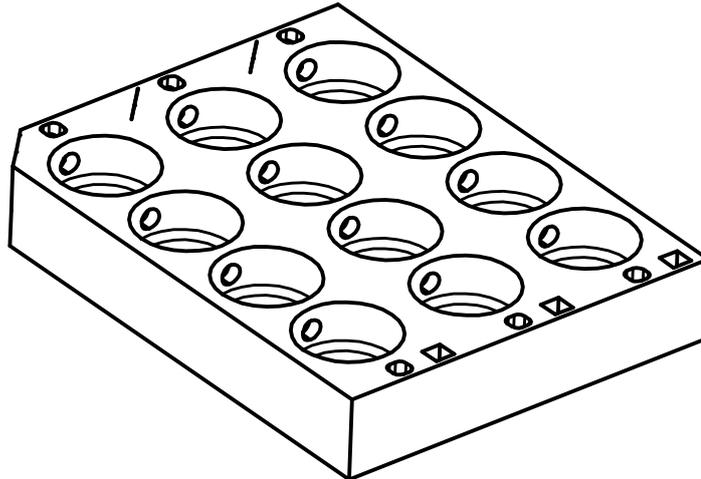
ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL Sylgard 184
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN 	Diseño Optimizado	ESCALA 1:1
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 16/02/2022
		LÁMINA: A4

Los redondeos no acotados son de 1mm de radio

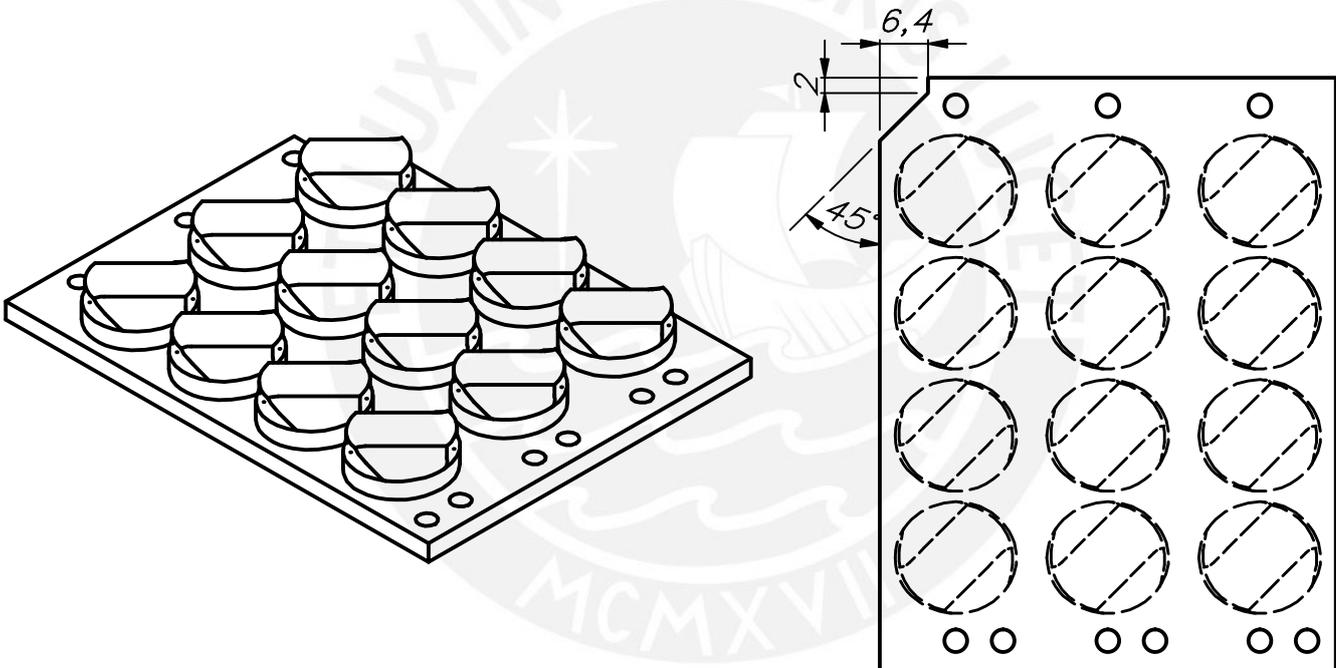


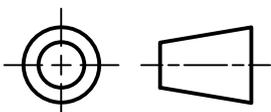
ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL Sylgard 184
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN 	Diseño Optimizado Tapa	ESCALA 1:1
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4

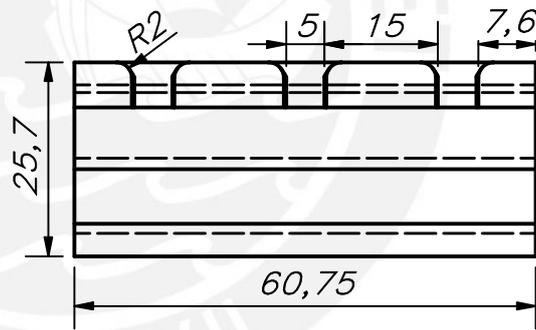
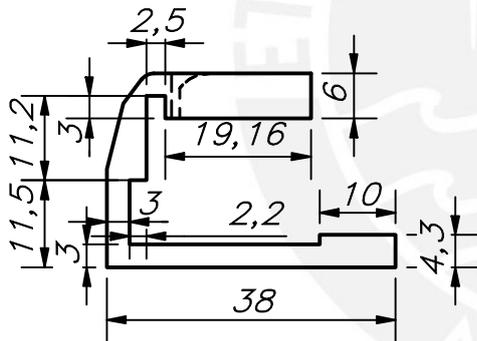
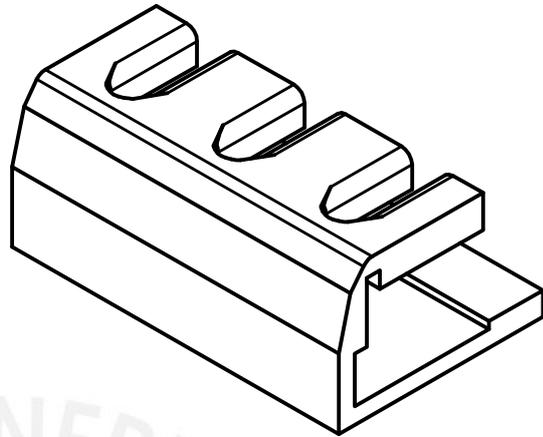
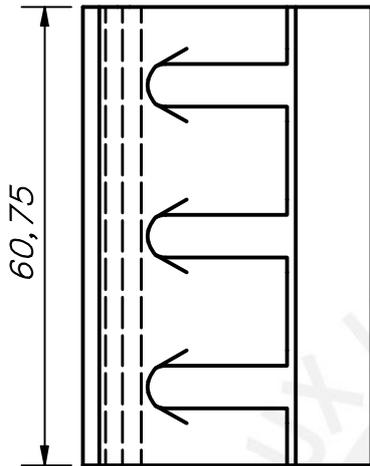
Módulo de 3x4 pocillos, las dimensiones se ubican en el plano Diseño Optimizado



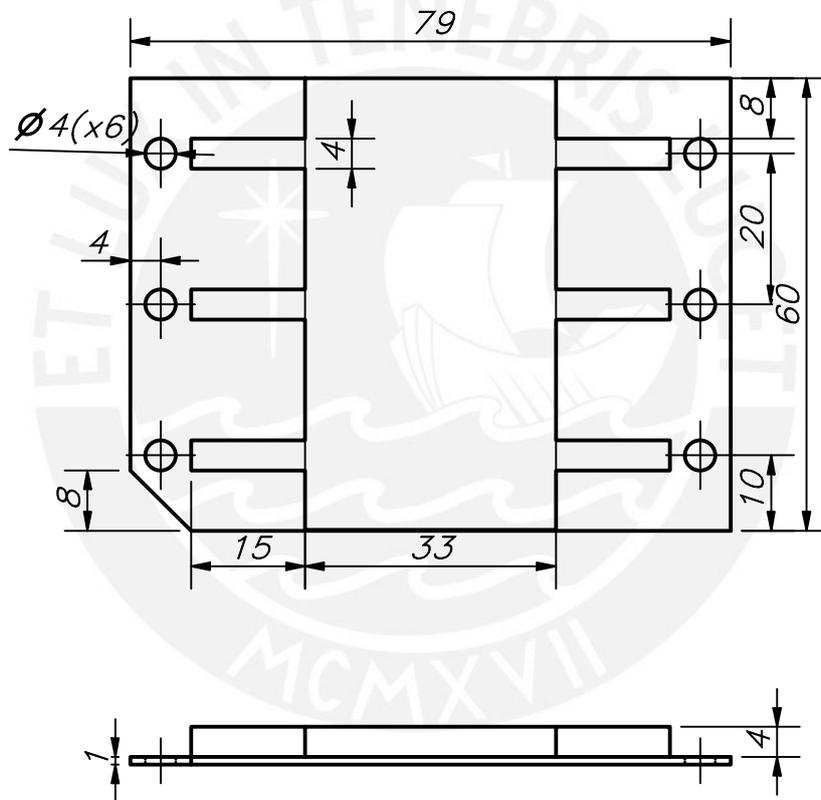
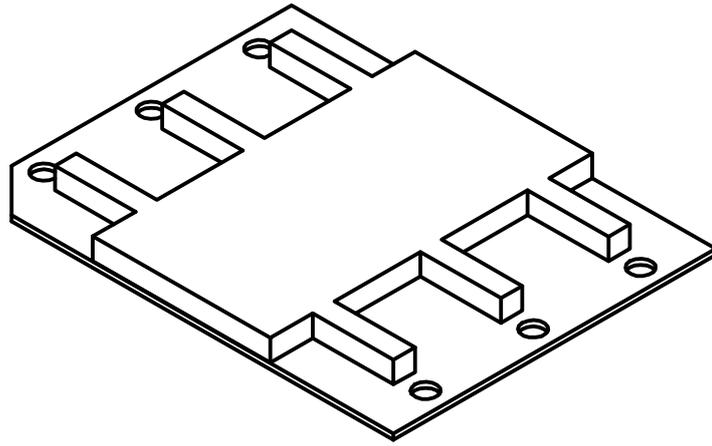
Tapa para 3x4 pocillos, las dimensiones se ubican en el plano Diseño Optimizado Tapa



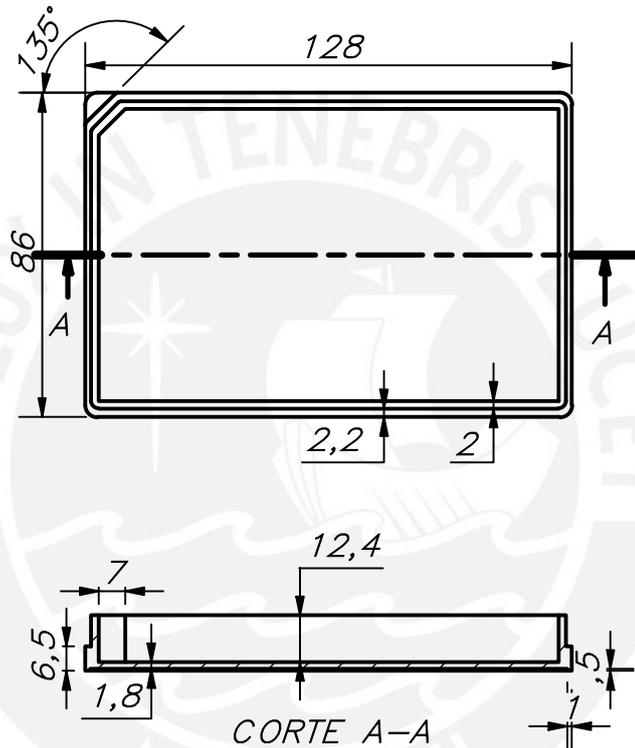
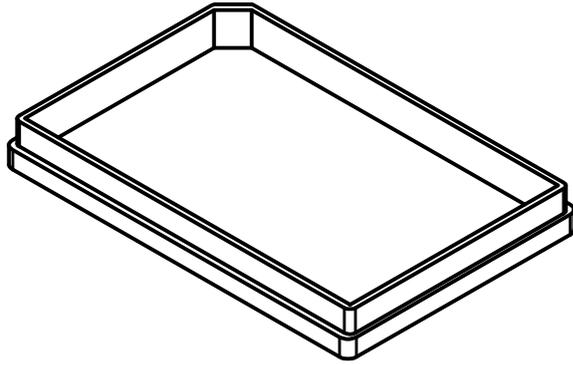
ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL Sylgard 184
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN 	Módulo de 3x4 pocillos y Tapa	ESCALA 1:1
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4



ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL
		Ácido Poliláctico
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN	<i>Sujetador</i>	ESCALA
		1:1
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4



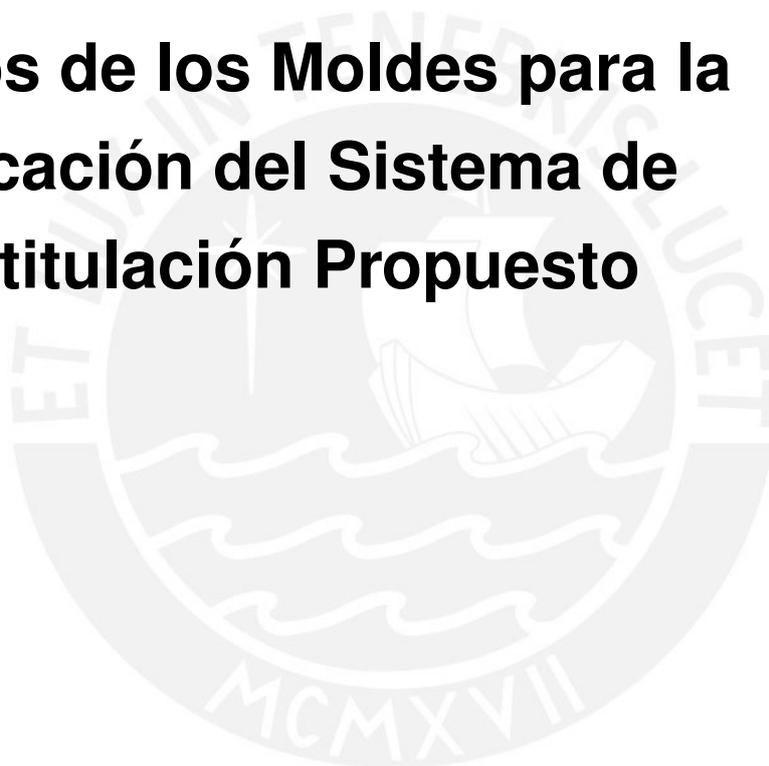
ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL
		Ácido Poliláctico
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN	Rigidizador	ESCALA
		1:1
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4



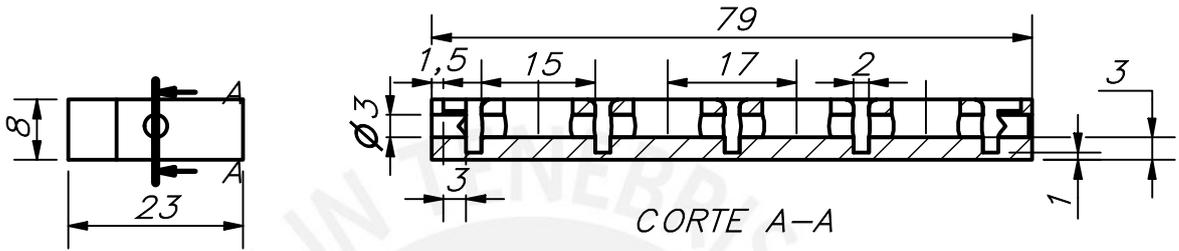
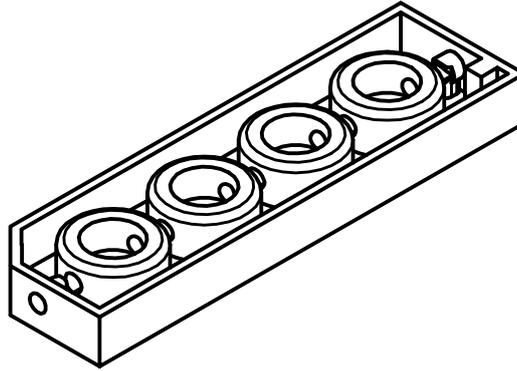
ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL Veroclear o Acero Inoxidable
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN 	Diseño de la base de la plataforma	ESCALA 1:2
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4

## **Apéndice B**

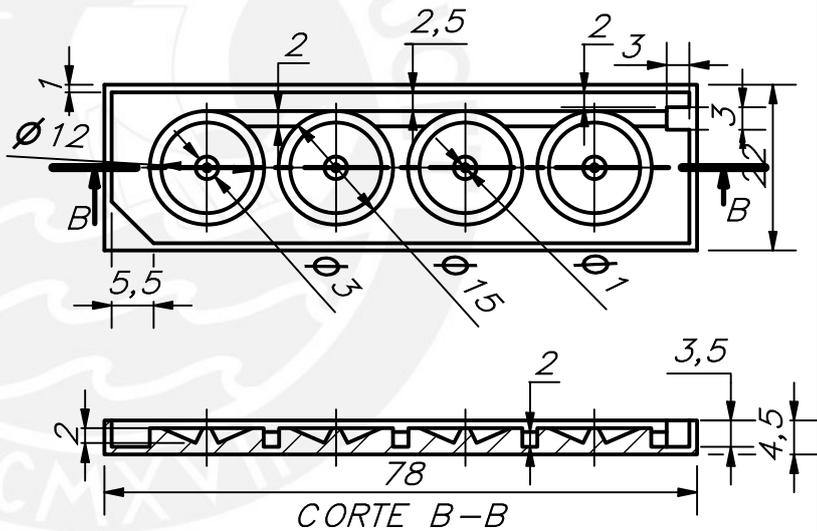
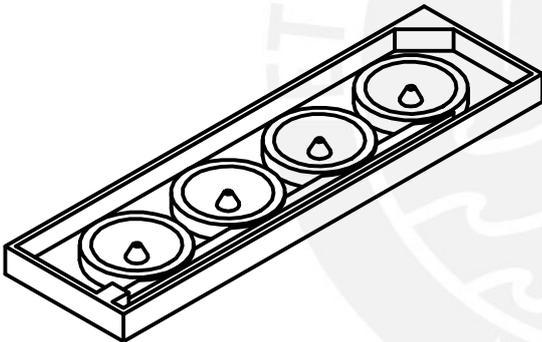
# **Planos de los Moldes para la Fabricación del Sistema de Microtitulación Propuesto**



Molde well fluido

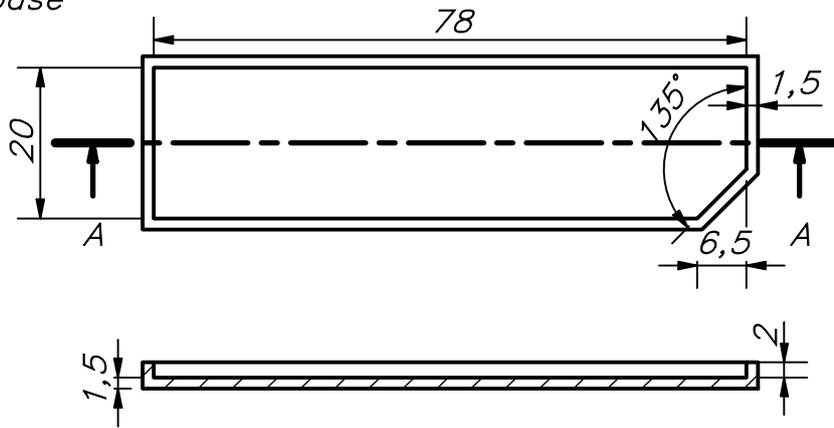


Molde Cámara



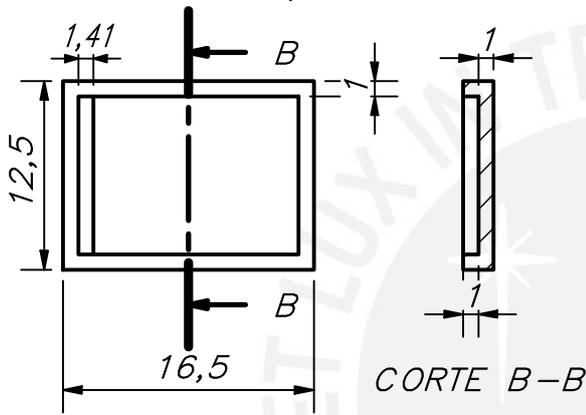
ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL
		Ácido Poliláctico
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN		ESCALA
	<b>Moldes - Parte 1</b>	<b>1:1</b>
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4

Molde base



CORTE A-A

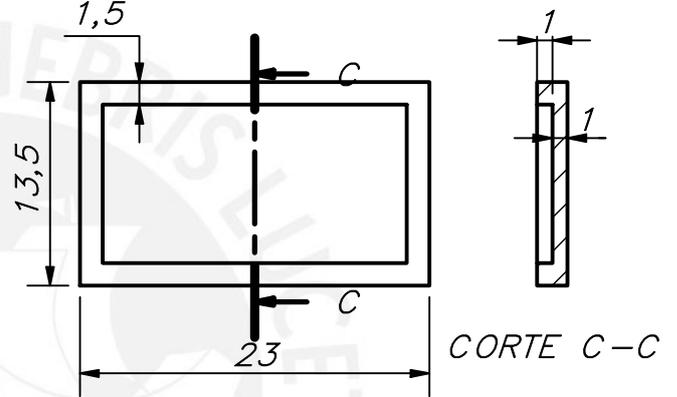
Molde canal izquierdo



CORTE B-B

Escala 2:1

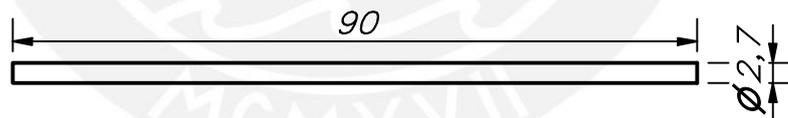
Molde canal derecho



CORTE C-C

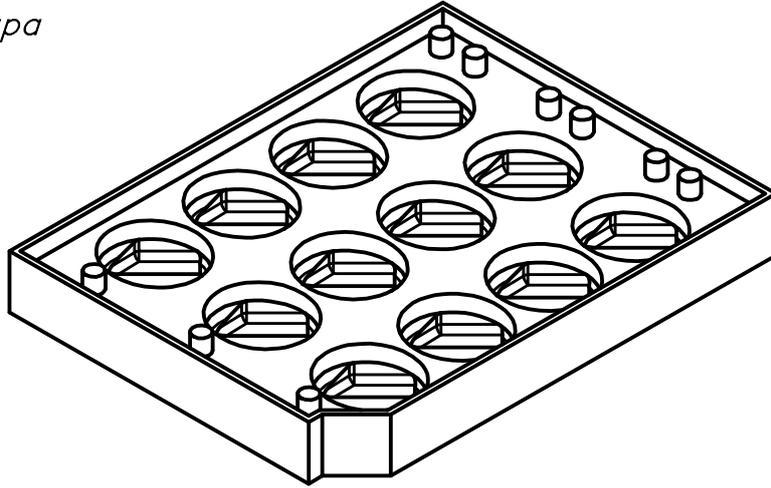
Escala 2:1

Pin well fluido

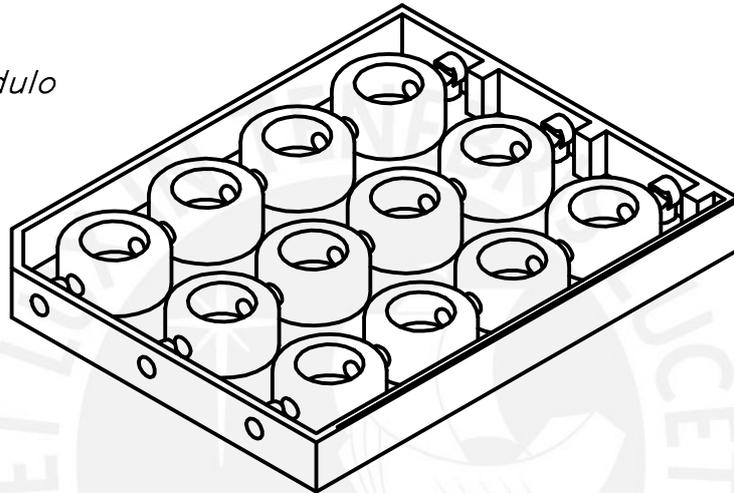


ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL
		Ácido Poliláctico
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN		ESCALA
	<b>Moldes-Parte 2</b>	<b>1:1</b>
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4

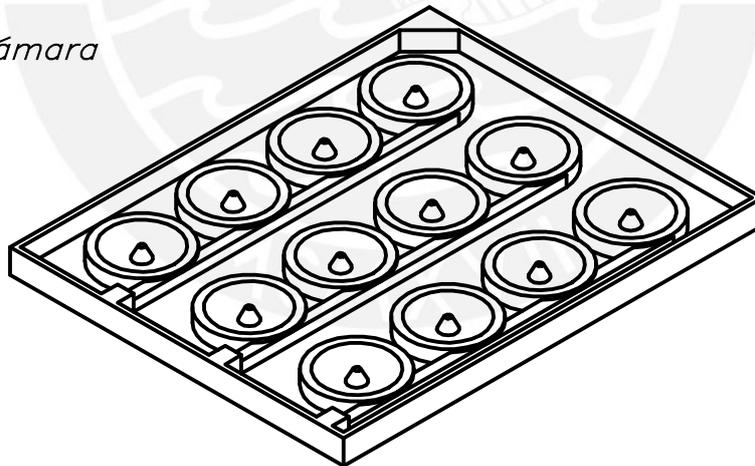
Molde tapa

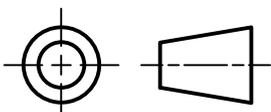


Molde módulo

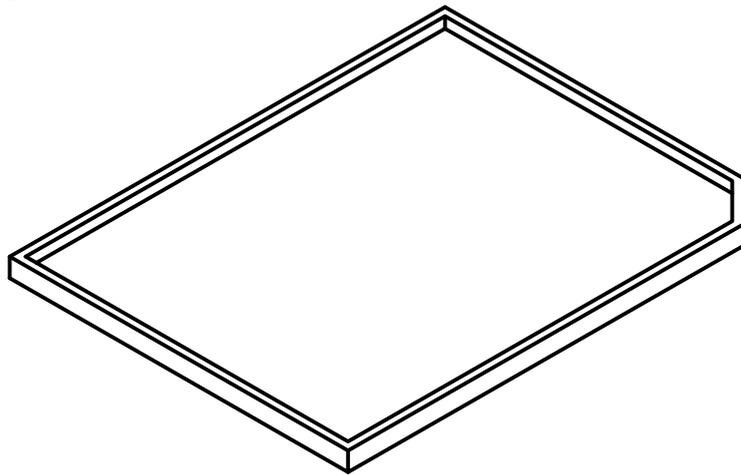


Molde cámara

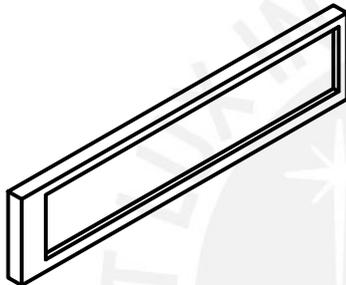


ACABADO SUPERFICIAL	TOLERANCIA GENERAL	MATERIAL
		Ácido Poliláctico
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Maestría Ing. Biomédica		
MÉTODO DE PROYECCIÓN		ESCALA
	Moldes-Parte 3	1:1
20194119	Suarez Uribe Etsel Lemy	FECHA: 17/02/2022
		LÁMINA: A4

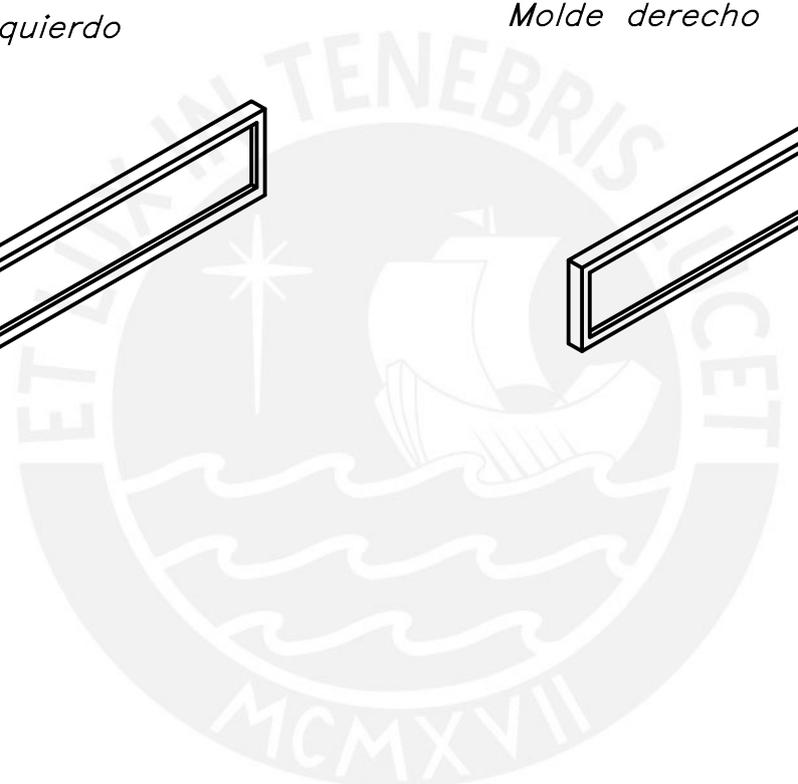
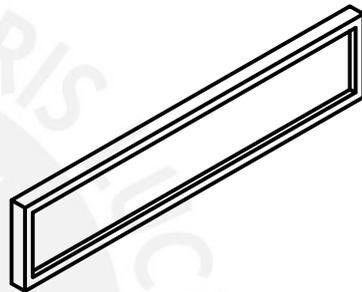
*Molde base*

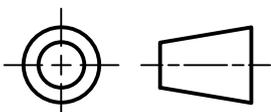


*Molde izquierdo*



*Molde derecho*



<i>ACABADO SUPERFICIAL</i>	<i>TOLERANCIA GENERAL</i>	<i>MATERIAL</i> <i>Ácido Poliláctico</i>
<i>PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ</i> <i>Maestría Ing. Biomédica</i>		
<i>MÉTODO DE PROYECCIÓN</i> 	<i>Moldes – Parte 4</i>	<i>ESCALA</i> <i>1:1</i>
<i>20194119</i>	<i>Suarez Uribe Etsel Lemy</i>	<i>FECHA:</i> <i>17/02/2022</i>
		<i>LÁMINA:</i> <i>A4</i>