

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**DESARROLLO DE SIMULACIONES COMPUTACIONALES
DINÁMICAS DE MICROBIOREACTORES PARA LA EVALUACIÓN
IN VITRO DE LA TOXICIDAD DE FÁRMACOS.**

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Biomédico

AUTOR:

Mario Marcelo Lira Camargo

ASESORA:

Fanny Lys Casado Peña

Lima, Noviembre, 2023


Informe de Similitud

Yo, Fanny Lys Casado Peña, docente de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) de la tesis/el trabajo de investigación titulado "Desarrollo de simulaciones computacionales dinámicas de microbioreactores para la evaluación in vitro de la toxicidad de fármacos", del autor Mario Marcelo Lira Camargo

dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 9%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 29/11/2023.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: Lima, 29/11/2023

Apellidos y nombres de la asesora: Casado Peña, Fanny Lys	
DNI: 40444557	 Firma
ORCID: 0000-0002-8791-626X	

Resumen

Las enfermedades crónicas son altamente prevalentes en nuestra sociedad. En muchos casos el tratamiento más efectivo es el trasplante del órgano afectado, pero puede complicarse debido a la enfermedad de injerto contra huésped. Si bien existen medicamentos para reducir los efectos de esta enfermedad, ninguno la elimina y la búsqueda de sustitutos es altamente costosa. La toxicidad de un nuevo fármaco se evalúa principalmente en tres órganos: corazón, hígado y riñón. La evaluación comienza en la etapa *in vitro*, en condiciones estáticas, diferentes a las condiciones en el cuerpo humano, donde todo es dinámico y se encuentra conectado. Por este motivo, en este trabajo se desarrolló simulaciones computacionales dinámicas de micro bioreactores para la evaluación *in vitro* de la toxicidad de fármacos, con el fin de sostener matemáticamente los modelos *in vitro*. Se diseñaron diversos modelos de *organ-on-a-chip* para cada uno de los tejidos, luego se interconectaron y se agregó un mezclador pasivo, para mezclar sangre humana con una solución de medicamento modelo. Se caracterizaron los campos de velocidad, presión y concentración de cada una de las partes del sistema separados e interconectados, para evaluar los valores de esfuerzo cortante, la presencia de vórtices y el grado de mezclado de ambas soluciones. Las simulaciones demuestran que no se presentan vórtices en los lugares de siembra de ninguno de los chips, y que la sangre y la solución de medicamento se mezclan completamente. El chip diseñado para cardiomiocitos supera el límite superior de esfuerzo cortante de 2.6 Pa establecido. La implementación de los chips fue posible mediante manufactura aditiva y se verificó la integridad de los canales por medios ópticos. Se evidenció la utilidad del uso de simulaciones computacionales en aras de dilucidar los resultados de un prototipo previo a su construcción y la viabilidad de construir microbioreactores a la medida para evaluar toxicidad de fármacos *in vitro*.

Dedico este trabajo a mis padres, a mi hermana y a mis abuelos paternos y maternos
por su constante respaldo y motivación.



Agradezco a mi asesora por brindarme su confianza, consejo y apoyo.

A José Luis Cáceres Alban por sus recomendaciones en el diseño e impresión de los prototipos.



Índice

Capítulo 1: Planteamiento de la Problemática	4
1.1 Las Enfermedades Crónicas son Altamente Prevalentes	5
1.1.1 Enfermedad Renal Crónica.....	5
1.1.2 Cirrosis.....	7
1.1.3 Infarto al miocardio.....	8
1.2 Los Trasplantes de Órganos están Limitados por la Enfermedad de Injerto Contra Huésped	9
1.3 El Costo para el Desarrollo de Nuevos Fármacos es Alto	11
1.4 Existen Limitaciones de los Modelos Biológicos para el Desarrollo de Fármacos.	13
1.5 Objetivos	15
1.5.1 Objetivo General.....	15
1.5.2 Objetivos Específicos.....	16
Capítulo 2: Marco Conceptual	17
2.1 Consideraciones Anatómo-Fisiológicas para el Diseño de Sistemas Fisiológicos mediante Ingeniería de Tejidos	17
2.1.1 Sistema Renal.....	18
2.1.2 Sistema Hepático.....	19
2.1.3 Sistema Cardiovascular.....	20
2.2 Cultivo de Células Involucradas en Enfermedades Crónicas	22
2.2.1 El Microambiente de los Cardiomiocitos en Cultivo.....	22
2.2.2 El Microambiente de Hepatocitos Cultivados.....	23
2.2.3 Factores Clave para el Cultivo de Células Renales.....	24
2.3 Determinación de valores ideales de esfuerzo cortante para diferentes tipos celulares	25
2.4 Medicamentos que se usan para el Trasplante de Órganos: Sirolimus	27
2.5 Conceptos y Ecuaciones necesarias para el Modelado Computacional	28
2.5.1 Mecánica de Fluidos.....	28
2.5.2 Fenómeno de Transporte de Masa: Difusión y Convección.....	31
2.6 Polidimetilsiloxano (PDMS)	32
2.7 Resina Veroclear	33
2.8 Micromezcladores	34
2.9 Organ-on-a-Chip y Human-Body-on-a-Chip	36
Capítulo 3: Metodología	38
3.1 Módulos de COMSOL	38
3.2 Definición de variables y ploteo de los microbioreactores	39
3.2.1 Definición de las condiciones iniciales.....	39
3.2.2 Tejido renal en un Chip.....	40
3.2.3 Tejido hepático en un Chip.....	44
3.2.4 Tejido cardiaco en un Chip.....	47
3.2.5 Human-Body-on-a-Chip.....	49
3.2.5.1 Interconexión de los chips.....	52
Capítulo 4: Resultados	55
4.1 Caracterización del flujo ideal: campo de velocidades y presiones	55
4.1.1 Tejido renal en un Chip.....	55
4.1.2 Tejido hepático en un Chip.....	60
4.1.3 Tejido cardiaco en un Chip.....	62
4.1.4 Human-Body-on-a-Chip.....	63
4.2 Caracterización del flujo ideal: campo de concentraciones de la interacción entre Sirolimus y sangre humana.	69
4.2.1 Tejido renal en un chip.....	70

4.2.2 Mezclador	71
4.2.3 Human-Body-on-a-Chip	73
4.3 Caracterización del flujo ideal: análisis de vórtices en las secciones donde se encuentran los esferoides.	76
4.4 Construcción de los prototipos de los organ-on-a-chip	79
Conclusiones	82
Recomendaciones.....	85
Referencias Bibliográficas	88



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores máximos de esfuerzo cortante para diferentes tipos celulares, obtenidos de la revisión de Shemesh et al. (2015, p 24).	27
Tabla 2. Valores de la densidad de la sangre humana, su viscosidad dinámica y los coeficientes de difusión del Sirolimus y la sangre humana.	27
Tabla 3. Parámetros para simular el riñón en un chip, inspirado en el diseño de Sateesh et al. (2018).	42
Tabla 4. Dimensiones de cada una de las estructuras que se utilizaron para plotear la geometría de la versión final del chip para tejido renal.	43
Tabla 5. Parámetros de la geometría de las trampas del hígado en un chip.	45
Tabla 6. Parámetros de la geometría del hígado en un chip.	46
Tabla 7. Parámetros de la geometría para cultivo de cardiomiocitos en un chip.	47



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de la interacción de los modelos que se encuentran en la etapa pre clínica.....	12
Figura 2. Las cinco versiones del tejido renal en un chip. Las unidades del eje X e Y son 10 – 4m.....	42
Figura 3. Diseño de la versión final del chip para tejido renal desde una vista del eje XY, la altura en el eje Z es de 500 μm	44
Figura 4. Ploteo del lobulillo hepático. (a) la geometría de las figuras geométricas básicas que conforman el lobulillo hepático. (b) geometría de las figuras geométricas básicas que conforman el lobulillo hepático luego de ser diferenciadas.....	46
Figura 5. Ploteo de la geometría del hígado en un chip, la altura en el eje Z es de 500 μm . La cantidad total de lobulillos hepáticos es de 672.....	47
Figura 6. Geometría para tejido miocárdico en un chip. Las unidades del eje X e Y están en, la altura en el eje Z es de 500 μm	48
Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología de diseño del Human-Body-on-a-Chip.	50
Figura 8. Ploteo de los chips que componen el Human Body on a Chip y que se utilizaron para construirlos con manufactura aditiva. Todos los chips se encuentran sin esferas en las trampas, las cuales simulan los esferoides. (a) mezclador, (b) chip para tejido cardiaco, (c) chip para tejido hepático, (d) chip para tejido renal. Las unidades del eje X e Y están en metros, la altura en el eje Z es de 1500 μm , 1000 μm de la base y 500 μm de la altura de los canales. La base rectangular mide 3.6x3 cm.....	51
Figura 9. Las dos formas de conexión de los chips que componen el Human Body on a Chip sin esferoides. (a) conexión de los chips en un mismo valor del eje Z, 500 μm . (b) conexión de los chips en diferentes valores del eje Z. Como se puede observar en la superficie de ambas imágenes, estas son totalmente lisas, evidenciando la inexistencia de los esferoides. Las unidades del eje X e Y están en metros en ambas imágenes.....	52
Figura 10. Las dos formas de conexión de los chips que componen el Human Body on a Chip con esferoides. (a) conexión de los chips en un mismo valor del eje Z, 500 μm . (b) conexión de los chips en diferentes valores del eje Z, la separación es de 4.5 mm. Como se observa en ambas imágenes, estas presentan pequeños círculos en los lugares de las trampas, estos desde una vista sobre el plano XY. Los círculos son los esferoides en un plano dos dimensional. Las unidades del eje X e Y están en metros en ambas imágenes.....	53
Figura 11. Campo de velocidades de las cinco versiones iniciales del chip para tejido renal. La unidad de la barra de color está en m/s. (a) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 1. (b) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 2. (c) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 3. (d) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 4. (e) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 5. Los fluidos ingresan por las dos entradas inferiores de las imágenes y salen por las cuatro vías superiores.	56
Figura 12. Campo de presiones de las cinco versiones iniciales del chip para tejido renal. La unidad de la barra de color es kPa. (a) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 1. (b) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 2. (c) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 3. (d) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 4. (e) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 5. Los fluidos ingresan por las dos entradas inferiores de las imágenes y salen por las cuatro vías superiores.....	58

Figura 13. Campo de velocidades del riñón en un chip en 2D y en 3D. Las unidades de la barra de colores están en 10^{-4} m/s. La velocidad en la entrada es 10×10^{-4} m/s. (a) el campo de velocidades del riñón en un chip en 2D, el fluido ingresa por la parte superior de la figura y sale por la salida de las trampas. Observamos valores máximos de 50×10^{-4} m/s en las salidas, debido a la reducción del área. (b) Campo de presiones del riñón en un chip en 3D, existen valores de 2.178 Pa en las salidas del biorreactor.	59
Figura 14. Campo de velocidades, (a), y presión, (b), de la versión final del riñón en un chip en 3D. (a) El campo de velocidades del riñón en un chip en 3D. La velocidad en la entrada es 10×10^{-4} m/s. El fluido ingresa por la parte superior de la figura y sale por la salida de las trampas. Observamos valores máximos de 60×10^{-4} m/s en las salidas. (b) Campo de presiones del riñón en un chip en 3D, existen valores de 6.3 Pa en las salidas del biorreactor. La barra de color en (a) está en 10^{-3} m/s, en el caso de (b) en Pa.	59
Figura 15. Campo de velocidades, (a), y presiones, (b), del hígado en un chip en 2D. La barra de color en (a) está en 10^{-3} m/s, en el caso de (b) en Pa. En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte izquierda de esta y sale por la derecha.	60
Figura 16. Campo de velocidades y presiones del hígado en un chip en 3D. La barra de color en (a) está en $x10^{-3}$ m/s, en el caso de (b) en Pa. En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte izquierda y sale por la derecha. Ambas figuras se muestran desde una vista del plano XY.	61
Figura 17. Campo de velocidades y presiones del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip en 2D. La barra de color en (a) está en 10^{-4} m/s, en el caso de (b) en Pa. En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte superior y sale por la inferior. El valor de velocidad inicial es de 10×10^{-4} m/s.	62
Figura 18. Campo de velocidades y presiones del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip en 3D. La barra de color en (a) está en 10^{-4} m/s, en el caso de (b) en Pa. En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte superior y sale por la inferior. El valor de velocidad inicial es de 10×10^{-4} m/s.	63
Figura 19. Campo de velocidades de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip sin interconexión entre ellos en 3D. En (a) la barra de color presenta unidades de 10^{-5} m/s, en los tres chips restantes, 10^{-4} m/s.	64
Figura 20. Campo de presiones de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip sin interconexión entre ellos en 3D. La barra de color en todos los chips posee unidades de Pa.	65
Figura 21. Campo de velocidades de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip interconectados entre ellos en 3D sin esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en 10^{-4} m/s.	66
Figura 22. Campo de presiones de los cuatro chips que componen el Human Body on a Chip interconectados entre ellos en 3D sin esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en Pa.	67
Figura 23. Campo de velocidades de los cuatro chips que componen el Human Body on a Chip interconectados entre ellos en 3D con esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en 10^{-4} m/s.	68
Figura 24. Campo de presiones de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip interconectados entre ellos en 3D con esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en Pa.	69

Figura 25. Campo de concentraciones del riñón en un chip de todas las versiones, en la entrada izquierda se introduce Sirolimus, color rojo. La barra de color de todas las imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3	70
Figura 26. Campo de concentraciones del riñón en un chip de todas las versiones, en la entrada derecha se introduce sangre, color rojo. La barra de color de todas las imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3	71
<i>Figura 27. Mezcla de sangre y Sirolimus para $t=240s$. La barra de color de ambas las imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 28. Mezcla de sangre y Sirolimus para $t=600s$. La barra de color de ambas imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3.....</i>	<i>73</i>
Figura 29. Campo de concentración de la mezcla entre sangre y Sirolimus en el Human-Body-on-a-Chip dispuesto en un mismo valor del eje Z. La barra de color de ambas imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3	74
<i>Figura 30. Campo de concentración de la mezcla entre sangre y Sirolimus en el Human-Body-on-a-Chip dispuesto en diferentes valores del eje Z. La barra de color de ambas imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3.....</i>	<i>75</i>
Figura 31. Análisis de los vectores del campo de velocidad para evaluar la presencia de vórtices. (a) Líneas de flujo de los lugares de siembra del chip para tejido cardíaco. (b) Líneas de flujo de los lugares de siembra del chip para tejido hepático. (c) Líneas de flujo de los lugares de siembra del chip para tejido renal. (d) Líneas de flujo de las conexiones del tejido hepático y renal.	77
Figura 32. Retirada de la impresora y limpieza de los chips. (a) Retiro de los chips de la impresora. (b) Extracción de los soportes externos. (c) Limpieza de los soportes internos. (d) Mezclador impreso y limpio.	79
Figura 33. Chips impresos. (a) Chip del mezclador impreso. (b) Chip para tejido cardíaco. (c) Chip para tejido hepático. (d) Chip para tejido renal. (e) Los cuatro chips juntos distribuidos horizontalmente.....	81
Figura 34. Imágenes microscópicas de los chips. (a) Entrada en T del mezclador. (b) Chip para tejido cardíaco. (c) Chip para tejido hepático, observamos que existen zonas incompletas en las trampas debido a que fueron retiradas por la bomba de agua. (d) Chip para tejido renal. ...	81
Figura 35. Comparación entre el flujo de trabajo de la etapa prototipado con y sin el uso de software de elementos finitos. (a) observamos los tres pasos del flujo de trabajo en un prototipado sin usar COMSOL, o algún tipo de software de elementos finitos. (b) los cinco pasos del flujo de trabajo en un prototipado usando COMSOL.	83
Figura 36. Pilares necesarios para poder utilizar los prototipos en el entorno in vitro.	87

Introducción

Cada año aumenta la cantidad de pacientes con alguna enfermedad crónica, y se prevé que esta tendencia se mantenga en las siguientes décadas, debido principalmente al estilo de vida contemporáneo. Una enfermedad crónica no sólo merma la calidad de vida del paciente, sino que también reduce su esperanza de vida. El trasplante de órganos es la mejor solución terapéutica; sin embargo, comúnmente, nuestro sistema inmunológico rechaza al órgano del donante. Para reducir la respuesta inmunitaria, se puede suministrar una amplia variedad de medicamentos al paciente; no obstante, ninguno elimina este problema. Actualmente, los investigadores y la industria farmacéutica están en la búsqueda de encontrar fármacos que logren este objetivo, pero los métodos de desarrollo de fármacos son altamente costosos. Esto se debe principalmente a que el método es incompleto e impreciso, es de prueba y error. En la etapa preclínica, se utilizan tres modelos: *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. No obstante, existe un vacío entre la transición de los modelos *in vitro* y los *in vivo*; debido a que los modelos *in vitro* se desarrollan en condiciones estáticas, mientras que todos los organismos vivos poseen metabolismos dinámicos. Por ende, resulta lógico dotar de dinamismo a los modelos *in vitro*, esto a través de dispositivos microfluídicos. En este sentido, para reducir aún más la posibilidad de error en la transición de los modelos *in vitro* a los *in vivo*, los modelos *in vitro* dinámicos se deben sostener en modelados matemáticos también conocidos como modelos *in silico*.

La presente tesis tiene como objetivo desarrollar simulaciones computacionales dinámicas basadas en modelos de microbioreactores, o chips, para tejido cardíaco, hepático y renal con el fin de conocer las características de comportamiento de los fluidos que permitan reducir el costo de desarrollo de fármacos en la etapa *in vitro*. El presente documento se divide en cuatro capítulos. El primer capítulo, titulado: Planteamiento de la Problemática, comienza detallando la prevalencia de las enfermedades crónicas, en donde se hace hincapié en tres de ellas: la enfermedad renal crónica, la cirrosis y el infarto al miocardio. Si bien existen tratamientos

para sobrellevar la vida con la existencia de estas enfermedades en los pacientes, en estadios avanzados de las mismas, es necesario realizar el reemplazo del órgano afectado. Sin embargo, aunque se logre encontrar donante, el paciente se topará con otra patología, la enfermedad de injerto contra huésped. Así, existen diversos fármacos para disminuir los síntomas de esta enfermedad; no obstante, no son completamente efectivos, su efecto no es prolongado, y, por ende, las investigaciones en este campo se centran en encontrar medicamentos que lo sean. Empero, el costo para el desarrollo de nuevos fármacos es alto, además que existen limitaciones de los modelos biológicos para el desarrollo de fármacos, por las diferencias entre especies, la humana y los modelos animales.

El segundo capítulo, titulado Marco Conceptual, comienza con las consideraciones anatómo-fisiológicas para el diseño de sistemas fisiológicos mediante ingeniería de tejidos, para luego detallar brevemente sobre el estado del arte en el cultivo de células involucradas en enfermedades crónicas. Asimismo, como uno de los pilares fundamentales de este trabajo, se presentan, basándose en la literatura, los valores ideales de esfuerzo cortante para diferentes tipos celulares. Luego, para contextualizar y ejemplificar la aplicación farmacológica en las simulaciones, se mencionan los medicamentos que se usan para el trasplante de órganos, se centra específicamente en el Sirolimus. Posteriormente, se detallan los conceptos y ecuaciones necesarias para el modelado computacional. Seguidamente, se detallan las propiedades del material que se utiliza para construir los distintos modelos del siguiente capítulo. Después, se explica las características que debe poseer el dispositivo que mezclará la sangre y el Sirolimus. Finalmente, se definen los conceptos de Organ-on-a-Chip y Human-Body-on-a-Chip.

El tercer capítulo, titulado Metodología, comienza comentando el funcionamiento y las variables que utilizan los módulos de COMSOL: Flujo Laminar y Transporte de Especies Diluidas, este último utiliza los resultados del primero. Posteriormente, se enseña el ploteo de

los diferentes diseños de Organ-on-a-Chip. Finalmente, se describe la metodología de diseño para construir el Human-Body-on-a-Chip.

El cuarto capítulo, titulado Resultados, se centra principalmente en la caracterización del flujo ideal del campo de velocidades y presiones de todos los diseños de los chips, también, expone la caracterización del campo de concentraciones de la interacción entre Sirolimus y sangre humana, con énfasis en los resultados del mezclador. Luego, se presenta un breve análisis de los vórtices en las zonas de siembra celular de cada uno de los chips que componen el Human-Body-on-a-Chip. Para realizar el presente análisis, se asumió que la distribución del fármaco es intravenosa, en base a ello se define el orden y la dirección del flujo en los chips, primero, tejido cardíaco, luego hepático y finalmente renal. Asimismo, es importante destacar que para las simulaciones se asumió 0% de metabolismo en los chips, y 100% de excreción fuera del sistema; y que las soluciones mezcladas solo pasan una vez por el sistema. Los archivos digitales de las simulaciones se adjuntan al acabar la exposición de sus resultados. Para terminar esta sección se enseña la construcción de los prototipos de los chips y el mezclador, así como fotografías microscópicas de las estructuras de los chips.

Finalmente, se presentan las conclusiones, donde sobresale que los valores máximos de esfuerzos cortante del chip para tejido cardíaco, 3.17 Pa, es superior al límite que se establece de esfuerzo cortante de células madre, el cual es de 2.6 Pa. En el caso de los valores para tejido hepático y renal, los valores fueron inferiores a 2.6 Pa, 1.8 Pa para el chip de tejido hepático y 2.28 Pa para el de tejido renal. El mezclador que se diseñó para mezclar sangre humana con Sirolimus realiza correctamente su función en solo tres unidades de mezclado de su total de ocho. No se observaron vórtices en los lugares de siembra celular en ninguno de los chips.

Capítulo 1: Planteamiento de la Problemática

En este primer capítulo se presentan los problemas principales que impulsan el desarrollo de este trabajo. Así, comenzaremos con un panorama general sobre tres enfermedades crónicas, que no solo cobran relevancia por el número de pacientes que afectan tanto a nivel local como mundial, sino también, porque afectan a tres tejidos que son de suma importancia, tanto para el funcionamiento de nuestro organismo, como para el testeado de la toxicidad de medicamentos. En este sentido, el primer apartado de este capítulo desarrolla el problema de la enfermedad renal crónica, la cirrosis y el infarto al miocardio. Estas enfermedades al comprometer tejidos con limitado poder de regeneración, como el renal y el cardíaco, o realizar un daño porcentual mayor al de regeneración, como en el caso del tejido hepático, generan que la única alternativa disponible para el paciente sea el trasplante del órgano enfermo. No obstante, aunque el paciente logre encontrar un donante compatible, tarea casi imposible en países como el nuestro, donde la tasa de donación no satisface la demanda de los pacientes, existe un efecto propio de introducir un ente en nuestro cuerpo ajeno a él, fenómeno denominado: enfermedad de injerto contra huésped. Para reducir la respuesta inmunitaria, existen diversos fármacos, los cuales son costosos y no eliminan el efecto, solo lo atenúan. Por ende, los investigadores se encuentran en la búsqueda de nuevos fármacos para mitigar esta enfermedad. En aras de investigar el metabolismo de los medicamentos que descubren, ellos utilizan modelos *in silico*, luego *in vitro* y finalmente *in vivo*, en la etapa preclínica. Sin embargo, los resultados de los modelos *in vitro* no arrojan resultados en consonancia con los modelos *in vivo*, principalmente debido a que estos modelos se desarrollan en condiciones estáticas, contrario a lo que sucede en un organismo, condiciones dinámicas. Por ello, se comenzaron a emplear flujos en los cultivos *in vitro*, empero este genera esfuerzo cortante que, al superar cierto valor, que depende del tejido celular, ocasiona una disminución en el desarrollo, daño celular e incluso muerte celular. Surge así la necesidad de estudiar estos fenómenos con el fin de

proponer bioreactores, chips, que sean más predictivos de las respuestas *in vivo* de fármacos de interés.

1.1 Las Enfermedades Crónicas son Altamente Prevalentes

Las enfermedades crónicas no solo reducen la expectativa de vida del paciente, sino que también le generan molestias a lo largo de la misma. Asimismo, generan la aparición de otras patologías que deterioran aún más la calidad de vida del paciente. La obesidad y el estilo de vida sedentario, común cada vez más en lugares urbanizados, aceleran el desarrollo de enfermedades crónicas. En este sentido, la mejor opción terapéutica para una enfermedad crónica que haya comprometido severamente un órgano es el trasplante, con esto no solo se mejora la calidad de vida del paciente, sino que también se incrementa su expectativa de vida.

1.1.1 Enfermedad Renal Crónica

Piroddi et al. (2013) define a la enfermedad renal crónica (ERC) como una afección patológica grave que resulta en una pérdida gradual e irreversible de la función renal. La tasa de filtración glomerular (TFG) y la albuminuria se utilizan para clasificar las etapas clínicas de la ERC. La hemodialisis es el tratamiento predilecto para los pacientes con ERC; no obstante, su mayor obstáculo para la hemodiálisis (HD) es la eliminación de solutos unidos a proteínas, los cuales requieren el uso de una terapia no convencional. Asimismo, Libetta et al. (2011) y Morena et al. (2005) sostienen que la uremia afecta las funciones biológicas de varios tejidos, induce cambios inmunológicos al inhibir o desencadenar respuestas inmunitarias y al alterar la inmunidad innata y/o adaptativa.

Levey A. y Coresh J. (2012) aseguran que, en los países con sistemas de salud poco desarrollados, la causa más común de enfermedad renal en estado terminal (ERET) es la progresión de la ERC causada por la exposición elevada y continua a toxinas y fármacos dañinos, y por infecciones recurrentes. Por otro lado, Levey A. y Coresh J. (2012), Jha et al.

(2013), Stevens P. y Levin A. (2013), y Hill et al. (2016) sostienen que el creciente envejecimiento de la población y el aumento de la diabetes, la hipertensión y la obesidad, son las principales causas de la ERC, y han contribuido al crecimiento de la prevalencia de la ERC. Además, Korevaar et al. (2004) asevera que estudios han informado un aumento en los niveles de proteína C reactiva (PCRA) y en los niveles de elastasa de neutrófilos (EN) después de las sesiones de HD, lo que sugiere que el procedimiento de HD desencadena la activación de neutrófilos y aumenta la inflamación. Asimismo, Pereira et al. (2011), aseguran que los niveles elevados de EN en pacientes con HD también se han asociado con cambios en las proteínas de la membrana de los eritrocitos, los cuales desestabilizan la estructura de la membrana y conducen a la eliminación prematura de los eritrocitos, empeorando así la anemia.

Según estudios realizados en el Perú, Pinares-Astete et al. (2007), sostienen que la edad avanzada, y que la causa de la ERC sea la diabetes mellitus (DM) o la hipertensión arterial (HTA), presenta un impacto inmenso en la supervivencia de los pacientes. De hecho, el riesgo de muerte de los pacientes con ERC mayores de 60 años es 93% más elevado que aquellos menores de 60 años. Por otro lado, el riesgo de muerte disminuye con no ser diabético en un 0.4% respecto a los pacientes diabéticos. Además, la recepción de trasplante renal reduce en 60.6% el riesgo de muerte frente a pacientes que no son trasplantados. A pesar de los cambios realizados en los procesos de HD y la tecnología de esta, a lo largo del tiempo del estudio, el cual fue de cerca de tres décadas (1982-2009), no se observaron impactos positivos significativos en la supervivencia de los pacientes. Por el contrario, sí estuvo asociada fuertemente a temas biológicos como edad, diabetes y trasplante renal.

A nivel mundial, Levey et al. (2007), afirman que la ERC es un problema de salud pública global. En este sentido, Liyanage et al. (2015), sostiene que alrededor del mundo existe un 50% de pacientes que, pese a necesitar hemodiálisis, no la reciben, debido a que su sistema

de salud no puede proveerlo, lo que resulta en un incremento de la mortalidad en los pacientes con ERC. A nivel local, Herrera-Añazco et al. (2019), afirman que este problema podría desarrollar connotaciones negativas aún mayores para países con sistemas sanitarios débiles, como el peruano, si las estadísticas de nefrólogos siguen disminuyendo y la de pacientes continúa incrementándose. En este sentido, la prevalencia clasificada por edad de ERC en Perú se incrementó de 0.5 por cada 1000 pacientes en 2010 a 1.5 por cada mil pacientes para 2017. En contraste, la cantidad de nefrólogos por cada 1000 pacientes disminuyó de 4.4 en 2010 a 1.9 en 2016. Por otro lado, los servicios contratados por el Fondo Intangible Solidario de Salud del Ministerio de Salud de Perú (FISSAL) se incrementaron de 16 en 2012 a 74 en el 2019. Si bien existe un incremento notable en la cantidad de servicios de hemodiálisis, este incremento no será suficiente si es que sigue en aumento la cantidad de pacientes con ERC, convirtiendo así, posiblemente, a la ERC en un problema de salud pública.

1.1.2 Cirrosis

Gross (2019) define a la cirrosis hepática (CH) como una enfermedad crónica e irreversible que es parte de la etapa clínica final de diferentes enfermedades hepáticas. La CH, según Lefton et al. (2009), se caracteriza por una alteración de la arquitectura hepática causada por la presencia de nódulos regenerativos y fibrosis difusa, que conduce a una alteración vascular intrahepática, hipertensión portal, lo que desemboca en insuficiencia hepática. Según Tsochatzis et al. (2014), alrededor del mundo, las principales causas de CH son el consumo de alcohol, las infecciones crónicas por hepatitis B y C y la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Según la investigación de Asrani et al. (2019), la CH es la undécima causa de muerte a nivel mundial. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2018), la mortalidad estimada causada por la CH fue de 16.1 por cada 100 000 personas en 2010, lo que representó el 1.9% de las muertes a nivel mundial. No obstante, en el 2016 ésta aumentó a 16.8 por cada 100 000 personas, lo que corresponde al 2.2% de muertes alrededor del mundo,

Rojas-Acuña et al. (2022). En este sentido, en el Perú, según la investigación de Rojas-Acuña et al. (2022), la morbilidad y la mortalidad a causa de la CH mostraron una tendencia alcista entre el 2004 y el 2016. En el caso específico de la morbilidad, los departamentos de Ica y Tumbes y la Provincia Constitucional del Callao presentaron una tendencia creciente. En cuanto a la mortalidad, los departamentos de Lambayeque e Ica y la provincia del Callao presentaron tendencia al alza.

1.1.3 Infarto al miocardio

Según Mozaffarian D. et al. (2016), las enfermedades cardiovasculares causan aproximadamente un tercio de las enfermedades alrededor del mundo. Según Roth et al. (2017), entre todas las enfermedades cardiovasculares, la cardiopatía isquémica (IHD, por sus siglas en inglés) es la más frecuente. En este sentido, Prabhakaran et al. (2018) afirman que la IHD representa una amenaza para el desarrollo sostenible en el siglo veintiuno. La IHD se manifiesta clínicamente como infarto de miocardio y cardiopatía isquémica. Según el estudio de Moran et al. (2014), cada año es mayor el número de personas con IHD que viven con discapacidades crónicas y el deterioro de su calidad de vida. Según la investigación de Sampasa-Kanyinga y Lewis (2015), el principal proceso patológico que conduce a la IHD es la aterosclerosis, una enfermedad inflamatoria de las arterias asociadas con la deposición de lípidos y las alteraciones metabólicas debido a múltiples factores de riesgo. En este sentido, se espera que siga aumentando el número de personas que presenten IHD, según estimaciones de la ONU (2020), debido al aumento de la prevalencia de obesidad, diabetes y síndrome metabólico, además del envejecimiento de la población. Así, según Roser y Ritchie (2020), se estima que habrá un aumento de la población de 65 años de uno de cada once en 2019 a uno de cada seis en 2050. Asimismo, según Pepine (2004) y Virtanen et al. (2018), la angustia psicológica, las relaciones sociales y dormir menos de seis horas contribuyen al desarrollo de

IHD. Según Stewart et al. (2003), el impacto financiero de la IHD se deriva de hospitalizaciones, tratamientos, procedimientos de revascularización, visitas a clínicas, visitas de emergencias y tratamientos farmacológicos recetados. Gheorghe et al. (2018) asegura que el costo global de las enfermedades cardiovasculares en 2010 fue de aproximadamente 863 mil millones de dólares, y se espera que aumenten a más de un billón de dólares para 2030.

1.2 Los Trasplantes de Órganos están Limitados por la Enfermedad de Injerto Contra Huésped

Cualquiera de las células extrañas trasplantadas en el cuerpo de un receptor puede producir reacción inmunitaria. Un trasplante de un tejido o de un órgano de una parte de un animal a otra se llama autoinjerto; de un gemelo idéntico a otro se llama isoinjerto; de un ser humano a otro o de un animal a otro de su misma especie se llama aloinjerto, y de un ser humano a otro animal o de un animal de una especie a otro de una diferente se llama xenoinjerto. Con un emparejamiento adecuado de los tejidos entre personas, la mayoría de los aloinjertos de riñón han resultado eficaces durante un mínimo de 5 hasta 15 años, y el injerto de hígado y los trasplantes de corazón, de 1 a 15 años, Hall J. y Hall M. (2010, pp 445-450).

Si bien en las últimas décadas se han presentado importantes avances en técnicas para el trasplante de órganos, todavía existen limitaciones en cuánto a la compatibilidad de donantes y huéspedes, lo cual limita su uso como opción terapéutica. Socié y Ritz (2014) definen la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) como un trastorno sistémico que ocurre cuando las células inmunes del injerto reconocen al huésped como extraño y atacan las células del cuerpo del receptor. "Injerto" se refiere al tejido trasplantado o donado, y "huésped" se refiere a los tejidos del receptor, Angel et al. (2021). EICH se produce en la siguiente configuración: después del trasplante óseo alogénico (más común), después del trasplante de órganos sólidos

que son ricos en células linfoides (por ejemplo, hígado), o después de la transfusión de sangre no irradiada.

Para que ocurra la EICH, las células inmunológicamente competentes deben trasplantarse a receptores inmunodeficientes y las células transferidas deben reconocer los aloantígenos en el huésped. La incidencia de EICH aumenta con trasplantes de donantes no compatibles, disparidad de HLA y desajuste de sexo, Angel et al. (2021).

Durante el trasplante, el tejido del donante generalmente se obtiene de un individuo genéticamente diferente conocido como aloinjerto. Las células del sistema inmune son entrenadas temprano para diferenciar entre células "propias" y células "no propias". La capacidad de reconocer células "no propias" depende de un conjunto de genes conocidos como genes de histocompatibilidad que proporcionan instrucciones para hacer un grupo de proteínas relacionadas conocidas como complejo mayor de histocompatibilidad (proteínas MHC, por sus siglas en inglés) o antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés). Las células inmunes en el injerto reconocen las proteínas MHC del tejido receptor como "no propias" y desencadenan una respuesta inmune entre el donante y el receptor, Angel et al. (2021). Nassereddine et al. (2017) describe que en la EICH las células T CD-8 citotóxicas del donante reconocen el tejido huésped como extraño y proliferan para causar daño grave a los órganos. Las células T de aloinjerto de donante son las principales células efectoras de la EICH.

Si bien el trasplante de órganos es la mejor solución terapéutica para pacientes con enfermedades crónicas, a menos que el órgano provenga de un gemelo idéntico, siempre existe la posibilidad de que se desarrolle EICH en cierto grado. Si bien existen opciones farmacológicas para atenuar la reacción inmunitaria al órgano, no se ha descubierto un

fármaco que pueda eliminar por completo la EICH. Por ende, es importante seguir en la búsqueda de nuevas alternativas para evitar el desarrollo de esta enfermedad.

1.3 El Costo para el Desarrollo de Nuevos Fármacos es Alto

Según la revisión de Berdigaliyev y Aljofan (2020), el desarrollo de medicamentos toma entre 10 y 15 años y puede exceder los dos mil millones de dólares. Además, ellos clasifican el desarrollo de fármacos en cuatro fuentes: fuentes naturales, como plantas; librerías de moléculas pequeñas y tamizaje de alto desempeño (HTS, por sus siglas en inglés); métodos de diseño de medicamentos asistidos por computadora; fuentes biológicas y agentes biológicos. También es común la reutilización de fármacos, empleando los medicamentos para otros usos terapéuticos para los que inicialmente fueron aceptados, con una rentabilidad menor para los que no son dueños de la propiedad intelectual.

En la revisión realizada por Wouters et al. (2020), con datos del 2009 al 2018, se analizaron 63 nuevos fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense (FDA, por sus siglas en inglés) de 47 compañías diferentes. Los resultados de su análisis arrojaron que la mediana de inversión fue de 985 millones de dólares y la media de 1336 millones de dólares, con costos iniciales de 223 millones hasta 6000 millones de dólares. Los medicamentos para tratamiento de cáncer fueron los más costosos. En el cálculo de los costos, se incluyeron los datos de ensayos clínicos fallidos, gastos preclínicos y costo de capital. Finalmente, en una revisión sistemática realizada por Schlander et al. (2021), con estudios realizados desde 1979 a 2019, los investigadores estimaron que el rango de costos del desarrollo e introducción para comercialización de una droga está entre 161 millones y 4500 millones de dólares. Donde el costo de los fármacos anticancerígenos es el más alto. Asimismo, la evidencia de resultados clínicos seguros no es fácil de obtener debido a la limitada librería de instrumentos para medir la gravedad y progresión de enfermedades.

Además, el tiempo de desarrollo de fármacos según la investigación, varía con respecto al tipo de fármaco, con rangos mínimos de 5.2 años para analgésicos y anestésicos, hasta 9.6 años para fármacos para el sistema nervioso central.

Una de las tareas más importantes durante las etapas iniciales de descubrimiento y desarrollo de fármacos implica realizar estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Los resultados de los estudios ADME son sumamente importantes para poder decidir si el candidato a fármaco avanzará a la siguiente etapa o será descartado. Estos estudios utilizan modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Los modelos *in silico* predicen los comportamientos de los fármacos en función de las propiedades fisicoquímicas de los candidatos a fármacos y la base de datos de propiedades ADME generadas en laboratorios, Zhang D. et al. (2012, p. 550).

Los ensayos microsomales son los ensayos predeterminados para los estudios de metabolismo y DDI (Drug-Drug Interaction) en la etapa de descubrimiento de fármacos, Zhang D. et al. (2012, p. 553).

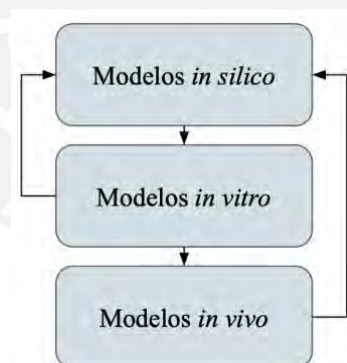


Figura 1. Diagrama de flujo de la interacción de los modelos que se encuentran en la etapa pre clínica.

En la Figura 1, observamos como los datos de los modelos *in silico*, alimentan y ayudan a la formulación de los modelos *in vitro*, los que a su vez ayudan al desarrollo de los modelos *in vivos*. Los resultados de ambos modelos retroalimentan los modelos *in silico*.

1.4 Existen Limitaciones de los Modelos Biológicos para el Desarrollo de Fármacos.

Faqi (2012) afirma que, con el fin de maximizar la eficiencia del proceso de selección, es necesario eliminar lo antes posible los medicamentos que probablemente fracasen. Los experimentos *in vitro* realizados en las etapas iniciales de las pruebas suelen ser poco representativos del entorno *in vivo*, debido a que las células generalmente se cultivan en condiciones estáticas en una matriz bidimensional (2D), mientras que en realidad las células en configuraciones tridimensionales (3D) pueden comunicarse con otras células mientras están expuestas al flujo de nutrientes. Los estudios en animales presentan dilemas éticos, son costosos y, a menudo, poco predictivos de la respuesta humana debido a las diferencias entre especies. Por lo tanto, es esencial que se desarrollen nuevos sistemas de prueba de fármacos que no involucren o limiten el uso de animales y que reflejan el entorno fisiológico para que los fármacos que probablemente fallen se eliminen antes en el proceso de detección, Hyndman et al. (2020, p. 1).

Asimismo, Hewitt et al (2007) afirman que también se usan para evaluar la absorción hepática mediada por los transportadores de captación, Zhang D. et al. (2012, p. 554). Ruegg et al. (1997) y Li et al. (1999) afirman que los cultivos primarios de hepatocitos transportan enzimas y cofactores a concentraciones fisiológicas y proporcionan un entorno de metabolismo de fármacos que imita de cerca las condiciones *in vivo*.

Compagnon et al. (2001) asevera que el modelo de perfusión de órganos imita más de cerca los procesos de ADME. Entre varios modelos de perfusión de órganos, el modelo de perfusión hepática es el más estudiado. Este modelo tiene una ventaja sobre los hepatocitos y otros sistemas subcelulares, debido a que mantiene la estructura y la arquitectura del hígado, preserva todos los transportadores y las poblaciones celulares además de los hepatocitos, por ejemplo, las células de Kupffer, que son importantes para la regulación de las citoquinas

proinflamatorias, y retiene la interacción de célula a célula de hepatocitos y la diferenciación zonal, Zhang D. et al. (2012, p. 554).

Independientemente de la minuciosidad e integridad del trabajo *in vitro*, se requieren estudios en animales para medir la exposición a los medicamentos y determinar las posibles toxicidades. La tendencia actual es usar ratas, bajo condiciones controladas de investigación, como la primera especie animal para probar la exposición a medicamentos porque los costos son relativamente bajos y requieren una pequeña cantidad de compuesto de prueba, Zhang D. et al. (2012, p. 555).

Numerosas preguntas mecanicistas relacionadas con el metabolismo o la toxicidad de los medicamentos se pueden responder mediante el uso de un modelo de ratón diseñado adecuadamente, lo que facilita la seguridad preclínica de los medicamentos y los estudios farmacocinéticos, Zhang D. et al. (2012, p. 558).

Por otro lado, el modelado matemático puede ser útil en el diseño y optimización de nuevos sistemas de prueba de fármacos. Por ejemplo, los prototipos de nuevos dispositivos se pueden construir virtualmente y las características como la geometría se pueden modificar fácilmente, lo que permite elegir el "mejor" diseño antes de la fabricación del dispositivo. A pesar del hecho de que los experimentos generalmente se realizan con concentraciones de soluto de entrada constantes (oxígeno molecular, fármaco, nutrientes) y velocidades de flujo, a menudo surgen gradientes espaciales y dependencias temporales en las concentraciones de soluto y las fuerzas del fluido, fuerzas de cizallamiento, lo que significa que las células no están expuestas a un entorno homogéneo. El modelado matemático y computacional se puede explotar en este sentido para desentrañar la dependencia de la respuesta celular en las diferencias espaciotemporales de las señales químicas y mecánicas, ayudando así con la comprensión y diseño de estos sistemas. Luego, se puede establecer un rango de parámetros operativos

adecuados según el resultado experimental deseado, lo que permite la configuración precisa de dispositivos con menos dependencia de un enfoque de "prueba y error", Hyndman et al. (2020, p. 1).

En la revisión sistemática realizada por Lebedenko y Banerjee (2021), se declara que los principios de diseño microfluídico se pueden utilizar para crear redes vasculares funcionales con propiedades sintonizables adaptadas a órganos específicos: los tipos de células vasculares, la dinámica de flujo, el diámetro del lumen y la arquitectura de ramificación de los vasos se pueden controlar con precisión. Las técnicas fotolitográficas permiten micropatrones 3D únicos que pueden imitar la ramificación de la vasculatura del órgano. Normalmente, estos sistemas están hechos de PDMS, porque este es permeable al oxígeno, molécula que se produce debido a las reacciones dentro de los dispositivos y que, en exceso, resulta dañino para el desarrollo celular. No obstante, la fotolitografía presenta limitaciones debido a los altos costos, los requisitos de alta temperatura y el proceso de grabado en sí que puede requerir solventes tóxicos.

En síntesis, los dispositivos microfluídicos presentan ventajas frente a los estudios *in vitro* tradicionales porque estos intentan recrear el dinamismo propio de los estudios *in vivo*. Asimismo, el modelado y simulación matemática permite reducir la cantidad de prototipos y mejorar la eficacia de los dispositivos, además de que pueden permitir descubrir los aspectos metabólicos que permanecen ocultos en los modelos *in vivo*, si sus resultados se aplican en los modelos *in vitro* dinámicos.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Desarrollar simulaciones computacionales dinámicas basadas en modelos de microbioreactores para tejido cardíaco, hepático y renal con el fin de conocer las

características de comportamiento de los fluidos que permitan reducir el costo de desarrollo de fármacos en la etapa *in vitro*.

1.5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar mediante simulaciones de elementos finitos, el máximo valor de esfuerzo cortante en las zonas de cultivo celular de cada uno de los chips.
2. Caracterizar el campo de velocidades para verificar la ausencia de vórtices en las zonas de los microbioreactores donde se cultivan las células.
3. Evaluar como caso de estudio el mezclado entre una solución de Sirolimus y sangre en los microbioreactores de interés.

El impacto de este trabajo de investigación es predecir el comportamiento fluídico de la interacción entre sangre humana y medicamentos en solución, como el Sirolimus, basado en el coeficiente de difusión y la viscosidad dinámica de las sustancias, con el fin de suministrar datos para el desarrollo de fármacos en la etapa previa a la experimentación *in vitro*. Utilizar datos *in silico* en la etapa de pre-evaluación a la *in vitro*, permitiría ahorrar dinero y tiempo en la construcción de los modelos para los análisis de fármacos, lo que reduce el costo de desarrollo de estos. Para tal fin y basado en los tipos de exámenes toxicológicos, se diseñaron microbioreactores para tejido renal, cardíaco y hepático.

El alcance de la presente investigación es evaluar, mediante simulaciones computacionales, diferentes modelos de microbioreactores en función del comportamiento microfluídico de las soluciones que se emplearán para cultivar tejido renal, cardíaco y hepático, basados en los valores de viscosidad dinámica y los coeficientes de difusión de sangre humana y Sirolimus en solución, con la finalidad de permanecer dentro de los valores de esfuerzo cortante soportados por los diferentes tejidos celulares, determinados en la literatura, para su desarrollo y viabilidad.

Capítulo 2: Marco Conceptual

En este segundo capítulo se describe la anatomo-fisiología de las unidades funcionales de los tejidos de interés: renal, hepático y cardíaco. Luego, cómo es que estas se cultivan y los avances en cuanto a considerar la diferenciación del linaje celular y las formas geométricas que asumen las células, lo cual permitirá poner en contexto cómo mejorar las simulaciones de sistemas dinámicos de células. Se describen los valores de esfuerzo cortante que soportan diferentes tipos de células humanas sin experimentar daño. Después, se profundiza sobre el efecto que genera el Sirolimus en el paciente, el cual es un medicamento que se utiliza para apaciguar los efectos inmunológicos de la enfermedad de injerto contra huésped. A continuación, se presentan los conceptos y ecuaciones que serán necesarias para simular el fenómeno de esfuerzo cortante dentro de microbioreactores, generado por la solución resultante de la mezcla de sangre y Sirolimus solubilizado. Para entender los diseños del próximo capítulo, primero se explicará el material del que normalmente se construyen, PDMS, y la alternativa a este que se utilizó para construir los chips, Resina *VeroClear*TM. Luego, el dispositivo que mezclara la sangre y el Sirolimus, denominado mezclador, y los dispositivos que contendrán las células y la interconexión entre estos, los chips.

2.1 Consideraciones Anatomo-Fisiológicas para el Diseño de Sistemas Fisiológicos mediante Ingeniería de Tejidos

Para obtener un medio óptimo para el cultivo celular, no solo se deben nutrir a las células y respetar los valores de esfuerzo cortante a los que son sometidas, sino que también, estas deben estar cultivadas dentro de geometrías que simulen los límites anatómicos del órgano al que pertenecen. En este sentido, a continuación, se presentará la anatomo-fisiología de las unidades básicas de funcionamiento del riñón, hígado y corazón. En el caso del sistema cardíaco, se mencionan las velocidades y presiones de este.

2.1.1 Sistema Renal

La filtración glomerular es de 125 mL/min ó 180 L/día . La fracción de filtración se define como el cociente de la filtración glomerular entre el flujo plasmático renal. La membrana capilar glomerular, se divide en tres secciones principales: endotelio del capilar, el cual presenta fenestraciones; membrana basal, compuesta por una red de colágeno y fibrillas de proteoglicanos y la capa de células epiteliales, podocitos, compuesto de pedicelos y poros en hendidura. La barrera de filtración glomerular filtra de modo selectivo las moléculas basándose en su tamaño y en su carga eléctrica. Los poros de la membrana glomerular miden en promedio 8 nm . Las moléculas grandes con carga negativa se filtran con menor facilidad que las moléculas con el mismo tamaño molecular y cargas positivas, Hall J. (2020, p. 331). A continuación, se describirán los determinantes de la filtración glomerular. Primero, la filtración glomerular se define como la multiplicación del coeficiente glomerular por la presión de filtración neta. Su ecuación se presenta a continuación, en la ecuación 1.

$$FG = K_f \times (P_G - P_B - \pi_G - \pi_B) \quad (1)$$

Además, se sabe de forma experimental que los valores de las variables en la ecuación para adultos sanos son los siguientes: la presión hidrostática glomerular (P_G), 60 mmHg ; la presión hidrostática en la cápsula de Bowman (P_B), 18 mmHg ; la presión coloidosmótica de las proteínas plasmáticas en el capilar glomerular (π_G), 32 mmHg ; la presión coloidosmótica de las proteínas en la cápsula de Bowman (π_B), 0 mmHg . Entonces, sustituyendo los valores en la resta, obtenemos que la presión de filtración neta es igual a 10 mmHg , o 1333.22 Pa . En este sentido, el aumento del coeficiente de filtración capilar glomerular, K_f , incrementa la filtración glomerular. El K_f es una medida del producto de la conductividad hidráulica y el área superficial de los capilares glomerulares. El aumento de la presión hidrostática en la cápsula de Bowman reduce la filtración glomerular. El aumento de la presión coloidosmótica

capilar glomerular reduce la filtración glomerular. El aumento de la presión hidrostática capilar glomerular incrementa la filtración glomerular, Hall J. E. (2020, p. 333).

El flujo sanguíneo renal (RBF, por sus siglas en inglés) en ambos riñones, representa cerca del 22% del gasto cardiaco. Además, se puede calcular su valor siguiendo la ecuación 2. La presión arterial renal oscila entre 3 y 4 *mmHg*, Hall J. E. (2020, p. 336).

$$RBF = \frac{(presión\ en\ arterial\ renal) - (presión\ en\ vena\ renal)}{(resistencia\ vascular\ renal\ total)} \quad (2)$$

Uno de los mecanismos que contribuye al mantenimiento del flujo sanguíneo renal y de la FG relativamente constantes es la capacidad de cada vaso sanguíneo de resistirse al estiramiento durante el aumento de la presión arterial, conocido como mecanismo miógeno. Esta contracción impide una distensión excesiva de la pared y al mismo tiempo, mediante un aumento de la resistencia vascular, ayuda a impedir un aumento excesivo del flujo sanguíneo renal y de la FG cuando la presión arterial aumenta, Hall J. E. (2020, p. 341).

2.1.2 Sistema Hepático

El fin de este apartado es describir la histología de la unidad funcional del sistema hepático, lobulillo hepático, esto con el fin de poder utilizarlo como inspiración para el diseño de las celdas del microbioreactor para tejido hepático. El componente estructural básico del hígado es el hepatocito, Junqueira L. y Carneiro J. (2013, pp 279-309). Los hepatocitos son de forma poligonal, miden de 25 a 40 μm , y tienen un citoplasma eosinofílico abundante y un núcleo central, Krishna (2014). Estas células epiteliales se agrupan en placas interconectadas. En los cortes histológicos se observan unidades estructurales denominadas lobulillos hepáticos. El lobulillo está formado por una masa poliédrica de base cuasi hexagonal, cuyo diámetro oscila

entre 0.7 y 2 mm, Junqueira L. y Carneiro J. (2013, pp 279-309). Según Rogers y Dintzis (2018), el hígado humano posee aproximadamente 1 millón de lobulillos hepáticos.

2.1.3 Sistema Cardiovascular

En este apartado se describirán las velocidades y presiones que se presentan en diferentes partes del sistema cardiovascular, con el fin de obtener valores para la simulación de los 3 microbioreactores, pero principalmente enfocado en el del tejido cardíaco. En general, podemos definir que para que exista flujo sanguíneo, existen dos componentes, una gradiente de presión, P, y una resistencia, R, en los conductos vasculares.

$$F = \frac{\Delta P}{R} \quad (3)$$

La resistencia es inversamente proporcional a la conductancia, ecuación 4, y la conductancia es proporcional a la cuarta potencia del diámetro de la sección transversal por donde fluye la sangre. Esto se explica gracias a la ley de Poiseuille.

$$\text{Conductancia} = \frac{1}{(\text{Resistencia})} \quad (4)$$

$$F = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 \eta l} \quad (5)$$

$$\text{Conductancia} \approx \text{Diámetro}^4 \quad (6)$$

En la ecuación 5, F es la velocidad del flujo sanguíneo, P es la diferencia de presión en los extremos de los vasos sanguíneos, r es el radio del vaso, l es la longitud del vaso y η es la viscosidad de la sangre.

En condiciones de reposo, la velocidad en la aorta es de 33 *cm/s*, en contraste, en los capilares, que son la unidad de flujo más pequeña del sistema, la velocidad es de 0.3 *mm/s*. La presión de la mayoría de los capilares sistémicos oscila desde 35 *mmHg*, 4666.27 *Pa* cerca de los extremos arteriolares, hasta tan solo 10 *mmHg*, 1333.22 *Pa*, cerca de los extremos venosos; sin embargo, la presión media funcional es de 17 *mmHg*, 2264.74 *Pa*. Curiosamente, en los capilares glomerulares de los riñones, la presión promedio es mucho mayor, 60 *mmHg*, 7999.32 *Pa*. También, es importante mencionar que para que exista turbulencia dentro los vasos sanguíneos, el valor del número de Reynolds debe estar por encima de 2000, no obstante, si se genera un incremento de entre 200 y 400 en el número de Reynolds dentro de la sección por donde pasa un flujo laminar, este transicionará a turbulento, Hall J. y Hall M (2010, pp 157-166).

La filtración de los líquidos a través de los capilares resulta importante porque se genera debido a diferencias de presión. De hecho, las fuerzas hidrostáticas y coloidosmóticas determinan el movimiento del líquido a través de la membrana capilar, estas fuerzas se denominan fuerzas de Starling. Son cuatro, la presión hidrostática capilar, P_c , la presión hidrostática del líquido intersticial, P_{if} , la presión coloidosmótica del plasma en el capilar, Π_p , y la presión coloidosmótica del líquido intersticial, Π_{if} , la interacción de estas presiones se observan en la ecuación 7.

Si la suma de las fuerzas, la presión de filtración neta (NFP, por sus siglas en inglés), es positiva, se generará una filtración de líquidos neta a través de los capilares; inversamente, si es negativa, se genera una absorción de líquidos neta desde los espacios intersticiales hacia los capilares. En circunstancias normales, la NFP es ligeramente positiva. En este sentido, la velocidad de filtración depende además de la NFP, del coeficiente de filtración capilar, K_f , el cual se calcula en valor de la cantidad de poros de cada capilar y la cantidad de estos. La suma

de fuerzas en el extremo arterial del capilar arroja una presión de filtración neta de 13 *mmHg*, 1733.19 *Pa*, Hall J. y Hall M (2010, pp 177-189).

$$NFP = (P_c) - (P_{if}) - \Pi_p + \Pi_{if} \quad (7)$$

$$Filtración = K_f x (NFP) \quad (8)$$

Las tres secciones anteriores nos aportan datos importantes, en el caso renal, nos permite identificar a los podocitos como las células más importantes en la filtración de sustancias en la nefrona, además de los valores de presión bajo los que trabaja este tejido, el más resaltante, presión de filtración neta igual a 1333.22 *Pa*. En el caso del tejido hepático, nos aporta las características geométricas que debe poseer el lugar de siembra de su unidad funcional, el diametro del lobulillo hepático, y de la célula más relevante que lo compone, el hepatocito. Todo esto es importante porque mimetizar el entorno donde se asentarán las células con su medio natural ayuda en su desarrollo. Adicionalmente, en el caso del tejido cardíaco, en vista de que este trabajo se enfoca en la mecánica de fluidos, se encontro pertinente que se detallarán los datos de las velocidades de flujo en las unidades más pequeñas del sistema cardiovascular, los capilares, así, obtuvimos que la velocidad en estos es de 0.3 *mm/s*. Además, la presión media funcional de los capilares es de 2264.74 *Pa*, pero en los capilares glomerulares de los riñones, la presión promedio es mucho mayor, 7999.32 *Pa*.

2.2 Cultivo de Células Involucradas en Enfermedades Crónicas

2.2.1 El Microambiente de los Cardiomiocitos en Cultivo

Radisic et al. (2007) asegura que los cardiomiocitos necesitan mucha energía para su funcionamiento, por lo que su consumo de glucosa es mayor que el de las células normales. Además, Perumal et al. (2012) sostiene que, debido a la relación eléctrica entre los

cardiomiocitos establecida por las uniones comunicantes de las células, y en añadidura a esta afirmación Kehat et al. (2004) y Shadrin et al. (2015) afirman que estos tipos de células están muy cerca unas de otras, lo que conduce a una alta densidad de población celular. Xiao et al. (2014) declara que la perfusión del medio es la solución para superar las limitaciones de difusión de la glucosa; sin embargo, Yang et al. (2015) asevera que la renovación continua del medio en los biorreactores perfundidos tradicionales destruye el microambiente y el efecto autocrino al eliminar los químicos secretados por las células. Pahnke et al. (2016) afirma que mediante la selección del sistema de microfluidos, se logró una mayor difusión y una disminución en la probabilidad de eliminación masiva de señales químicas, Ghiaseddin et al. (2017, p. 3).

2.2.2 El Microambiente de Hepatocitos Cultivados

Hegde et al. (2014) y Lee et al. (2013) declaran que los avances en las técnicas de microfabricación han dado lugar a varios modelos de hígado perfundido. Sin embargo, la mayoría de las plataformas requieren protocolos de carga complejos o un período de estabilización en el chip, lo que puede conducir a una alta tasa de variabilidad y limita su ampliación. Además, Wikswo (2013) sostiene que, aunque las interacciones órgano-órgano pueden proporcionar información valiosa sobre la toxicidad de los fármacos, la conexión y el escalado de diferentes módulos de órganos con diferentes dimensiones y velocidades de flujo sigue siendo problemático. Además, Godoy et al. (2013) y Khetani et al. (2008) aseguran que, entre los desafíos de ingeniería, encontrar una fuente de células robusta es esencial para reproducir funciones específicas de órganos. Funcionalmente, los hepatocitos humanos primarios aislados son el tipo de célula de elección para el metabolismo de fármacos *in vitro* y las evaluaciones toxicológicas. La derivación de hepatocitos a partir de células iPSC ha sido propuesto como un suministro ilimitado de células hepáticas con antecedentes genéticos diversos, con la oportunidad adicional de probar la toxicidad específica del paciente. Schwartz

et al. (2014) afirma que las células similares a hepatocitos derivadas de iPSC (iHeps) en su mayoría se parecen a los hepatocitos en etapa fetal. La combinación de órganos en chips con las tecnologías iPSC será un factor importante para el éxito futuro de mejora en el diseño y obtención de modelos *in vitro*, Schepers et al. (2016, p. 3).

2.2.3 Factores Clave para el Cultivo de Células Renales

Du et al. (2004) afirman que cuando se cultivan las células renales, la función mecano-sensorial de las células endoteliales es de gran preocupación. Cai et al. (2000) aseguran que la fuerza de cizallamiento del fluido induce un detenimiento del desarrollo celular renal. Laffite et al. (2016) y Liu et al. (2003, 2005) sostienen que el dominio del flujo de fluidos sobre la reabsorción de calcio y sodio es un tema crítico que considerar, Sateesh et al. (2018, p.2). Wang et al. (2017) realizaron un análisis en profundidad del glomérulo en un dispositivo de chip para la nefropatía, y este demostró la alta complejidad de intentar imitar el glomérulo completo a nivel de tejido, Sateesh et al. (2018, p.2). Para Kim et al. (2015) la tarea de cultivo y funcionalidad de las nefronas se puede dividir en dos partes: (1) filtrado y (2) biorreactor. Zheng et al. (2010) señala que el diseño de un biorreactor implica el cultivo de células renales en microcanales y perfusión. Las burbujas en los microcanales rompen las células y las dañan, para lo cual se implementa un canal PDMS para la eliminación de burbujas. Li et al. (2012) analizaron las técnicas de electroporación y deselectroporación empleadas en microfluidos para aumentar la viabilidad celular. Por otra parte, Ruige y Fung (2015) establecen un *lab-on-chip* (LOC) para determinar metabolitos y proteínas urinarias, Sateesh et al. (2018, p.2).

En la introducción de la investigación de Sateesh et al. (2018), la cual encontramos en el párrafo anterior a este, se afirma que en la literatura que referencia, esta se centra en la disección de células renales humanas, su cultivo en canal y perfusión. No se ha informado de ningún trabajo sobre la simulación computacional de la estructura, la optimización y la dependencia de la temperatura del rendimiento del dispositivo para imitar exactamente el

entorno interno del túbulo renal. El trabajo *in silico* produce una estructura optimizada mediante el análisis de la estructura para diferentes modificaciones sin fabricación. La simulación computacional permite reducir el costo, la mano de obra, el desperdicio de material y el tiempo de producción. Cuando se desarrolla el riñón en chip, debe implementarse en el cuerpo donde la temperatura es una causa efectiva para densificar el líquido que fluye y sus efectos sobre la presión interna. El trabajo de estos investigadores se centra en el diseño de una estructura optimizada para proporcionar la presión requerida para el cultivo renal que ellos afirman debe ser igual a $1 \frac{dyn}{cm^2}$ o 0,1 Pa, e incluyen el efecto de la temperatura.

2.3 Determinación de valores ideales de esfuerzo cortante para diferentes tipos celulares

Para definir los problemas de diferenciación del linaje celular en modelos con flujo, primero debemos definir el esfuerzo cortante, cuestión que se realizará a continuación, en la ecuación 9, Hibbeler (2004).

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (9)$$

Donde, τ : Esfuerzo cortante; F: Fuerza aplicada; A: El área de la sección transversal del material con un área paralela al vector de fuerza aplicada.

La unidad del esfuerzo cortante, definida en el Sistema Internacional de Medidas (SI), es el pascal, o $\frac{N}{m^2}$. No obstante, para el caso del estudio celular, las unidades de pascales resultan enormes, por lo diminuto del tamaño de las células. Por ende, se utiliza una unidad reducida del pascal, la cual se denomina $\frac{dyn}{cm^2}$. Una dina representa $10^{-5} N$; por ende, al dividirla entre un cm^2 podemos trabajar sin la añadidura de cinco ceros, pero conservando los mismos conceptos, dividir una fuerza entre área.

En la revisión sobre el efecto del esfuerzo cortante en el desarrollo y cultivo celular, y como variante física fundamental en las aplicaciones de dispositivos microfluídicos, Shemesh et al. (2015), determinó que el flujo de sustancias al que los diferentes tejidos de nuestro cuerpo

están expuestos, varía dependiendo de las dimensiones de los conductos, las presiones, y las propiedades mecánicas de las células circundantes. Asimismo, estas variaciones en los flujos regulan procesos unicelulares y multicelulares que se enlistan a continuación: la angiogénesis, Ostergaard et al. (2013); el transporte y función de la linfa, Muthuchamy & Zawieja (2008) y Chakraborty et al. (2015); la diferenciación de las células madre, Conway y Schaffer (2012); la pinocitosis y endocitosis celular, Rizzo et al. (2003); la fluidez de la membrana celular, Butler et al. (2001) y Haidekker et al. (2000); la fusión de las membranas celulares, Kogan et al. (2014), y la absorción de macromoléculas extracelulares, Hallow et al. (2018) y Sharei et al. (2013). En este sentido, es imprescindible que los dispositivos microfluídicos que quieran ser usados para cultivo celular, deban controlar el flujo de acuerdo al tejido que se desee sembrar en cuestión.

En la investigación de Barisam et al. (2017), se evaluaron dos tipos de constructos celulares, los toroides y los esferoides, y dentro de ellos las concentraciones de oxígeno molecular y glucosa. Si bien los toroides, en posición vertical, fueron los que mayores concentraciones de oxígeno molecular y glucosa obtuvieron, desarrollar esa geometría en sí misma es más complicado que un esferoide, además de que para colocarla en los dispositivos microfluídicos, se debe realizar manualmente. Asimismo, estos son los que más expuestos están a las cargas de esfuerzo cortante de los diferentes flujos. Por ello, sólo se analizarán los esferoides en este trabajo. Cabe destacar que el diámetro ideal en el que se observó la menor generación de zonas necróticas en los esferoides, debido a la no perfusión de oxígeno molecular y glucosa, es de 500 μm ; por ello, este es el valor que se utilizará en las esferas que servirán para representar los esferoides en las zonas de cultivo celular de los diseños de los chips de este trabajo.

Los rangos de esfuerzo cortante que se mencionan a continuación fueron todos hallados en la revisión de Shemesh et al. (2015, p 24), y se especificarán los valores límite que soportan las

células endoteliales, células madre, fibroblastos y células cancerígenas porque son los posibles candidatos que se planean utilizar como límites para las simulaciones posteriores de este trabajo.

Tabla 1. Valores máximos de esfuerzo cortante para diferentes tipos celulares, obtenidos de la revisión de Shemesh et al. (2015, p 24).

Tipo Celular	Esfuerzo Cortante	Autores
Células Endoteliales	$0 - 20 \frac{dyn}{cm^2}$	Sellgren et al. (2014)
Células Madre	$0 - 26 \frac{dyn}{cm^2}$	Zheng et al. (2012)
Fibroblastos	$0 - 20 \frac{dyn}{cm^2}$	Walsh et al. (2014)
Células Cancerígenas	$0.25 - 3 \frac{dyn}{cm^2}$	Polacheck et al. (2014)

2.4 Medicamentos que se usan para el Trasplante de Órganos: Sirolimus

El Sirolimus es una clase relativamente nueva de potentes agentes inmunosupresores que alteran la proliferación de células T al inhibir el objetivo de la rapamicina de los mamíferos (mTOR). Sirolimus altera la proliferación de linfocitos inducidos por citoquinas. La vida media prolongada de Sirolimus significa que la dosificación una vez al día es suficiente. Se metaboliza a través del sistema del citocromo P-450; por lo tanto, existe la posibilidad de múltiples interacciones farmacológicas. Los efectos adversos del Sirolimus incluyen hiperlipidemia, anemia, trombocitopenia, diarrea y neumonitis intersticial, Clarkson et al. (2011, p. 831).

Tabla 2. Valores de la densidad de la sangre humana, su viscosidad dinámica y los coeficientes de difusión del Sirolimus y la sangre humana.

Variable	Descripción	Valor	Autores
ρ_{blood}	Densidad de la Sangre	$1060 \frac{kg}{m^3}$	Frías et al. (2015)

μ_{blood}	Viscosidad Dinámica de la Sangre	$3.5 \times 10^{-3} Pa \cdot s$	Frías et al. (2015)
$D_{Sirolimumus}$	Coeficiente de Difusión del Sirolimumus	$2.5 \times 10^{-4} \frac{mm^2}{s}$	Hyndman et al. (2020)
D_{blood}	Coeficiente de Difusión de la sangre	$1 \times 10^{-3} \frac{mm^2}{s}$	Zuhriyah et al. (2020)

Todas estas variables son necesarias para desarrollar las simulaciones del comportamiento fluídico y la mezcla entre el Sirolimumus y la sangre. La densidad de la sangre y su viscosidad dinámica se utilizarán para las ecuaciones de mecánica de fluidos, debido a que se supondrá en primera instancia que los chips están llenos de sangre. Luego, los valores de los coeficientes de difusión del Sirolimumus y sangre son necesarios para simular la mezcla de los mismos.

2.5 Conceptos y Ecuaciones necesarias para el Modelado Computacional

A continuación, se describirán las ecuaciones que se utilizarán para modelar las simulaciones computacionales que se desarrollarán.

2.5.1 Mecánica de Fluidos

Los conceptos, principios y ecuaciones que gobiernan y orquestan las simulaciones que se realizan, se sostienen en la mecánica de fluidos. Así, el módulo de COMSOL de Flujo Laminar, trabaja y desarrolla sus cálculos en las ecuaciones de este campo de la ciencia; por ende, es necesario desarrollar y delimitar los conceptos que utiliza el software para modelar los dispositivos microfluídicos.

2.5.1.1 Volumen de Control

Un cuerpo de fluido que está en movimiento puede ser definido como un volumen de control, definición de Euler, o por una masa de control, definición Lagrangiana, Cengel y Cimbala

(2017, p. 138). El método de análisis en este trabajo usa la definición del volumen de control (VC), el cual es determinado por un espacio tridimensional fijo en coordenadas espaciales de referencia, por donde atraviesa un fluido. Este volumen tiene dos componentes geométricos, el volumen (VC) y la superficie (SC) que lo envuelve. Ese volumen es contenido por la geometría del dispositivo donde se simula el comportamiento del fluido, también, se puede trabajar en superficies, geometrías de solo dos dimensiones.

2.5.1.2 Conservación de la Masa

La ley de conservación de masa, definida en un VC, Cengel y Cimbala (2017, p. 445), se expresa mediante la siguiente ecuación.

$$0 = \int_{VC} \frac{\partial \rho}{\partial t} dt + \int_{SC} \rho \vec{V} \cdot \vec{n} dA \quad (10)$$

Donde la integral sobre VC representa el cambio de masa dentro del volumen de control debido a cambios temporales de la densidad del fluido, y la integral sobre SC representa el cambio de masa debido al flujo que entra o sale de la superficie de volumen de control. ρ es la densidad, V es la velocidad absoluta, n es el vector normal a la superficie SC.

La Ecuación de Continuidad se presenta a continuación, su importancia en este trabajo radica en que es la primera que sirve como pilar del modulo de COMSOL de Flujo Lamniar, también es necesaria para poder definir la Ecuación de Navier-Stokes, la cual se definirá posteriormente.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot (\rho \vec{V}) = 0 \quad (11)$$

La ecuación (11) estipula que la masa dentro un sistema aislado permanece constante, a pesar de que esta se transforme. Asimismo, la masa del sistema del sistema respecto al tiempo más

la suma de la masa que pasa a una velocidad a través de la sección transversal del volumen que contiene esta masa permanece constante. En este sentido, ρ representa la densidad del fluido, t representa el tiempo y \vec{V} la velocidad del fluido. $\frac{\partial \rho}{\partial t}$ es el componente transitorio y $\vec{\nabla} \cdot (\rho \vec{V})$ el componente convectivo.

2.5.1.3 Ecuación de Cauchy

A continuación se presenta la Ecuación de Cauchy, cuya importancia es su utilización para poder definir la Ecuación de Navier-Stokes.

$$\frac{\partial \rho \vec{V}}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \rho (\vec{V} \vec{V}) = \rho \vec{g} + \vec{\nabla} \cdot \sigma_{ij} \quad (12)$$

Donde en (12), ρ representa la densidad \vec{V} representa la velocidad, g representa la gravedad y σ_{ij} es el tensor de esfuerzos. $\frac{\partial \rho \vec{V}}{\partial t}$ representa el termino transitorio, $\vec{\nabla} \cdot \rho (\vec{V} \vec{V})$ representa el termino advectivo, $\rho \vec{g}$ representa el termino de la gravedad y $\vec{\nabla} \cdot \sigma_{ij}$ representa el componente de presión ejercido por las paredes del contenedor.

2.5.1.4 Ecuación de Navier-Stokes

Con el uso de la Ecuación de Continuidad y la Ecuación de Cauchy es posible aproximarse a la solución de cada punto del volumen de control cuando se analiza la mecánica de fluidos correspondiente, lo que corresponde a la Ecuación de Navier-Stokes, Cengel y Cimbala (2017, p. 470).

$$\rho \frac{D\vec{V}}{Dt} = -\vec{\nabla} P + \rho \vec{g} + \mu \nabla^2 \vec{V} \quad (13)$$

Esta ecuación nace de la segunda ley de Newton y representa la suma de fuerzas que se aplican sobre un fluido. Así, tenemos que ρ representa la densidad, V la velocidad, P la presión, g la gravedad y μ la viscosidad dinámica. $\rho \frac{D\vec{V}}{Dt}$ representa el termino transitorio, pero además es la

masa por la derivada de la velocidad, lo que es aceleración, cuyo producto es igual a fuerza. Esto es equivalente a la suma de fuerzas de $-\vec{\nabla}P$ la presión ejercida por el contenedor, más el componente de fuerza que ejerce la gravedad representado por $\rho\vec{g}$, más $\mu\nabla^2\vec{V}$ que representa el término viscoso del fluido.

2.5.1.5 Condiciones de Frontera

Condición de No Deslizamiento

Una de las condiciones de frontera más usadas es la condición de no deslizamiento entre el fluido en movimiento con una pared sólida, esta condición postula que la velocidad del fluido infinitesimalmente cercano a la pared tiene la misma velocidad que la pared o, dicho de otro modo, las partículas de fluido adyacentes a la pared se adhieren a la superficie de la pared. Es decir:

$$\vec{V}_{fluido} = \vec{V}_{pared} \quad (14)$$

Donde V_{fluido} es la velocidad del fluido cercano a la pared. Aunque esta condición es bastante usada para simplificar el cálculo computacional cuando se realiza un análisis en mecánica de fluidos usando la ecuación de Navier-Stokes, es necesario analizar si esta condición es correcta; por ejemplo, en el caso de que el material de la pared sea hidrofóbico, se ha observado que sí existe un deslizamiento del fluido en la superficie.

2.5.2 Fenómeno de Transporte de Masa: Difusión y Convección

El segundo fenómeno que se observará en las simulaciones de los dispositivos es el mezclado de fármacos con diferentes fluidos biológicos. Para entender cómo es que sucede este fenómeno, son necesarios los conceptos de difusión y convección, los cuales serán tomados de Bird et al. (2006).

2.5.2.1 Difusión

La ecuación básica que define este mecanismo es la Primera Ley de Fick, definida en (15).

$$\vec{j}_A = -\vec{D}_{AB} \nabla \vec{c}_A \quad (15)$$

Donde \vec{j}_A , es el flujo difusivo, D_{AB} es el coeficiente de difusión y representa difusividad de la especie A en B, \vec{c}_A es la concentración de la especie A, el signo (-) representa que la dirección de la difusión es opuesta al gradiente de concentración, que el soluto se mueve de una zona de mayor concentración a una de menor concentración, Bird et al. (2006).

2.5.2.2 Convección

La ecuación (15) explica el movimiento de los solutos debido solo al gradiente de concentración; sin embargo, si se le añade movimiento a los fluidos, es necesario utilizar la siguiente ecuación, denominada Ecuación de Convección, la cual explica el aporte del componente cinético en el flujo difusivo.

$$\vec{j}_A = \nabla \cdot (c\vec{u}) \quad (16)$$

Donde \vec{j}_A representa el flujo difusivo, \vec{u} representa la velocidad del fluido que contiene la especie diluida y c es la concentración de la especie, Bird et al. (2006).

Para resumir lo antes expuesto, resulta relevante conocer los fundamentos y ecuaciones que sostienen las simulaciones matemáticas que se desarrollaran en los siguientes capítulos. Desde el punto de vista de la mecánica de fluidos es sumamente importante resaltar la Ecuación de Continuidad, la Ecuación de Cauchy y la Ecuación de Navier-Stokes, el pilar fundamental de este campo de estudio. En el caso del transporte de masas, entender la Primera Ley de Difusión de Fick y la Ecuación de Convección. Asimismo, en aras de entender las simplificaciones que realiza COMSOL, conocer la condición de no deslizamiento, para saber en qué casos es oportuno que se use y en cuales, no.

2.6 Polidimetilsiloxano (PDMS)

En la revisión sistemática realizada por Lebedenko y Banerjee (2021) se afirma que los principios de diseño microfluídico se pueden utilizar para crear redes vasculares funcionales

con propiedades sintonizables adaptadas a órganos específicos y que los tipos de células vasculares, la dinámica de flujo, el diámetro del lumen y la arquitectura de ramificación de los vasos se pueden controlar con precisión. Las técnicas fotolitográficas permiten micropatrones 3D únicos que pueden imitar la ramificación de la vasculatura del órgano. Normalmente, estos sistemas están hechos de polidimetilsiloxano (PDMS), porque este es permeable al oxígeno molecular, molécula que se produce debido a las reacciones dentro de los dispositivos y que, en exceso, resulta dañino para el desarrollo celular. No obstante, la fotolitografía presenta limitaciones debido a los altos costos, los requisitos de alta temperatura y el proceso de grabado en sí que puede requerir solventes tóxicos. Además, el PDMS presenta una alta propensión a la adsorción y absorción de moléculas pequeñas como los fármacos. Asimismo, es una sustancia que no se encuentra en el cuerpo humano y, por lo tanto, no imita la composición química de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), Zamprogno et al. (2021). Por todo lo anterior expuesto y en vista de que las propiedades de adsorción y absorción en los poros de sus paredes, retención de moléculas como los fármacos, van en contra de los objetivos principales de este trabajo, el cual busca sentar las bases para la producción de dispositivos que puedan utilizarse para el desarrollo de medicamentos en la etapa pre-clínica. En todo caso, se puede utilizar PDMS para la construcción de los chips que se desarrollarán en este manuscrito, como base, solo si luego este será recubierto con proteínas de la ECM, para poder fomentar el desarrollo celular.

2.7 Resina Veroclear

En vista de lo anterior expuesto sobre el PDMS, es necesario buscar un sustituto que cumpla con el objetivo de servir como base para que fomente el desarrollo y diferenciación celular con la misma eficiencia que los materiales tradicionales que se usan en los laboratorios. El

segundo requisito es que este material este disponible en la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). Por lo anterior expuesto es que se elige la resina *VeroClearTM*.

Al ser VeroClear un producto comercial, no se conoce con exactitud su composición; no obstante, se ha informado que contiene oligómero de acrilato, acrilato de isobornilo, monómero acrílico, un fotoiniciador y éster de ácido acrílico. Cuando se limpian los dispositivos, previo al cultivo, con isopropanol y alcohol metilado, estos ayudan a la proliferación de células musculoesqueleticas (C2C12) y a la diferenciación de células neuronales (SH-SY5Y); sin embargo, no poseen biocompatibilidad con células hepáticas (HepG2). Esta resina también ha sido probada para cultivar células endoteliales de la arteria pulmonar bovina (BPAECs, por sus siglas en inglés) y las líneas de riñón canino Madin-Darby (MDCK, por sus siglas en inglés). En dispositivos hechos de VeroClear que no han sido tratados con ninguna solución o compuesto, las células se volvían inviables antes de 24h, debido a que pierden su morfología y dejan de estar adheridas a la superficie. En contraste, cuando se trata la resina con solución de hidróxido de sodio/metasilicato de sodio, las células pulmonares y renales permanecen viables incluso después de 72h, con resultados similares a los que alcanzan las placas de poliestireno, Currens et al. (2022). Asimismo, se sugiere desinfectar los dispositivos con etanol y luego cubrir la resina con fibras de colágeno en forma de andamios producidos con la técnica de hilado electrostático de fibras, Cenhrang et al. (2022). Finalmente, al ser esta resina utilizada en manufactura aditiva es importante tomar en consideración la dirección en la que se imprime el dispositivo con respecto al cabezal, sea en paralelo, diagonal o perpendicular; debido a que esto influye en la distribución de las estructuras porosas del dispositivo, Keshan et al. (2021).

2.8 Micromezcladores

Según Liu et al. (2013), los micromezcladores son los componentes claves para el mezclado de sustancias en los sistemas de microfluidos y sus potenciales aplicaciones incrementan cada día. Según Jeon y Shin (2009), investigadores de diversas disciplinas como química, biología,

medicina, la industria alimentaria e ingeniería genética encuentran útiles los sistemas microfluídicos por su gran variedad de características beneficiosas como bajo costo, tiempo de reacción química rápida, portabilidad, bajo requerimiento energético y sus diversos diseños. En principio, según Liu et al. (2013), el mezclado de dos o más sustancias depende del fenómeno de convección y difusión. Normalmente, el mezclado por medio de dispositivos de microfluídica, funciona a número de Reynolds (Re) bajos, menores a 200; por ende, es estrictamente dependiente del fenómeno de difusión molecular. Debido a esto, Lee y Lee (2008), definen que el mezclado completo de dos fluidos en un canal microfluídico, típicamente, necesita bastante tiempo, varios minutos, y canales largos, varios centímetros.

Para solucionar este problema, según Hessel et al. (2005), diferentes estrategias fueron desarrolladas, en busca de reducir el tiempo de mezclado y la longitud del canal; por ello, los micromezcladores pueden clasificarse en dos grandes grupos: micromezcladores activos y micromezcladores pasivos. Según Bhagat y Papautsky (2008), los micromezcladores activos requieren energía externa, como variación periódica de bombeo, inestabilidad electrocinética, vibración inducida acústicamente, fusión de gotas inducida por electrohumectación, acción magnetohidrodinámica, membrana de vibración piezoeléctrica o microválvulas con bombas integradas, lo que genera, en palabras de Hossain y Kim (2015), que el proceso de fabricación como el de limpieza del dispositivo sean complejos.

Por otro lado, según Falk y Commenge (2010), los micromezcladores pasivos utilizan la energía del fluido para crear estructuras multilaminares, las cuales se recombinan para promover el mezclado por medio del fenómeno de difusión. En este sentido, según Capretto et al. (2011), los mezcladores pasivos son elegidos, por encima de los activos, en aplicaciones químicas y biológicas; debido a que los mecanismos de los mezcladores activos pueden dañar los fluidos biológicos. También, según Giordano y Cheng (2001), es importante describir las aplicaciones en las que los micromezcladores son usados en el campo de la biología y la

química transformando líquidos complejos, mezclas heterogéneas, en líquidos homogéneos, que se pueden utilizar fácilmente para una mayor preparación de muestras, concentración/separación de muestras, extracción de biocomponentes activos y análisis complejos. Estos, cobran especial importancia cuando los métodos de biología molecular se utilizan en el lugar donde se encuentra el paciente o los consultorios médicos. En este sentido, en la investigación de Jeong et al. (2010) se categorizan los micromezcladores dependiendo de sus aplicaciones en química, biología y detección y análisis. Gracias a esto, los autores concluyeron que en la mayoría de los micromezcladores se requiere un Re entre 0.1 y 100; así como, un tiempo de mezclado de entre 0.01 y 1 s, es válido aclarar que este número adimensional depende de las dimensiones del contenedor donde se encuentra el fluido; por ende, en los micromezcladores encontramos valores de Re pequeños en relación a los que normalmente se desarrollan a escala humana, y que los rangos para delimitar comportamiento laminar o turbulento se ven reducidos también.

El dispositivo más resaltante, según Jeong et al. (2010), en el que se usan los micromezcladores en el campo químico, biológico y biomédico, es el laboratorio en un chip, o Lab-on-a-Chip (LOC, por sus siglas en inglés). Esto, debido a que LOC permite el desempeño de diversas funcionalidades en un chip pequeño incluyendo: mezclado, reacción/incubación, separación y análisis. Por ejemplo, en un dispositivo LOC para análisis de sangre se busca que la sangre se mezcle de manera homogénea con anticoagulantes y reactivos para detectar bacterias, virus o ADN.

2.9 Organ-on-a-Chip y Human-Body-on-a-Chip

Bhatia e Ingber (2014) definen que el Organ-on-a-Chip tiene como objetivo imitar la arquitectura y funcionalidad celular organotípica clave, la matriz extracelular (ECM) 3D, los factores bioquímicos y las señales biofísicas a una escala más pequeña, lo que sirve para el

modelado de enfermedades y la detección de fármacos. Como un tipo de dispositivo de microfluidos, Organ-on-a-Chip se fabrica con el polímero orgánico a base de PDMS utilizando la técnica de litografía blanda estándar; como tal, el chip tiene un tamaño compacto y microcanales para modelar con precisión las células y manipular varios parámetros químicos y fluidicos, como el caudal, la presión, el oxígeno molecular y el pH, proporcionando condiciones de cultivo controlables, Ma et al. (2021).

Los seres humanos están compuestos por órganos y tejidos que poseen múltiples funciones fisiológicas y representan una especie de sistema complejo. En este sentido, para poder observar el metabolismo de un fármaco es necesario utilizar y unir varios organos en un chip. A estos dispositivos microfluidicos se les denomina Body-on-a-chip o Human-on-a-chip. Estos dispositivos pueden usarse para observar procesos farmacocinéticos continuos o vinculados, como ADME de varias vías de administración de fármacos, y los datos obtenidos pueden aplicarse para construir modelos matemáticos para predecir la eficacia de los fármacos, Kimura et al. (2018).

Debemos considerar que estos dispositivos Body-on-a-chip no son capaces de reproducir todas las respuestas biológicas. Según Shuler y Abaci (2015), la importancia del Body-on-a-chip es descubrir respuestas desconocidas que solo se pueden observar en interacciones en tiempo real entre órganos. En otras palabras, la tecnología Body-on-a-chip debe usarse con modelos fármaco-cinéticos para predecir mecanismos o fenómenos desconocidos, Kimura et al. (2018).

Capítulo 3: Metodología

En esta sección se describirán los módulos que se usarán del software COMSOL Multiphysics versión 5.6 para las simulaciones de los dispositivos microfluídicos, y las ecuaciones que los sostienen. En este sentido, primero se explicará el principio de funcionamiento de los módulos y las variables que se agregaron para las simulaciones. Luego se mostrarán las dimensiones de los microbioreactores, a los que también se denominarán chips, para las simulaciones, basadas en la anatomo-fisiología del órgano al que pertenecen las células, para luego construir las geometrías de los microbioreactores.

3.1 Módulos de COMSOL

En esta sección, se describe el funcionamiento de los módulos de COMSOL que se usarán en las simulaciones: Flujo Laminar y Transporte de Especies Diluidas. La versión de COMSOL que se utiliza es la 5.6 (Classkit License). El hardware que se utilizó fue el siguiente: procesador Intel Core i7-8700 con frecuencia base de 3.2 GHz y 16 Gb de RAM a 2666 MHz, los datos de la tarjeta gráfica no son necesarios, puesto que COMSOL no la utiliza para acelerar el trabajo computacional.

Flujo Laminar

El módulo de Flujo Laminar se sostiene en dos ecuaciones: Ecuación de Continuidad y la Ecuación de Navier-Stokes. Los parámetros que se añadieron en este modulo son la densidad y la viscosidad dinámica de la sangre humana, y la velocidad inicial. La velocidad y la presión están relacionadas y son inversamente proporcionales; por ello, al estar relacionados, los resultados de este modulo son los campos de velocidad y de presión. En este sentido, estos campos se pueden observar en superficies, geometrías dos dimensionales, y en volúmenes, geometrías tridimensionales. Asimismo, se pueden realizar simulaciones estacionarias, en un tiempo que tiende al infinito, y simulaciones tiempo dependientes. En estas últimas se puede

observar cómo el o los fluidos se desarrollan, por lo que resulta en una herramienta sumamente útil para entender el fenómeno en cuestión. Por defecto, el módulo define la condición de no deslizamiento en las paredes. Como la temperatura afecta el comportamiento de los líquidos, es recomendable establecerla constante, en este trabajo se definió a 20 °C.

Transporte de Especies Diluidas

El módulo de Transporte de Especies Diluidas se sostiene de dos ecuaciones: La Primera Ley de Fick y la Ecuación de Convección. La primera depende del coeficiente de difusión de la especie y de su concentración y la segunda de la velocidad ejercida en la solución y su concentración. Por ello es que los parámetros que se añadieron en las simulaciones son el coeficiente de difusión de la sangre y de Sirolimus, la concentración de estas dos especies y la velocidad inicial en las entradas. En este sentido, como en las simulaciones planteadas existe componente de velocidad, se definió que las mismas utilicen los resultados del módulo de Flujo Laminar para obtener los resultados de la distribución de la concentración a lo largo de la geometría. Este módulo puede ser utilizado para simulaciones en una, dos o tres dimensiones espaciales.

3.2 Definición de variables y ploteo de los microbioreactores

A continuación, se presentan las diferentes variables que corresponden a las dimensiones de cada una de las geometrías que se usarán para los modelos de chips para cada tipo celular. Cabe destacar que cada uno de los diseños, se inspiró en el ámbito farmacéutico; por ende, son similares a los dispositivos de HTS. También, se encuentran los parámetros que los módulos de COMSOL necesitan para computar las soluciones.

3.2.1 Definición de las condiciones iniciales.

Las condiciones iniciales básicas son condición de no deslizamiento dentro de las paredes de los dispositivos, presión fuera del dispositivo igual a 0 Pa. Los valores de presiones y

velocidades iniciales en las entradas de los dispositivos serán definidos más adelante en este manuscrito, puesto que están enteramente determinadas por el tipo de tejido que se desea cultivar en los dispositivos.

3.2.2 Tejido renal en un Chip

A continuación, se presentarán las dimensiones de las diferentes versiones del riñón en un chip que se desarrolló. Los objetivos de este biorreactor son dos, el primero recrear el trabajo realizado por Sateesh (2018), y luego el poder mezclar el Sirolimus con la sangre humana dentro de las dimensiones del cuerpo del biorreactor desarrollado por Sateesh (2018). En este sentido se realizaron cinco versiones, la primera, similar al diseño de Sateesh (2018); sin embargo, las cuatro siguientes fueron iteraciones con el fin de mezclar los dos compuestos antes mencionados. Así, en esta sección se presenta, primero, la tabla con las dimensiones del microbioreactor y valores necesarios para las simulaciones de fluídica y transporte de especies diluidas, seguidamente, el ploteo de las geometrías de cada diseño. Cabe resaltar que la velocidad utilizada para cada versión fue elegida con fines de reproducción del trabajo del investigador antes mencionado.

Versión 1

Esta primera versión fue inspirada en el trabajo de Sateesh (2018). En la tabla 3 podemos observar los valores para las simulaciones del módulo de Flujo Laminar y de Transporte de Especies Diluidas. Todos estos parámetros fueron utilizados en las cinco versiones.

Versión 2

Luego de revisar los resultados de la simulación de la Versión 1, se realizaron modificaciones a la geometría del dispositivo. El pensamiento que guió este diseño se basó en que el colocar obstáculos en el camino del flujo genera turbulencia, esta produce que se mezclen las moléculas, también el reducir el camino de las líneas de flujo, genera que estas disminuyan y si la disminución es grande, se unan, entonces, el producto de esto es el mezclado de las

moléculas. En ese sentido, se generaron estos recovecos con el fin de que en estos se produzca el mezclado de las sustancias. También se buscó que se genere turbulencia en la última etapa del rectángulo mayor y reducir las salidas hacia las alas, con el pensamiento a priori de que esto produciría el mezclado de las sustancias.

Versión 3

Luego de revisar los resultados de la simulación de la Versión 2, se realizaron modificaciones a la geometría del dispositivo, las cuales son originales de este trabajo. En vista de los resultados de la Versión 2, se utilizó un concepto bastante conocido en el campo de los micromezcladores. Este diseño que se añadió es llamado modelo Serpentina, y el objetivo de este no es sólo la reducción de las líneas de flujo iniciales de la Versión 1, sino que también se basa en que el mezclado de las sustancias se logra con una longitud mayor de desplazamiento de las moléculas, básicamente las coordenadas de posición de las alas no fueron modificadas.

Versión 4

Luego de revisar los resultados de la simulación de la Versión 3, se realizaron modificaciones a la geometría del dispositivo, las cuales son propias de este trabajo. En esta versión, se iteró el diseño de la versión anterior, pero también se añadieron obstáculos al camino de las líneas de flujo, entonces, en esta versión se presentan dos conceptos, el mayor desplazamiento de las moléculas gracias al diseño de serpentina y también la generación de turbulencias debido a los obstáculos en forma de cuartos de elipse, con el fin de mejorar el mezclado de las sustancias. De nuevo, las coordenadas de posición de las alas no fueron modificadas.

Versión 5

Luego de revisar los resultados de la simulación de la Versión 4, se realizaron modificaciones a la geometría del dispositivo. En esta última versión, se utilizaron los conceptos y el diseño de la Versión 4, no obstante, se alargó el camino de serpentina y la cantidad de obstáculos,

esto gracias a que finalmente se movieron las alas del microbioreactor hasta el tope del rectángulo mayor.

Tabla 3. Parámetros para simular el riñón en un chip, inspirado en el diseño de Sateesh et al. (2018).

Variable	Unidad	Descripción de la Variable
v_o	$0.2 \frac{m}{s}$	Velocidad en la Entrada
c_o	$10 \mu M$	Concentración de las Especies
ρ_{blood}	$1060 \frac{kg}{m^3}$	Densidad de la Sangre
D_{blood}	$1 \times 10^{-3} \frac{mm^2}{s}$	Coefficiente de Difusión de la Sangre
$D_{Sirolimus}$	$2.5 \times 10^{-4} \frac{mm^2}{s}$	Coefficiente de Difusión de Sirolimus
μ_{blood}	$3.5 \times 10^{-3} Pa \cdot s$	Viscosidad Dinámica de la Sangre

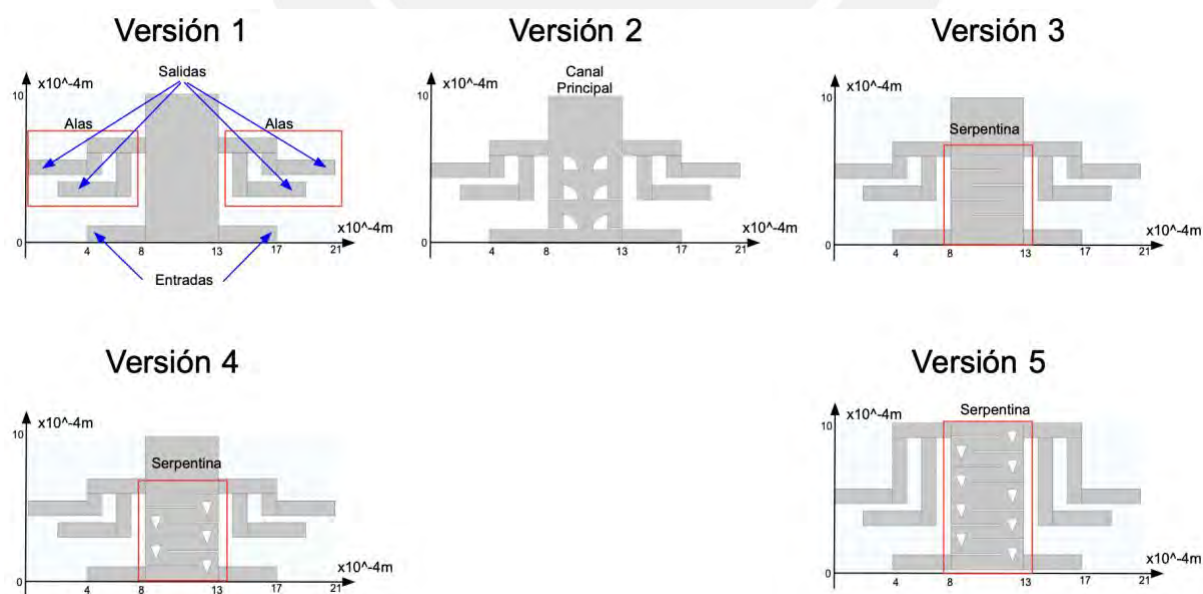


Figura 2. Las cinco versiones del tejido renal en un chip. Las unidades del eje X e Y son $10^{-4}m$.

La primera versión fue inspirada en la investigación de Sateesh (2018). En las siguientes versiones se hicieron modificaciones al canal principal con el objetivo de mejorar la mezcla de sangre y Sirolimus. Debido a que las dimensiones de cada una de las versiones es relativamente pequeña, no se logró realizar el mezclado de ambas soluciones, a pesar del valor de velocidad relativamente elevado que generó valores de cizallamiento en el orden de los kPa , lo que es contraproducente para el desarrollo celular, como se explico en secciones anteriores. Por ello, es que se decidió diseñar otra versión con dimensiones mayores. Asimismo, los lugares de siembra celular, las alas de $100 \mu m$, son sumamente pequeños como para contener los esferoides de $500 \mu m$ que se desean.

Versión Final

En base a la anatomía renal, se creó la siguiente geometría, tanto en 2D como en 3D debido a una extrusión en el eje Z de $500 [\mu m]$. La velocidad inicial en los inlets es de 0.001 m/s . A partir de ahora se define trampa como el lugar de siembra celular donde se colocarán los esferoides de $500 \mu m$.

Tabla 4. Dimensiones de cada una de las estructuras que se utilizaron para plotear la geometría de la versión final del chip para tejido renal.

Variable	Unidad	Descripción de la Variable
cr	1.75 cm	Radio de Circunferencia de Riñon
cp	0.5 cm	Radio de Circunferencia Pequeña
li	0.5 cm	Lado del Cuadrado de la Entrada
ar	0.5 cm	Ancho del Rectángulo
lr	1 cm	Longitud del Rectángulo

rt	$1000 \mu m$	Rectángulo de la Trampa
at	$100 \mu m$	Ancho de la Pared de la Trampa
ls	$100 \mu m$	Lado de las Salidas
az	$500 \mu m$	Altura en el eje z

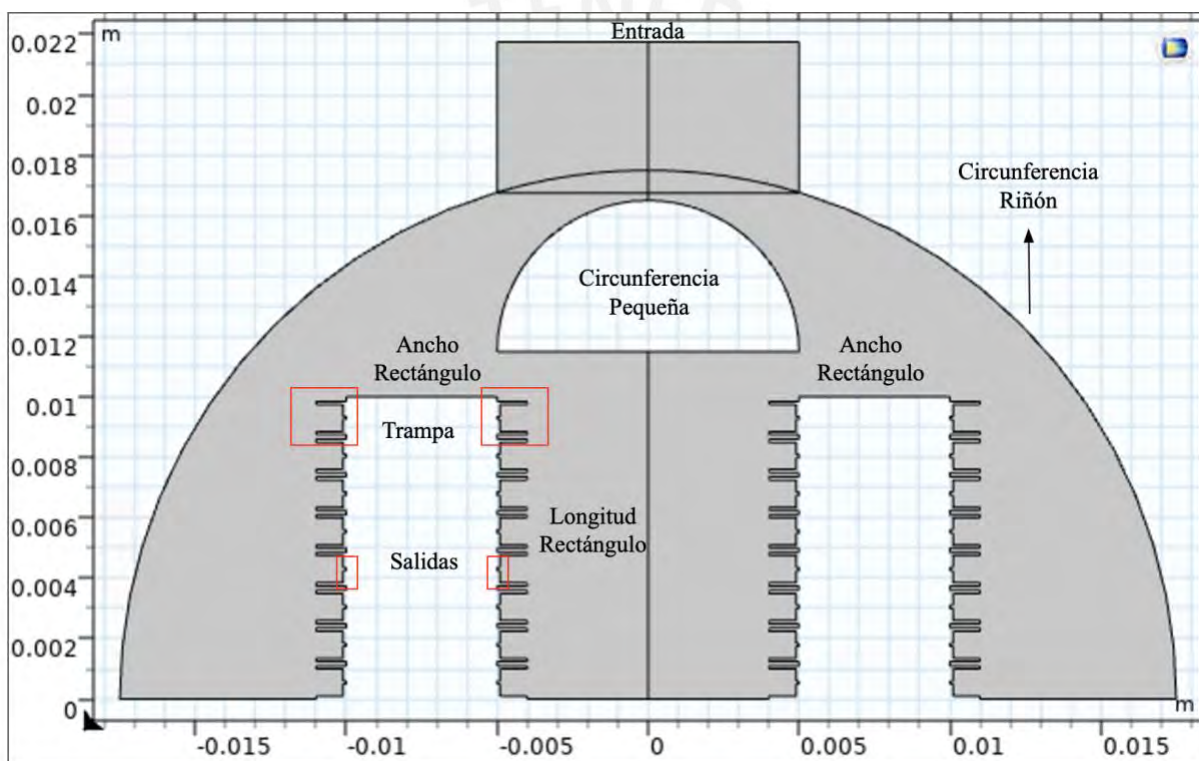


Figura 3. Diseño de la versión final del chip para tejido renal desde una vista del eje XY, la altura en el eje Z es de $500 \mu m$.

3.2.3 Tejido hepático en un Chip

La siguiente geometría se basó en la investigación de Schepers et al. (2016). En este, existe la unidad básica del dispositivo, en donde se cultivarían las células, denominadas trampas y el dispositivo en sí, donde se encuentran todas las trampas de este. Cabe destacar que las trampas, denominadas así por los investigadores, o lobulillos hepáticos, están basados en la

anatomo-fisiología hepática, justamente, y aunque resulte sorprendente, los lobulillos hepáticos que son las estructuras funcionales del hígado, y que están conformados por hepatocitos, presentan forma cuasi-hexagonal. En este sentido, lo que se buscó realizar con las herramientas de diseño de COMSOL fue la construcción de una estructura circular que se asemeje a un hexágono. Luego, con esta unidad básica creada, todas estas estructuras se colocan en un rectángulo al cual se denominó micrubioreactor para tejido hepático o tejido hepático en un chip.

Lobulillo hepático

A continuación, en la siguiente tabla, se enseñan los parámetros de las dimensiones de una trampa del dispositivo.

Tabla 5. Parámetros de la geometría de las trampas del hígado en un chip.

Variable	Unidad	Descripción de la Variable
ts	$500 \mu m$	Longitud del lado inferior y superior de la Trampa
hts	$100 \mu m$	Espesor del lado de la Trampa
tsm	$400 \mu m$	Longitud del lado de la Trampa de en medio
rs	$250 \mu m$	Radio de la Circunferencia de la Trampa
ari	$25 \mu m$	Ancho de los Rectángulos inclinados
lri	$100 \mu m$	Longitud de los Rectángulos inclinados

En la siguiente figura se observa la geometría de la trampa o lobulillo hepático del hígado en un chip.

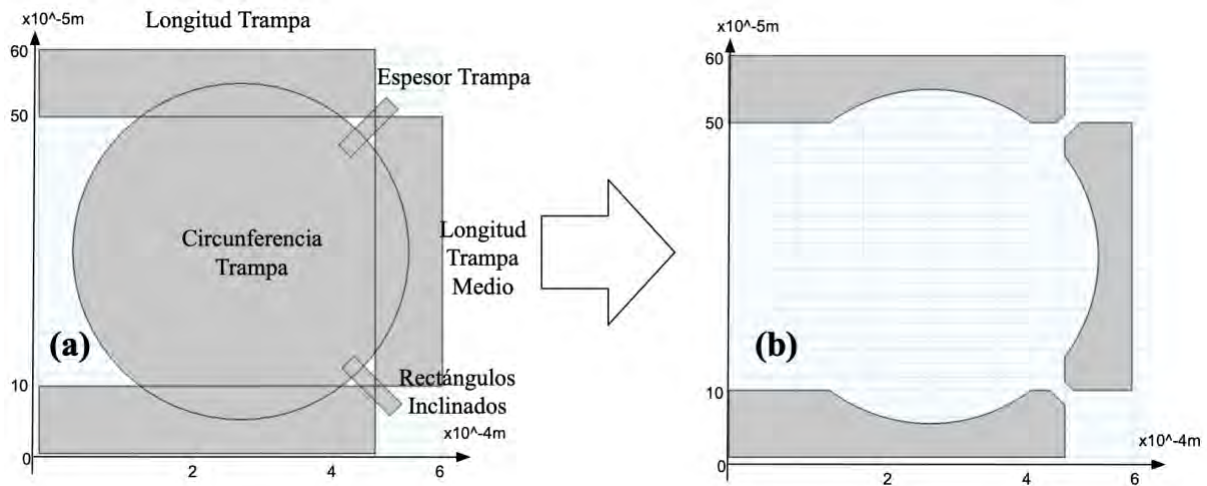


Figura 4. Ploteo del lobulillo hepático. (a) la geometría de las figuras geométricas básicas que conforman el lobulillo hepático. (b) geometría de las figuras geométricas básicas que conforman el lobulillo hepático luego de ser diferenciadas.

Tejido hepático en un a chip

A continuación, en la siguiente tabla, se enseñan los parámetros de las dimensiones del dispositivo.

Tabla 6. Parámetros de la geometría del hígado en un chip.

Variable	Unidad	Descripción de la Variable
x_{num}	28	Número de trampas en X tanto para columnas pares como impares, en total existen 56 trampas en el eje X.
y_{num}	6	Número de trampas en el eje Y tanto para las columnas pares como impares, en total existen 6 trampas por columna. Con un total de 12 en el eje Y.
hbr	1.0 cm	Ancho del Rectángulo
wbr	4.5 cm	Largo del Rectángulo
dv	750 μm	Distancia vertical y horizontal entre las trampas de las columnas pares e impares

d_i	1500 μm	Distancia vertical y horizontal entre las trampas impares o entre pares
$lado$	1 cm	Lado del Cuadrado de la entrada y la salida

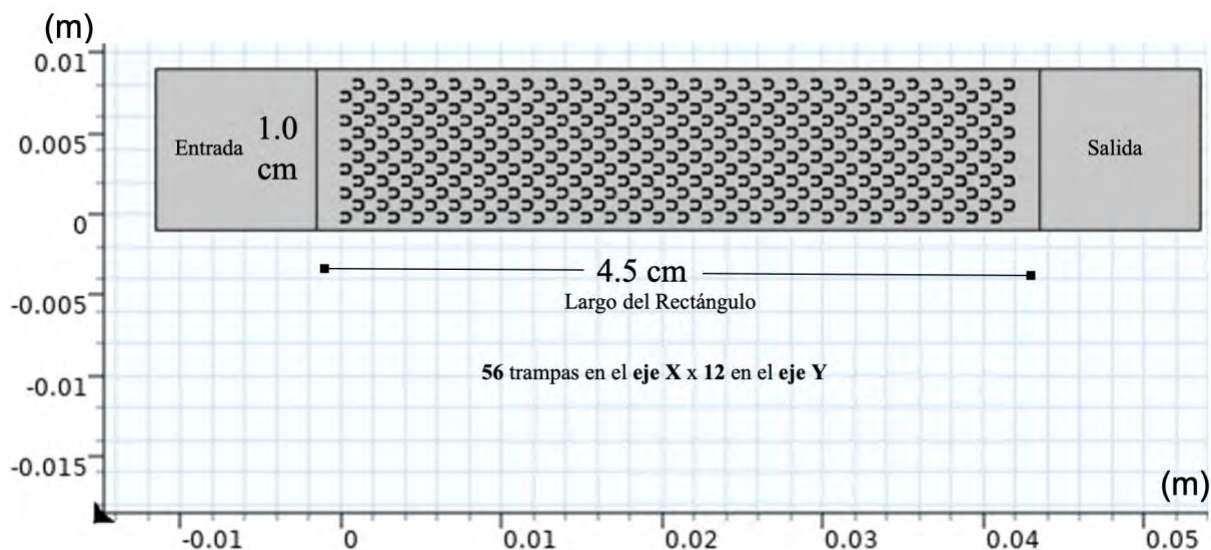


Figura 5. Ploteo de la geometría del hígado en un chip, la altura en el eje Z es de 500 μm . La cantidad total de lobulillos hepáticos es de 672.

3.2.4 Tejido cardiaco en un Chip

La geometría de este dispositivo está basada en la investigación de Ghiaseddin et al. (2017).

Los valores de los parámetros de la geometría del dispositivo se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Parámetros de la geometría para cultivo de cardiomiocitos en un chip.

Variable	Unidad	Descripción de la Variable
$re1$	1 cm	Radio externo del primer círculo
$ri1$	0.8 cm	Radio interno del primer círculo
$re2$	0.5 cm	Radio externo del segundo círculo
$ri2$	0.4 cm	Radio interno del segundo círculo

$re3$	0.25 cm	Radio externo del tercer círculo
$rei3$	0.2 cm	Radio interno del tercer círculo
$re4$	0.125 cm	Radio externo del cuarto círculo
$ri4$	0.105 cm	Radio interno del cuarto círculo
wp	0.02 cm	Ancho del rectángulo pequeño
hp	0.5 cm	Largo del rectángulo pequeño
rcp	0.06 cm	Radio de las esferas pequeñas
w	1.7 cm	Ancho del rectángulo colector
hc	0.09 cm	Alto del rectángulo colector

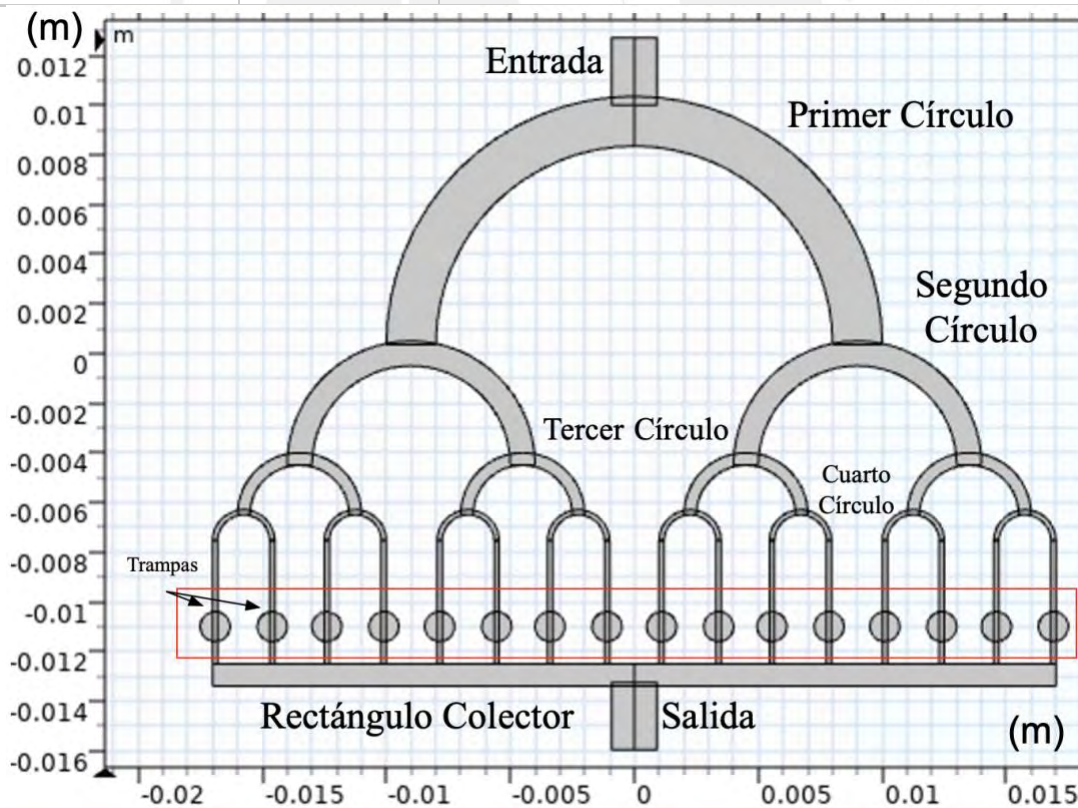


Figura 6. Geometría para tejido miocárdico en un chip. Las unidades del eje X e Y están en, la altura en el eje Z es de 500 μm .

A diferencia del diseño de Ghiaseddin et al. (2017), en este modelo todas las circunferencias donde se cultivarán cardiomiocitos están a un mismo nivel, esto se decidió basado en los valores de presión obtenidos en las simulaciones, mientras más alejados de la entrada están las circunferencias, más pequeños son los valores de presión.

3.2.5 Human-Body-on-a-Chip

Este diseño es la unión de los tres diseños anteriores, más el añadido de un micromezclador, con modificaciones realizadas en aras de construirlos con una impresora 3D Stratasys Objet500 Connex3, Stratasys (2022, 7 de noviembre), debido a que posee la mayor resolución en la PUCP, esta se encuentra específicamente en la Sala VEO PUCP. Según sus especificaciones técnicas, presenta una precisión de 20-85 μm para elementos inferiores a 50 mm ; hasta 200 μm para tamaño de modelo completo, solo para materiales rígidos. Por ende, pensando en la reducción de costos, debido al material a utilizar y tiempo de producción, además que este es un primer prototipo, se decidió que ninguna de las estructuras en los chips mediría menos de 200 μm , sea una pared o el espacio entre paredes. Además, se estandarizó la base rectangular de cada uno de los chips con una longitud en el eje X de 3.6 cm y en el eje Y de 3 cm , con la idea de poder posicionar los chips uno encima de otro y así reducir el área que ocuparían en las incubadores de los laboratorios. El grosor de cada chip es de 1.5 mm , 1 mm de la base rectangular y 500 μm de la altura de los canales de cada chip, esto se decidió así porque es el diámetro de los esferoides que se introducirán en estos. En este sentido, cuando todo esté unido, tendría un volumen de 3.6x3xZ cm , donde Z representa la altura del dispositivo. Este valor de Z variará dependiendo de la configuración de las mangueras que interconecten los órganos. A continuación, se mostrará la metodología de diseño y el diseño de cada chip. La resina que se utilizará será la *VeroClearTM*, VeroClear (2022, 7 de noviembre), debido a que es un material transparente que simula el PMMA

(polimetilmetacrilato). Al igual que el PMMA, VeroClear se utiliza como una alternativa al cristal y es adecuado para el modelado de conceptos y la verificación del diseño de piezas transparentes, propiedad que comparte con el PDMS. Presenta una fuerza de tensión de 50-65 MPa y una resistencia a la flexión de 75-110 MPa. El soporte que se utilizará será el que tiene como código SUP706, SUP706 (2022, 7 de noviembre), porque el proceso de eliminación de soporte permite limpiar las cavidades internas y las características delicadas que el chorro de agua, que usualmente se utiliza para esta tarea, podría perder o dañar, puesto que existen secciones en el orden de los micrómetros. En la siguiente figura, se muestra el diagrama de flujo que se desarrolla en esta sección.

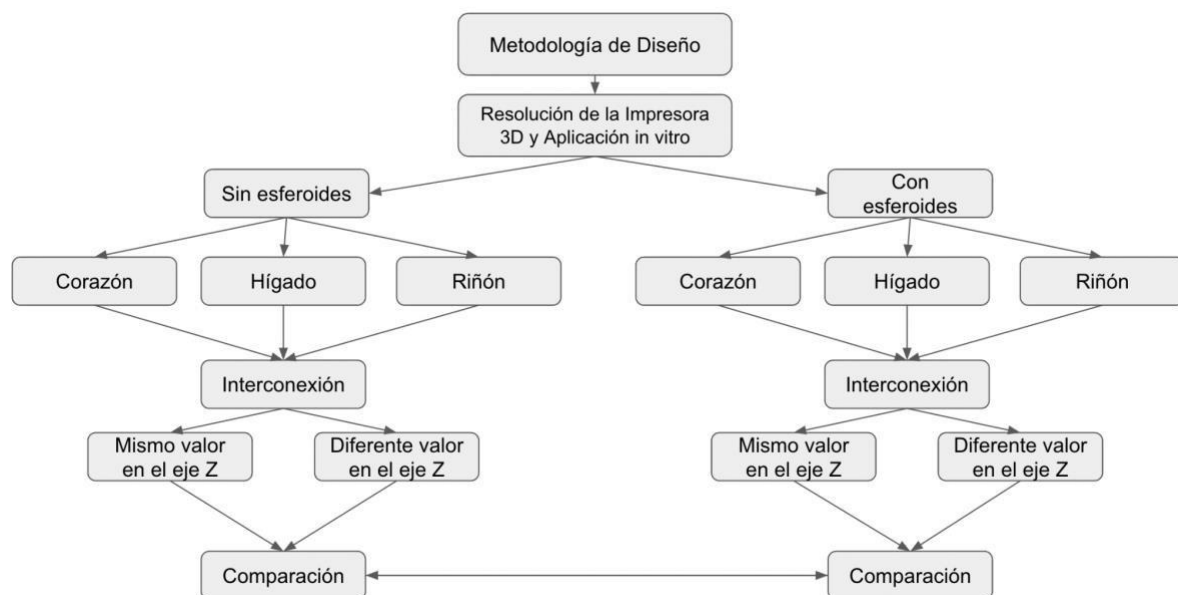


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología de diseño del Human-Body-on-a-Chip.

Como se observa en la Figura 7, lo primero que se consideró para el diseño de los chips fue la resolución de la impresora, en este caso $200 \mu\text{m}$, y la aplicación in vitro, que, en este caso, se utilizarían esferoides con diámetros de $500 \mu\text{m}$, valor que se utilizó para la altura de los canales internos de los chips. Luego, se diseña el mezclador, partiendo con los lineamientos base de $3.6 \times 3 \text{ cm}$. Seguidamente se modifican cada uno de los chips para que entren simétricamente en la base, no obstante, existen dos modificaciones no triviales: chips con y sin esferoides, con la finalidad de observar las líneas de flujo en cada uno de los espacios

donde se encuentran estas. Es importante comentar que los esferoides es uno de los constructos celulares más utilizados en los modelos *in-vitro*; por ello es que en este trabajo se representan con esferas en los lugares de siembra celular de los chips, con la finalidad de observar cómo es que se comportan los vectores de velocidad y si estos tienden a formar vórtices; debido a que los vórtices pueden dañar las células de la superficie del esferoide, el segundo fenómeno importante que se desea observar es si debido a la presencia de los esferoides, los valores de presión en las zonas de cultivo celular aumentan. Después, se interconectan los chips en dos configuraciones, la primera, hacerlo en un mismo valor del eje Z, paralelamente, interconectar en diferentes niveles de valor de Z, con el fin de observar si el efecto de la gravedad presenta un impacto significativo en el campo de velocidades y presiones, esto tanto para los chips con esferoides como para los que no los poseen. Finalmente, se comparan los resultados de las cuatro variantes para observar cambios en los valores de presión y velocidad.

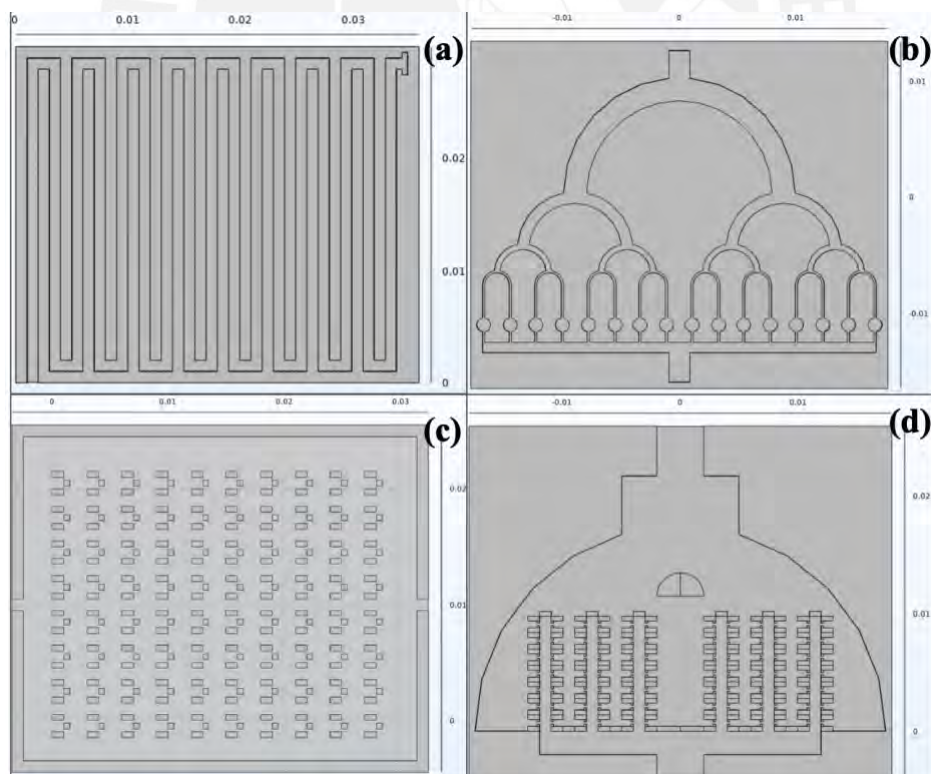


Figura 8. Ploteo de los chips que componen el Human Body on a Chip y que se utilizaron para construirlos con manufactura aditiva. Todos los chips se encuentran sin esferas en las trampas, las cuales simulan los esferoides. (a) mezclador, (b) chip para tejido cardíaco, (c) chip para tejido hepático, (d) chip para tejido renal. Las unidades del eje X e Y están en metros,

la altura en el eje Z es de $1500 \mu\text{m}$, $1000 \mu\text{m}$ de la base y $500 \mu\text{m}$ de la altura de los canales. La base rectangular mide $3.6 \times 3 \text{ cm}$.

3.2.5.1 Interconexión de los chips

Siguiendo con el diagrama de flujo, a continuación, se muestran las dos configuraciones en las que se unen los chips, tanto para aquellos que no presentan esferoides, como para los que sí los poseen.

Sin esferoides

A continuación, se presentan las dos configuraciones en las que se interconectan los chips sin esferoides.

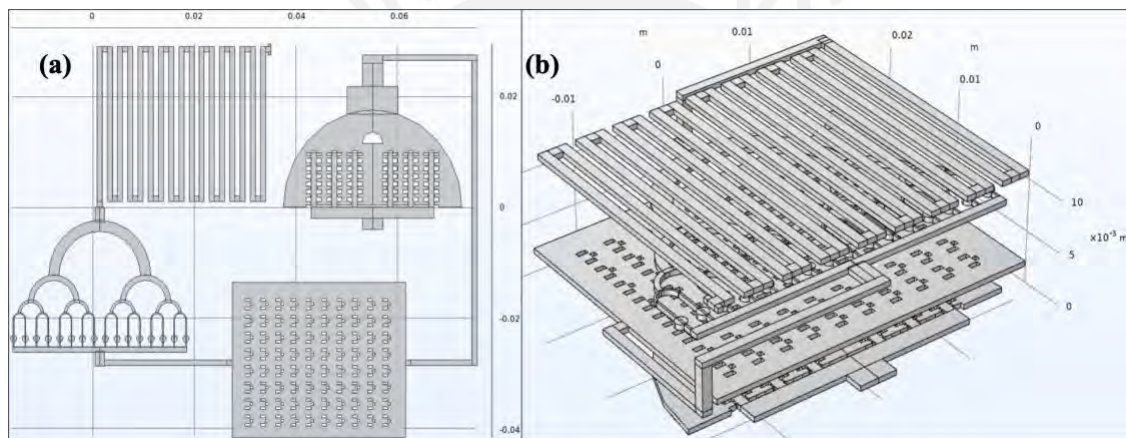


Figura 9. Las dos formas de conexión de los chips que componen el Human Body on a Chip sin esferoides. (a) conexión de los chips en un mismo valor del eje Z, $500 \mu\text{m}$. (b) conexión de los chips en diferentes valores del eje Z. Como se puede observar en la superficie de ambas imágenes, estas son totalmente lisas, evidenciando la inexistencia de los esferoides. Las unidades del eje X e Y están en metros en ambas imágenes.

Con esferoides

A continuación, se presentan las dos configuraciones en las que se interconectan los chips con esferoides.

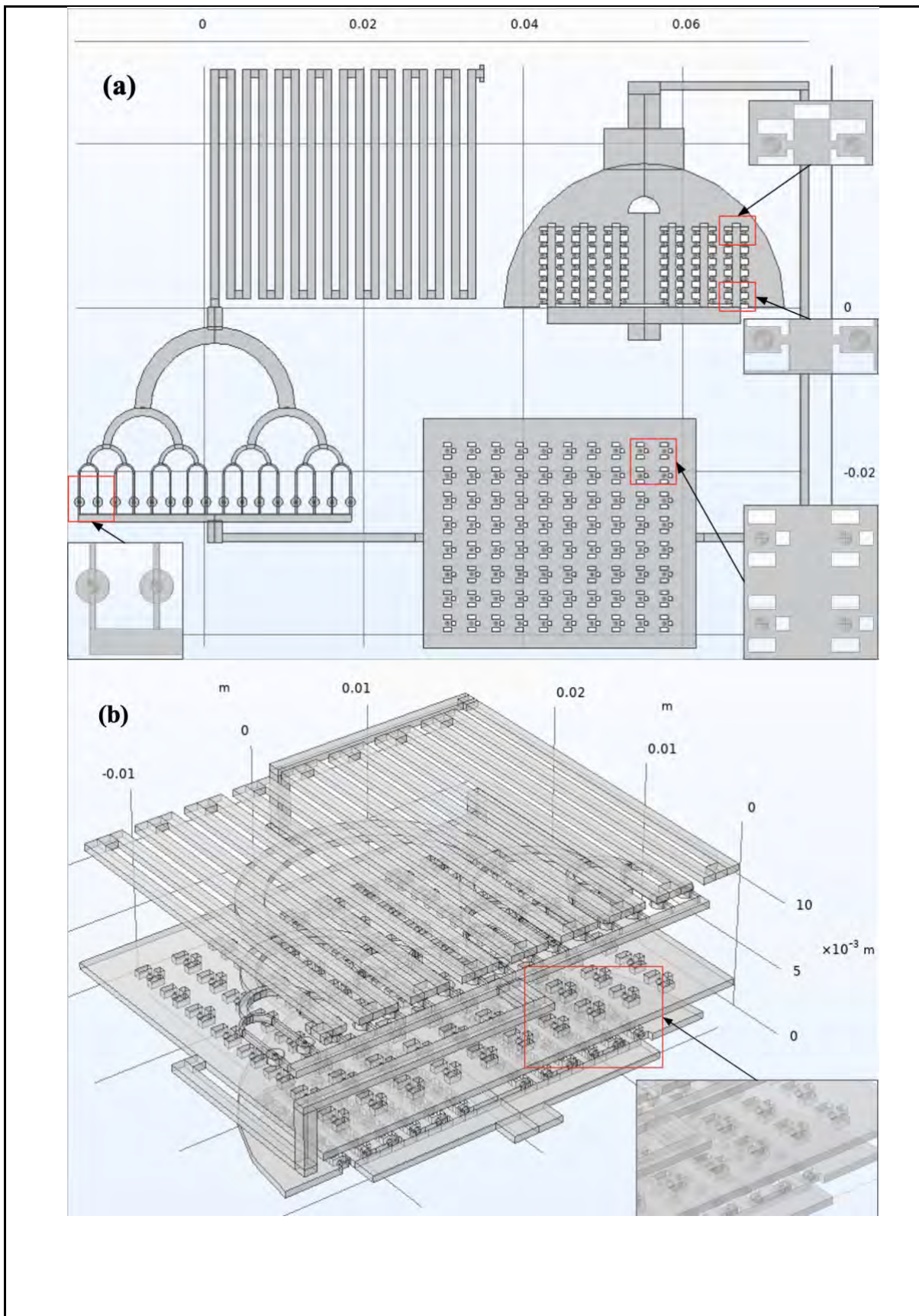


Figura 10. Las dos formas de conexión de los chips que componen el Human Body on a Chip con esferoides. (a) conexión de los chips en un mismo valor del eje Z, $500 \mu\text{m}$. (b) conexión de los chips en diferentes valores del eje Z, la separación es de 4.5 mm . Como se observa en

ambas imágenes, estas presentan pequeños círculos en los lugares de las trampas, estos desde una vista sobre el plano XY. Los círculos son los esferoides en un plano dos dimensional. Las unidades del eje X e Y están en metros en ambas imágenes.



Capítulo 4: Resultados

En esta sección se presentan, primero, los resultados de los campos de velocidades y presiones de los diferentes modelos de microbioreactores para cultivar tejido renal, hepático, cardíaco y el human-body-on-a-chip. Luego, se presentarán los resultados del mezclado entre el Sirolimus y la sangre. Todos los parámetros necesarios para obtener estos resultados fueron detallados en la sección de metodología. Seguidamente, un análisis de los vórtices en los lugares de siembra celular. Finalmente, se detalla el procedimiento para la impresión de los chips y se muestran fotografías microscópicas de los canales.

4.1 Caracterización del flujo ideal: campo de velocidades y presiones

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos del campo de velocidades y presiones de las diferentes geometrías que se describieron anteriormente, en la sección de metodología.

4.1.1 Tejido renal en un Chip

Este fue el primer tipo de microbioreactor que se diseñó, enfocado en tejido renal, con el fin de mezclar el Sirolimus con la sangre. Por ende, en cada una de las 5 versiones se observa cómo interactúan estas dos soluciones. El Sirolimus ingresa por la entrada izquierda y la sangre por la derecha. En este sentido, para obtener un mezclado al 100% entre ambas soluciones, se buscó que estas realicen esta tarea en el cuerpo del microbioreactor, el rectángulo mayor, para que, al distribuirse hacia las alas, donde se encontrarán las células, estas puedan recibir en concentraciones iguales ambas sustancias. A continuación, se presentarán los resultados del campo de velocidades y presiones de las diferentes versiones de los microbioreactores para cultivar tejido renal en un chip. Efectivamente, el valor de velocidad que se tomó para simular los valores de la investigación de Sateesh (2018) genera valores de presión demasiado grandes con respecto a los valores de cizallamiento límites de

células madre, además, a pesar de que se realizaron cinco versiones, en ninguna de estas se logra mezclar la sangre con el Sirolimus por completo. Entonces, en base a estos resultados, se decidió dos acciones, la primera es que el mezclado de las sustancias se debe realizar en una sección diferente y fuera del microbio reactor. La segunda acción, es que, si se desea construir este microbio reactor, las dimensiones de este, tanto para construirlo como para colocar las células renales dentro de él deben ser mayores, debido a que las dimensiones actuales imposibilitarían su producción. Por ende, en base a estas dos afirmaciones, se realizará un diseño diferente que no estará basado en el trabajo de Sateesh (2018), sino que estará basado en la anatomo-fisiología renal. Asimismo, se deben alcanzar los valores de velocidad y presión que se estipula en la literatura recolectada.

Resultados de la versión 1 a la 5 del campo de velocidades y presiones

A continuación, se presentarán los resultados del campo de velocidades y presiones de las cinco versiones del riñón en un chip, para 1 segundo de simulación.

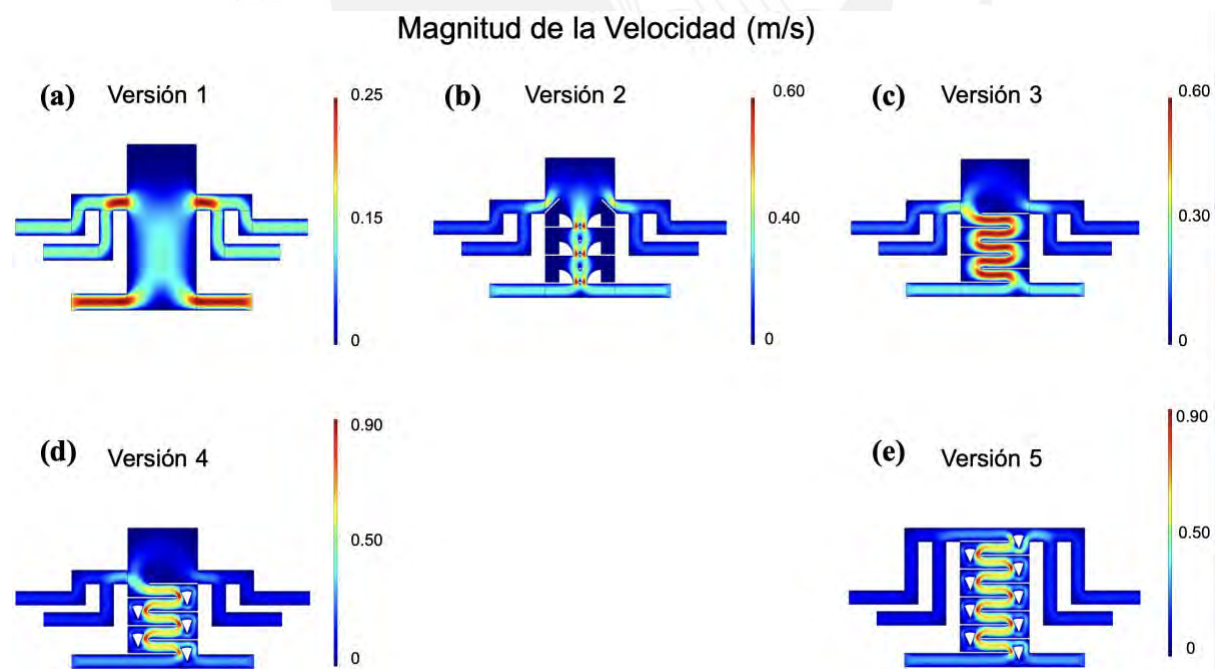


Figura 11. Campo de velocidades de las cinco versiones iniciales del chip para tejido renal. La unidad de la barra de color está en m/s. (a) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 1. (b) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 2. (c) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 3. (d) Campo de velocidades del riñón en un chip versión 4. (e)

Campo de velocidades del riñón en un chip versión 5. Los fluidos ingresan por las dos entradas inferiores de las imágenes y salen por las cuatro vías superiores.

En la Figura 11, en (a) observamos el campo de velocidades del riñón en un chip Versión 1, la velocidad no aumenta demasiado, con respecto a la velocidad inicial, esto principalmente porque no se encuentra con una reducción en las líneas de flujo. Los valores de velocidad máximo son de 0.25 m/s y en las alas, lugar de cultivo celular, de 0.15 m/s . (b) Campo de velocidades del riñón en un chip Versión 2, efectivamente la reducción del camino de las líneas de flujo generó un aumento en los valores de velocidad, esto se ve reflejado en las zonas rojas de la figura; no obstante los obstáculos creados con la intención de que se mezclaran las sustancias presentan valores de velocidad bajos, lo que refleja que la idea inicial no tuvo éxito, los fluidos no fluyeron por ahí; por ende, no se generó mezclado. La idea *a priori* resultó errónea, los valores de velocidad máximos son 0.6 m/s y los valores en las alas son de 0.1 m/s . (c) Campo de velocidades del riñón en un chip Versión 3, si bien los valores de velocidad no aumentaron con relación a la Versión 2, los resultados de mezclado no presentaron una mejoría considerable; por ende, se necesitaron mayores cambios. Los valores de velocidad máxima se originan en la sección de serpentina con valores de 0.6 m/s , en las salidas de las alas la velocidad es de 0.1 m/s . (d) Campo de velocidades del riñón en un chip Versión 4, al agregar los obstáculos al camino de serpentina, se redujo el tamaño de las líneas de flujo, lo que en base a la ecuación de Bernoulli y del Caudal, esta reducción en el área por donde pasa el fluido genera un aumento de velocidad. Los valores máximos de velocidad son de 0.9 m/s y se originan en el canal de serpentina. Los valores mínimos se producen en la salida de las alas y son de 0.1 m/s . (e) Campo de velocidades del riñón en un chip Versión 5. Curiosamente, aunque se aumentó considerablemente la longitud del canal de serpentina así como la cantidad de obstáculos, los valores de velocidad máximo son de 0.9 m/s , iguales a los de la versión anterior, no es de extrañar que estos se desarrollen en el canal de serpentina. Los valores mínimos de velocidad son de 0.1 m/s y se dan en las salidas de las alas del biorreactor.

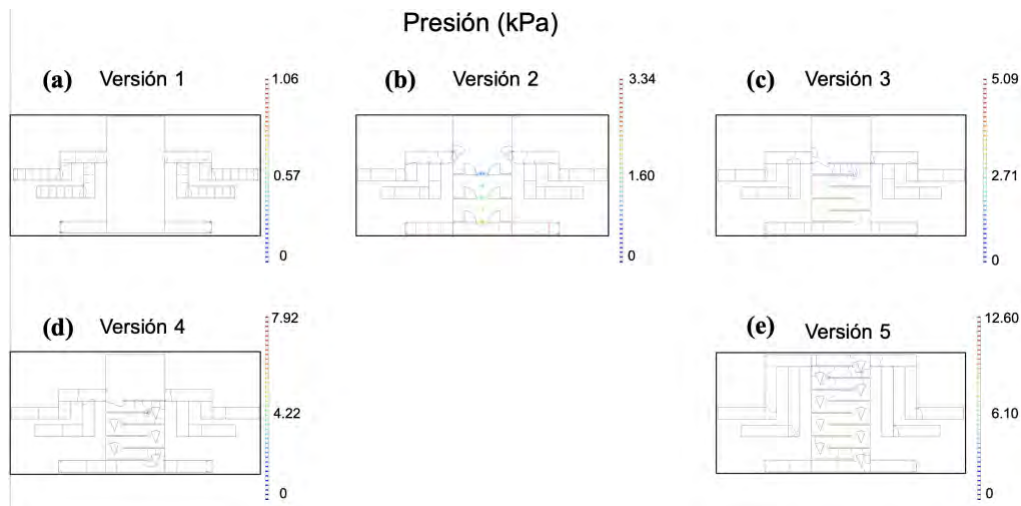


Figura 12. Campo de presiones de las cinco versiones iniciales del chip para tejido renal. La unidad de la barra de color es kPa. (a) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 1. (b) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 2. (c) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 3. (d) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 4. (e) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 5. Los fluidos ingresan por las dos entradas inferiores de las imágenes y salen por las cuatro vías superiores.

En la Figura 12, en (a) observamos el campo de presiones del riñón en un chip Versión 1, los mayores valores de presión en el biorreactor son de 1.06 kPa, lo que es demasiado para el cultivo renal. No obstante, estos valores solo se encuentran en las entradas de los fluidos, y se ven reducidos enormemente en las salidas de las alas, no obstante, todavía se pueden considerar dañinos para el cultivo renal, afirmación basada en los datos recolectados de la literatura. Resulta evidente que la elección del valor de velocidad inicial generó este efecto negativo en los resultados. (b) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 2, efectivamente el aumento en los valores de velocidad de la figura anterior también influyó en el aumento de los valores de presiones del microbioreactor. Los valores de presión máximos se originan en las entradas con valores de 3.34 kPa y en las salidas de las alas de 0.04 kPa. (c) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 3, en este caso. Los valores de presión máxima son de 5.00 kPa y se originan en las entradas, los valores mínimos son de 0.07 kPa y se originan en las salidas. (d) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 4, como era de esperarse, basado en la Ecuación de Continuidad, el valor de presión aumentó debido a que el ancho del paso por donde fluyen los fluidos disminuye. Los valores de presión máximos se originan en las entradas y son

de 7.92 kPa de magnitud, en la salida de las alas encontramos valores de 0.1 kPa. (e) Campo de presiones del riñón en un chip Versión 5, aunque los valores de velocidad no aumentaron de la Versión 4 a esta, los valores de presión sí lo hicieron. Podemos observar valores de presión de 12.60 kPa en las entradas del biorreactor y valores mínimos de 0.2 kPa en la salida de las alas del microbioreactor, estos valores son muy elevados para el cultivo celular.

Versión Final

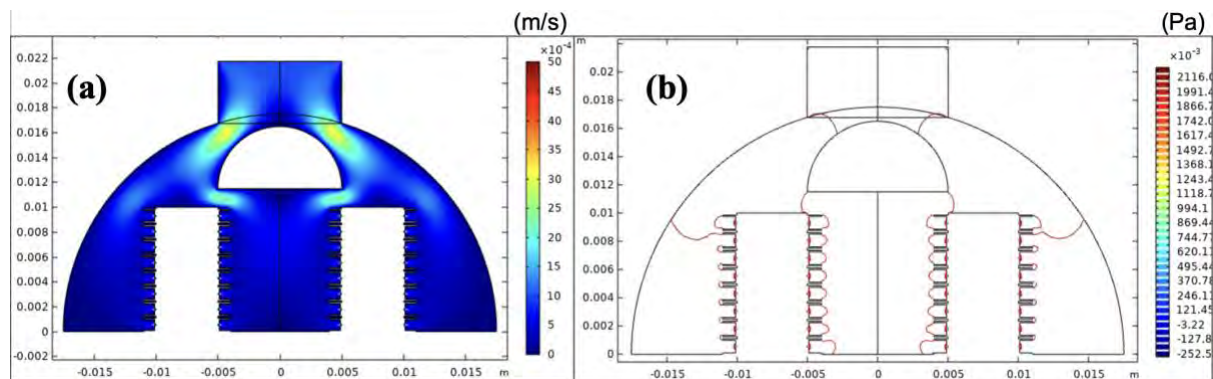


Figura 13. Campo de velocidades del riñón en un chip en 2D y en 3D. Las unidades de la barra de colores están en 10^{-4} m/s. La velocidad en la entrada es 10×10^{-4} m/s. (a) el campo de velocidades del riñón en un chip en 2D, el fluido ingresa por la parte superior de la figura y sale por la salida de las trampas. Observamos valores máximos de 50×10^{-4} m/s en las salidas, debido a la reducción del área. (b) Campo de presiones del riñón en un chip en 3D, existen valores de 2.178 Pa en las salidas del biorreactor.

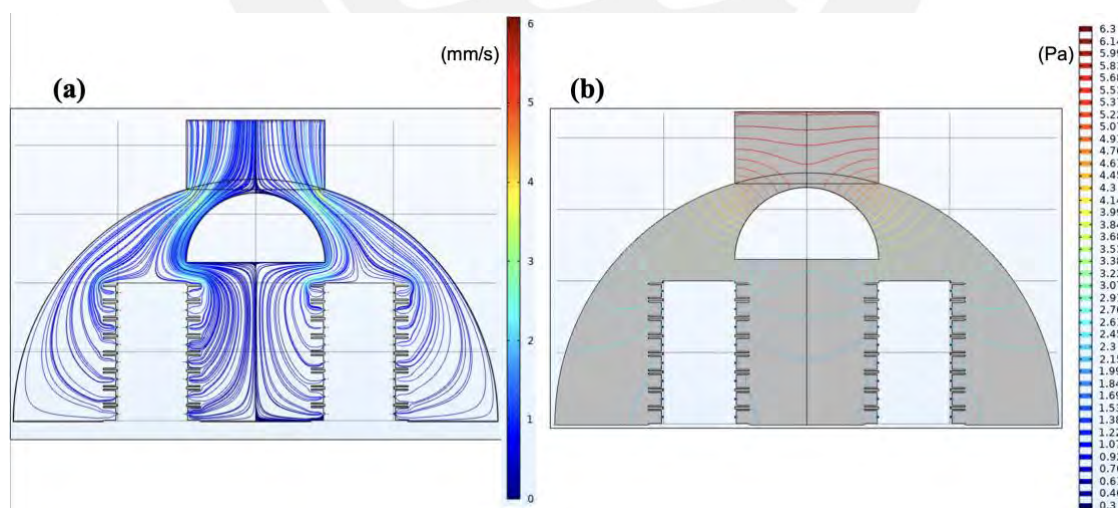


Figura 14. Campo de velocidades, (a), y presión, (b), de la versión final del riñón en un chip en 3D. (a) El campo de velocidades del riñón en un chip en 3D. La velocidad en la entrada es 10×10^{-4} m/s. El fluido ingresa por la parte superior de la figura y sale por la salida de las trampas. Observamos valores máximos de 60×10^{-4} m/s en las salidas. (b) Campo de presiones del riñón en un chip en 3D, existen valores de 6.3 Pa en las salidas del biorreactor. La barra de color en (a) está en 10^{-3} m/s, en el caso de (b) en Pa.

4.1.2 Tejido hepático en un Chip

A continuación, se presentarán los resultados del campo de velocidades y presiones del microbioreactor para cultivar tejido hepático en un chip.

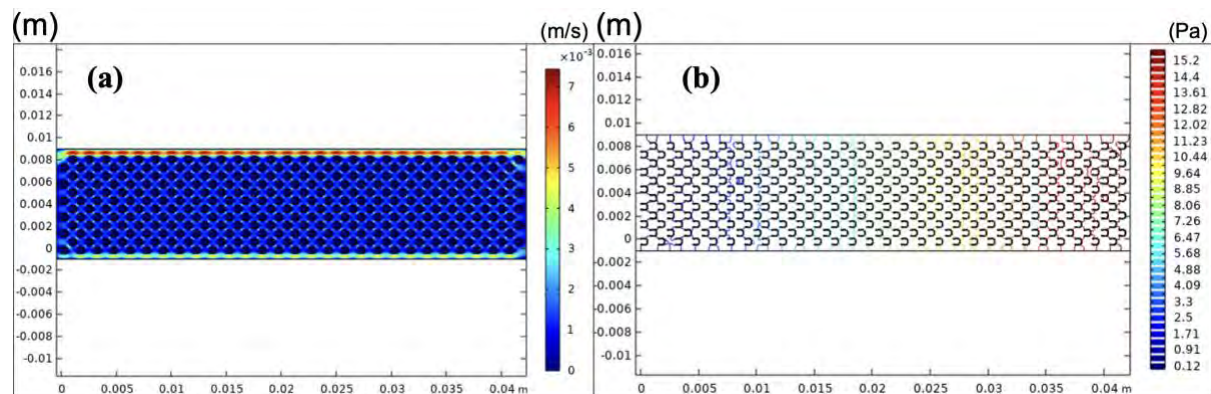


Figura 15. Campo de velocidades, (a), y presiones, (b), del hígado en un chip en 2D. La barra de color en (a) está en 10^{-3} m/s, en el caso de (b) en Pa. En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte izquierda de esta y sale por la derecha.

En la Figura 15, en (a) observamos el campo de velocidades del hígado en un chip en 2D. Podemos observar que existe una diferencia notable entre los valores de velocidad de la parte superior y la inferior del microbioreactor, esto se debe a que el área de la sección superior es ligeramente menor al de la inferior. Observamos valores máximos de 7×10^{-3} m/s en la parte superior y de 4×10^{-3} m/s en la parte inferior del microbioreactor; además, la velocidad en los exteriores de los primeros lobulillos hepáticos que entran en contacto con el fluido, son mayores a los de los lobulillos hepáticos cercano a la salida. Asimismo, la velocidad disminuye considerablemente dentro de los lobulillos hepáticos. (b) Campo de presiones del hígado en un chip en 2D, podemos observar una disminución en los valores de presión en el microbioreactor conforme el fluido avanza de la entrada hacia la salida. Si bien la velocidad dentro de los lobulillos hepáticos es considerablemente menor que en los extremos del microbioreactor, en el caso del campo de presiones, esta magnitud disminuye en una tendencia cuasi-lineal conforme el fluido avanza. Así, podemos observar que existen valores de 15.6 Pa en los primeros lobulillos hepáticos y que este valor se reduce hasta 1.25 Pa en los lobulillos de la salida.

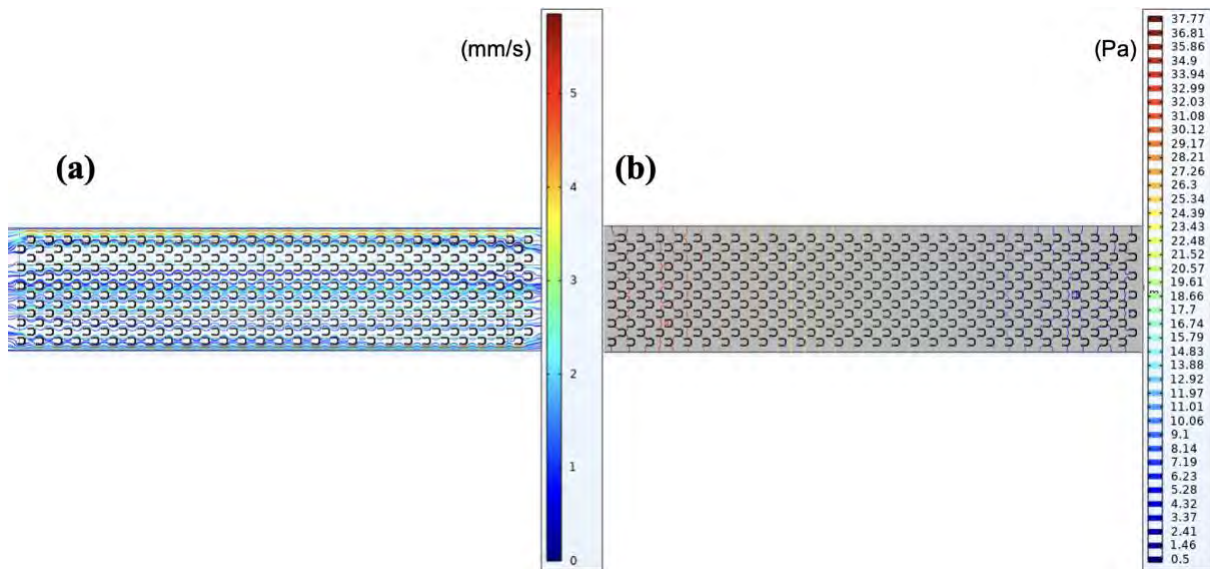


Figura 16. Campo de velocidades y presiones del hígado en un chip en 3D. La barra de color en (a) está en $\times 10^{-3}$ m/s, en el caso de (b) en Pa. En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte izquierda y sale por la derecha. Ambas figuras se muestran desde una vista del plano XY.

En la Figura 16, en (a) observamos el campo de velocidades del hígado en un chip en 3D. Podemos observar que existe una diferencia notable entre los valores de velocidad de la parte superior y la inferior del microbio reactor, esto se debe a que el área de la sección superior es ligeramente menor al de la inferior. Observamos valores máximos de 5×10^{-3} m/s en la parte superior y de 3×10^{-3} m/s en la parte inferior del microbio reactor; además, la velocidad en los exteriores de los primeros lobulillos hepáticos que entran en contacto con el fluido, son mayores a los de los lobulillos hepáticos de las salidas. Asimismo, la velocidad disminuye considerablemente dentro de los lobulillos hepáticos. (b) Campo de presiones del hígado en un chip en 3D, podemos observar una disminución en los valores de presión en el biorreactor conforme el fluido avance de la entrada hacia la salida. Si bien la velocidad dentro de los lobulillos hepáticos es considerablemente menor que en los extremos del microbio reactor, en el caso del campo de presiones, esta magnitud disminuye en una tendencia cuasi-lineal conforme el fluido avanza. Así, podemos observar que existen valores de 37.7 Pa en los primeros lobulillos hepáticos y que este valor se reduce hasta 3.37 Pa en los lobulillos de la salida.

4.1.3 Tejido cardiaco en un Chip

A continuación, se presentarán los resultados del campo de velocidades y presiones para el microbioreactor para tejido miocárdico en un chip.

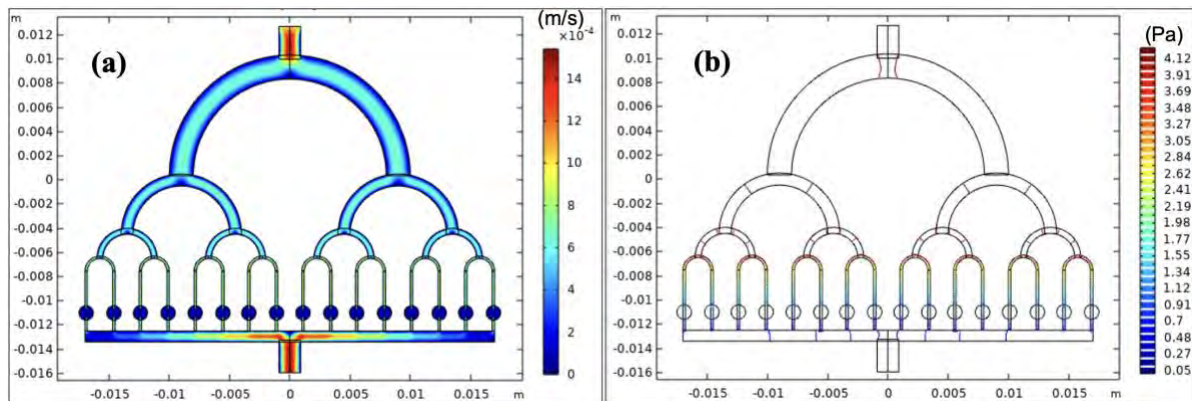


Figura 17. Campo de velocidades y presiones del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip en 2D. La barra de color en (a) está en $10^{-4} m/s$, en el caso de (b) en Pa . En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte superior y sale por la inferior. El valor de velocidad inicial es de $10 \times 10^{-4} m/s$.

En la Figura 17, en (a) observamos el campo de velocidades del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip en 2D. Los valores de velocidad mayores se originan tanto en la entrada como en la salida del microbioreactor, y estos son de $14 \times 10^{-4} m/s$. Asimismo, y esto resulta importante, los valores de velocidad en las circunferencias, donde se cultivarán las células, son menores a $2 \times 10^{-4} m/s$, disminución útil para el cultivo celular, puesto que las células cardíacas no pueden estar expuestas a valores de flujos elevados. (b) Campo de presiones del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip. Los valores de presión máximos se originan en la entrada con valores de $4.23 Pa$. En las circunferencias que es donde se cultivarán los cardiomiocitos, estos valores son de $1.02 Pa$.

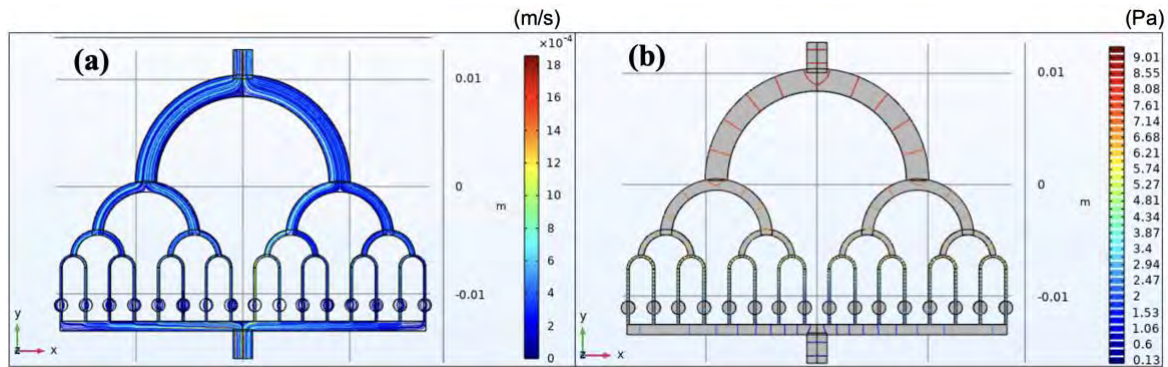


Figura 18. Campo de velocidades y presiones del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip en 3D. La barra de color en (a) está en $10^{-4} m/s$, en el caso de (b) en Pa. En ambas imágenes, el fluido ingresa por la parte superior y sale por la inferior. El valor de velocidad inicial es de $10 \times 10^{-4} m/s$.

En la Figura 18, en (a) observamos el campo de velocidades del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip en 3D. Los valores de velocidad mayores se originan tanto en la entrada como en la salida del microbioreactor, y estos son de $18 \times 10^{-4} m/s$. Asimismo, y esto resulta importante, los valores de velocidad en las circunferencias son menores a $2 \times 10^{-4} m/s$, disminución útil para el cultivo celular, puesto que las células cardíacas no pueden estar expuestas a valores de flujos elevados. (b) Campo de presiones del microbioreactor para tejido miocárdico en un chip. Los valores de presión máximos se originan en la entrada con valores de $9.25 Pa$. En las circunferencias que es donde se cultivarán los cardiomiocitos, estos valores son mayores a $2.96 Pa$. En este sentido, existen diferencias entre los valores de presión entre la geometría 2D y 3D. Para el caso de la geometría 3D que es la que finalmente se construirá, el valor de presión en las zonas de cultivo celular, las circunferencias, supera el valor establecido de $2.6 Pa$.

4.1.4 Human-Body-on-a-Chip

En este apartado se presentan los resultados de los campos de velocidades y presiones de las diferentes configuraciones que se enseñaron en el apartado de metodología. Para comenzar, primero se analizó por separado el comportamiento fluido de cada uno de los chips que componen el dispositivo. Como se menciona en el capítulo anterior, ninguna de las secciones

en los chips debían medir menos de $200 \mu\text{m}$; por ello, se hicieron las modificaciones pertinentes tanto para el chip de tejido hepático, como renal, el chip para tejido cardíaco es el mismo.

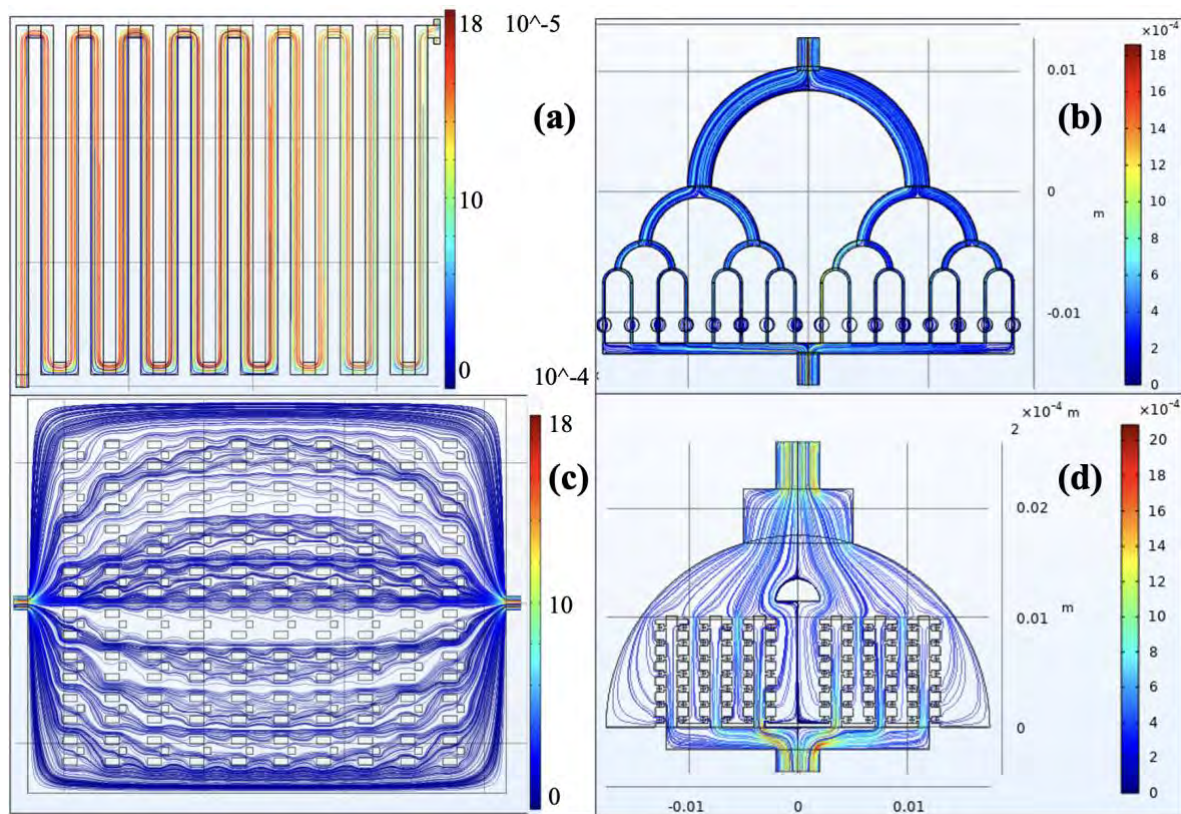


Figura 19. Campo de velocidades de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip sin interconexión entre ellos en 3D. En (a) la barra de color presenta unidades de 10^{-5} m/s , en los tres chips restantes, 10^{-4} m/s .

En la Figura 19, en (a) observamos el campo de velocidades del mezclador, este es el único cuyo valor de velocidad inicial fue de 0.0001 m/s en las entradas, las cuales son dos y se encuentran ubicadas en la estructura con forma de T en la parte superior derecha de la imagen, este valor inicial se tomó en vista de los valores de presión que se generaban en el dispositivo. Observamos picos de $18 \times 10^{-5} \text{ m/s}$, en casi todo el recorrido de la solución en el dispositivo. Por otro lado, en los otros tres chips se utilizó un valor de velocidad inicial de 0.001 m/s . (b) En el chip para tejido cardíaco observamos valores de velocidad en los lugares de siembra celular entre 2 y $4 \times 10^{-4} \text{ m/s}$.

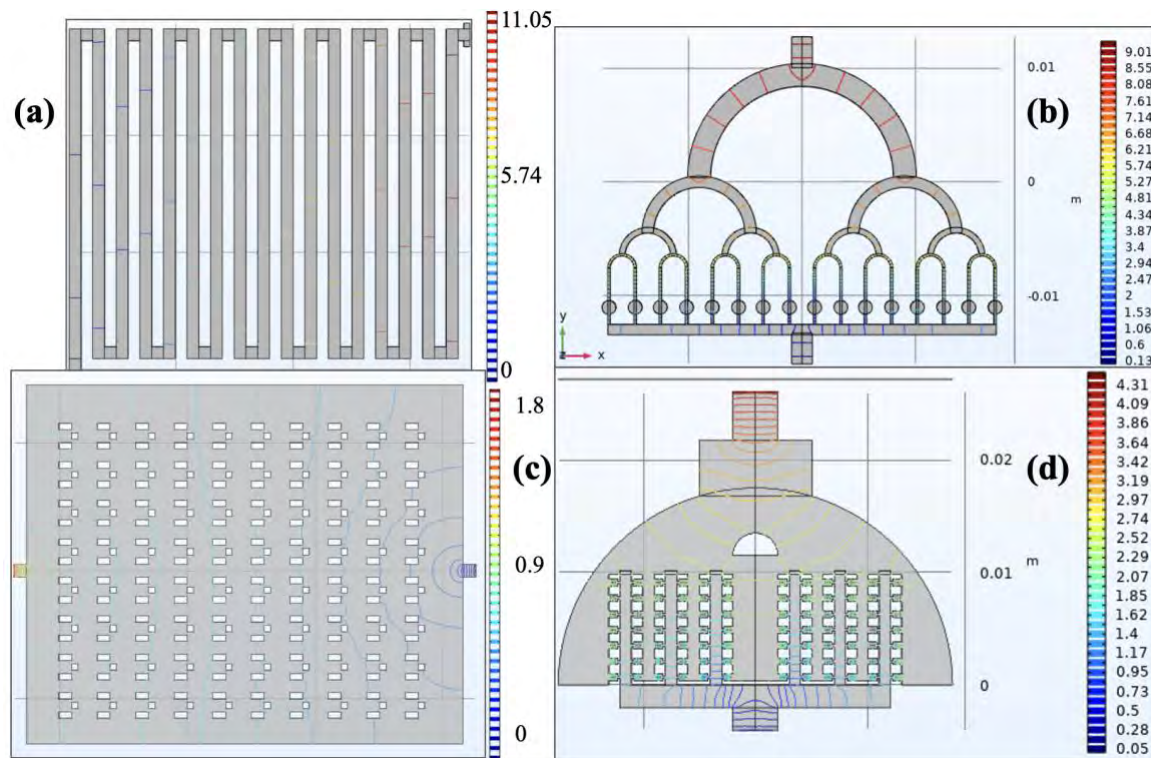


Figura 20. Campo de presiones de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip sin interconexión entre ellos en 3D. La barra de color en todos los chips posee unidades de Pa.

En la Figura 20, en (a) observamos valores de presión máximos de 11.05 Pa en el comienzo del tramo serpenteante del mezclador; sin embargo, estos valores van disminuyendo conforme el líquido avanza en forma de gradiente, hasta llegar a valores de 0.14 Pa . (b) Observamos valores de presión menores a 3.17 Pa en la zona de siembra celular. (c) Observamos una gradiente de presión que va desde 1.8 Pa en la entrada y disminuye conforme el líquido avanza hasta llegar a valores menores a 0.35 Pa . De los tres chips, este es el que presenta menores valores de presión, y, por ende, de cizallamiento, lo cual resulta óptimo para el desarrollo celular. (d) Similarmente a lo observado en el chip de hígado, en el de riñón, observamos una gradiente de presión conforme el líquido avanza, con valores que van desde 2.28 Pa , como valores más altos, al inicio de las cadenas de trampas, hasta valores de 1.27 Pa al final de estas.

4.1.4.1 Interconexión de los chips

A continuación, se enseñan los resultados de los valores de los campos de velocidad y presión de la conexión de los cuatro chips, para la configuración a un mismo nivel en el eje Z y para los que se

encuentran uno encima del otro, con respecto al eje Z, primero para los chips que no presentan esferoides y luego para los que sí los poseen.

Sin esferoides

En esta sección, observamos los campos de velocidades y presiones para las dos configuraciones. Para ambos casos la velocidad inicial en las entradas del mezclador es de 0.001 m/s .

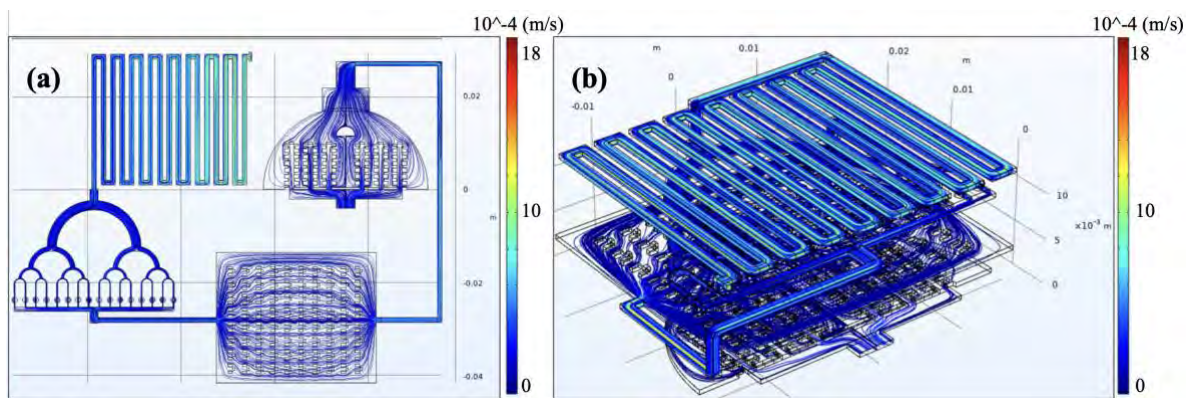


Figura 21. Campo de velocidades de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip interconectados entre ellos en 3D sin esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en 10^{-4} m/s .

En la Figura 21, en (a) observamos que a diferencia de lo que observamos en la simulación en la que se encuentra solo el mezclador, Figura 19, aquí, la velocidad disminuye su valor en forma de gradiente. En las 4 primeras curvas del serpenteado, observamos una velocidad promedio de $8 \times 10^{-4} \text{ m/s}$, valor que va disminuyendo hasta $4 \times 10^{-4} \text{ m/s}$, a la salida del mezclador. En general, podemos observar que los valores de velocidad dentro de los chips oscilan entre 2 y $4 \times 10^{-4} \text{ m/s}$. Curiosamente, y aunque no es tan notorio, en las secciones que unen los chips, la velocidad del flujo se incrementa, este fenómeno se puede observar en la unión entre el chip para tejido hepático y el chip para tejido renal. (b) En esta segunda configuración encontramos diferencias interesantes y también similitudes. Observamos una similitud con respecto a los valores máximos de velocidad, debido a que en ambas configuraciones el valor es de $18 \times 10^{-4} \text{ m/s}$, el cual se origina en las entradas. En el caso de

los resultados del mezclador, observamos resultados similaridades con la simulación del mezclador en solitario, debido a que existe una velocidad sostenida a través de todo el recorrido de entre 8 a $10 \times 10^{-4} \text{ m/s}$. También es notorio que la velocidad en las secciones de conexión entre los chips aumenta, sobre todo luego de que se pasa de un nivel a otro, esto posiblemente sea efecto de la gravedad. Finalmente, los valores de velocidad dentro de los chips, al igual que (a), oscilan entre 2 y $4 \times 10^{-4} \text{ m/s}$.

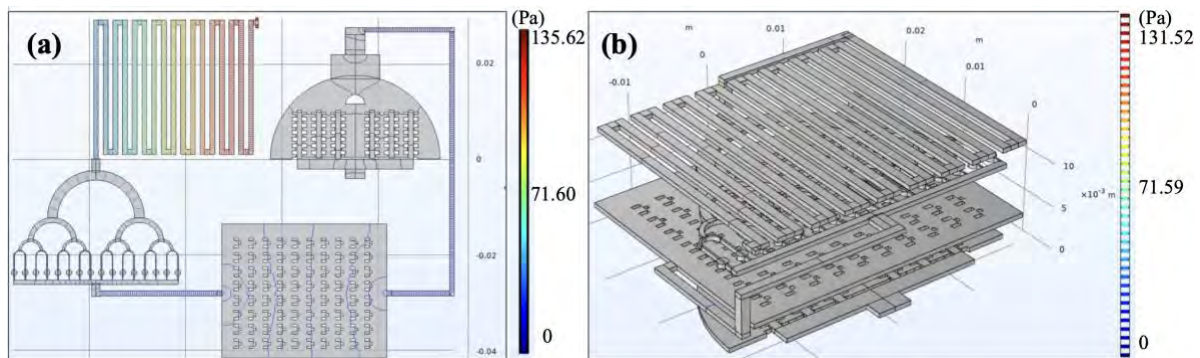


Figura 22. Campo de presiones de los cuatro chips que componen el Human Body on a Chip interconectados entre ellos en 3D sin esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en Pa.

En Figura 22, en (a) observamos valores máximos de 132.61 Pa al inicio del mezclador, no obstante, este valor disminuye hasta 29.28 Pa en la salida del mezclador y el inicio del chip para tejido cardiaco. Como en los casos de las simulaciones sin conexión entre chips, los valores de presión disminuyen notablemente dentro de los chips, para aumentar a la salida de estos, en las secciones de conexiones entre chips. (b) En esta configuración, observamos un valor máximo de 131.52 Pa . El desarrollo del flujo en el mezclador presenta una tendencia similar al de la configuración en (a), debido a que se desarrolla una gradiente que disminuye conforme el flujo avanza. El valor de presión en la entrada del chip para tejido cardiaco disminuye hasta 28.3 Pa .

Con esferoides

En esta sección, observamos los campos de velocidades y presiones para las dos configuraciones. Para ambos casos la velocidad inicial en las entradas del mezclador es de

0.001 m/s . También, en este apartado se mostrarán con detalle el desarrollo de los vectores de velocidad en las zonas de siembra celular.

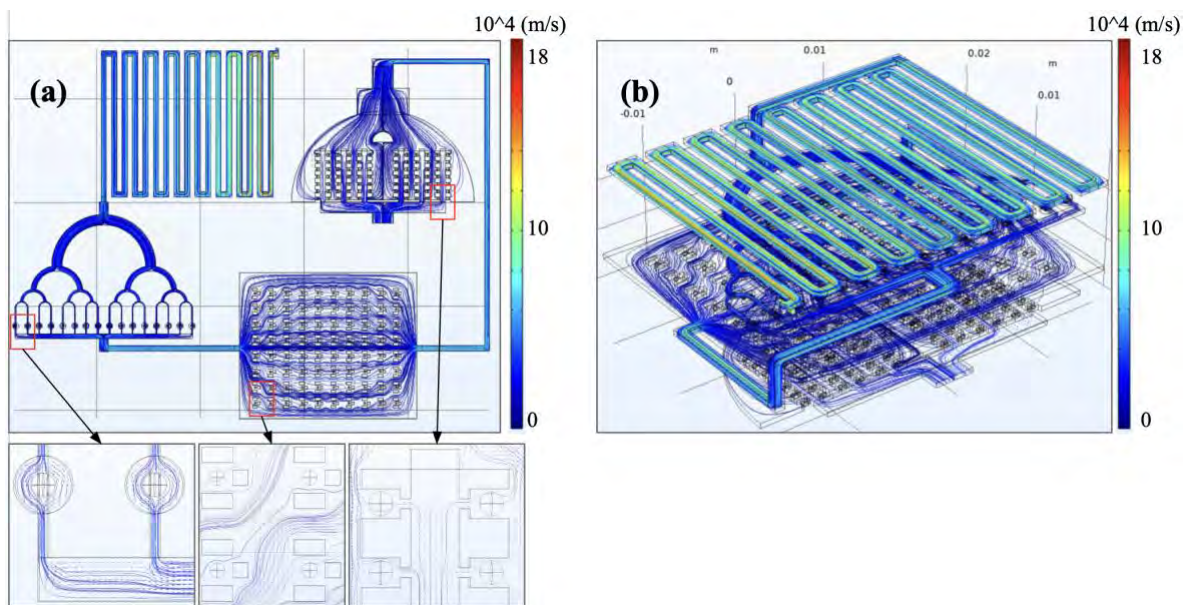


Figura 23. Campo de velocidades de los cuatro chips que componen el Human Body on a Chip interconectados entre ellos en 3D con esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en $10^{-4} m/s$.

En la Figura 23, en (a) observamos, como en la configuración sin esferoides, valores máximos de $18 \times 10^{-4} m/s$. No obstante, a diferencia de la configuración sin esferoides, observamos un comportamiento distinto en las 4 primeras curvas en el mezclador: en las primeras dos vemos velocidades mayores a $14 \times 10^{-4} m/s$, y en los dos siguientes valores de $8 \times 10^{-4} m/s$. En el interior de los chips observamos velocidades menores a $4 \times 10^{-4} m/s$, a diferencia de las secciones que conectan los chips, donde observamos velocidades que oscilan entre 6 y $8 \times 10^{-4} m/s$. (b) En esta figura, observamos un ligero incremento de la velocidad en el mezclador, comparado con la configuración sin esferoides, con velocidades que oscilan entre 8 y $14 \times 10^{-4} m/s$. En el interior de los chips observamos velocidades menores a $4 \times 10^{-4} m/s$.

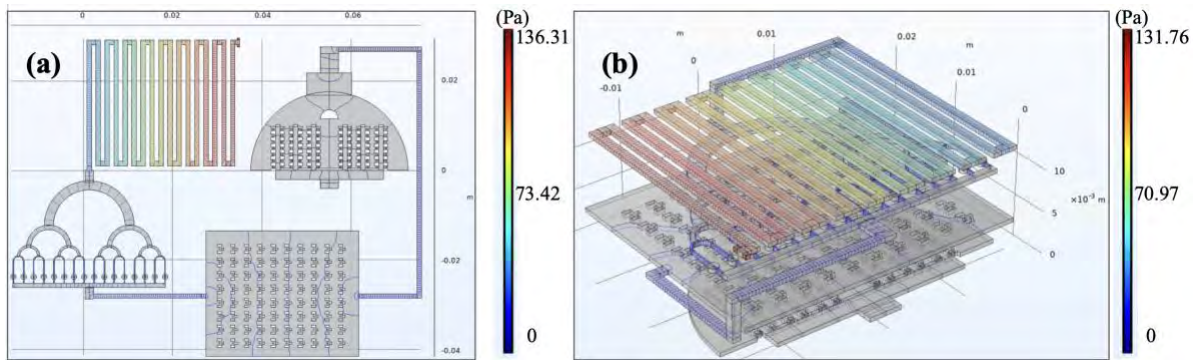


Figura 24. Campo de presiones de los cuatro chips que componen el Human-Body-on-a-Chip interconectados entre ellos en 3D con esferoides. La barra de color en ambas imágenes está en Pa.

En la Figura 24, en (a) observamos valores máximos de 136.2 Pa al inicio del mezclador; no obstante, este valor disminuye hasta 29.31 Pa en la salida del mezclador y el inicio del chip para tejido cardiaco. Como en los casos de las simulaciones sin conexión entre chips, los valores de presión disminuyen notablemente dentro de los chips, para aumentar a la salida de estos, en las secciones de conexiones entre chips. (b) En esta configuración, observamos un valor máximo de 131.65 Pa . El desarrollo del flujo en el mezclador presenta una tendencia similar al de la configuración en (a), debido a que se desarrolla un gradiente que disminuye conforme el flujo avanza. El valor de presión en la entrada del chip para tejido cardiaco disminuye hasta 28.33 Pa .

4.2 Caracterización del flujo ideal: campo de concentraciones de la interacción entre Sirolimus y sangre humana.

En este apartado se presentan los resultados del módulo de transporte de especies diluidas de COMSOL, los campos de concentración de la interacción entre sangre humana y Sirolimus. En el primer apartado se observa la interacción entre estas dos soluciones en las diferentes geometrías del chip para tejido renal. En el segundo apartado se muestran los resultados de la mezcla de los dos compuestos en el mezclador, que es la primera pieza del Human-Body-on-a-Chip. En el Tercer y último apartado se enseñan los resultados de la interacción entre sangre

humana y Sirolimus en el Human-Body en su conjunto, la conexión entre el mezclador con los chips para tejido cardíaco, hepático y renal.

4.2.1 Tejido renal en un chip

En esta sección se presentan los resultados del módulo de transporte de especies diluidas de COMSOL, el cual calcula los campos de concentración de la interacción entre sangre humana y Sirolimus, en el chip para tejido renal.

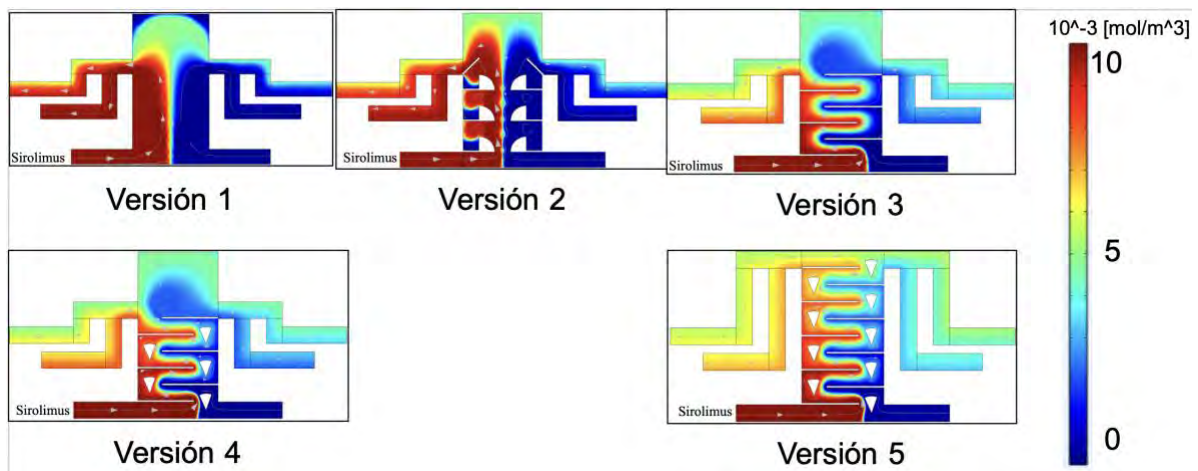


Figura 25. Campo de concentraciones del riñón en un chip de todas las versiones, en la entrada izquierda se introduce Sirolimus, color rojo. La barra de color de todas las imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3 .

El objetivo en cada una de las versiones es el mezclar ambas sustancias, esto se evidencia visualmente en las regiones con verde fosforescente, o con un valor de $5 \times 10^{-3} \text{ mol/m}^3$. En ninguna de las versiones se logra esto antes de llegar a las alas del microbioreactor, incluso con valores de velocidad y presiones altas.

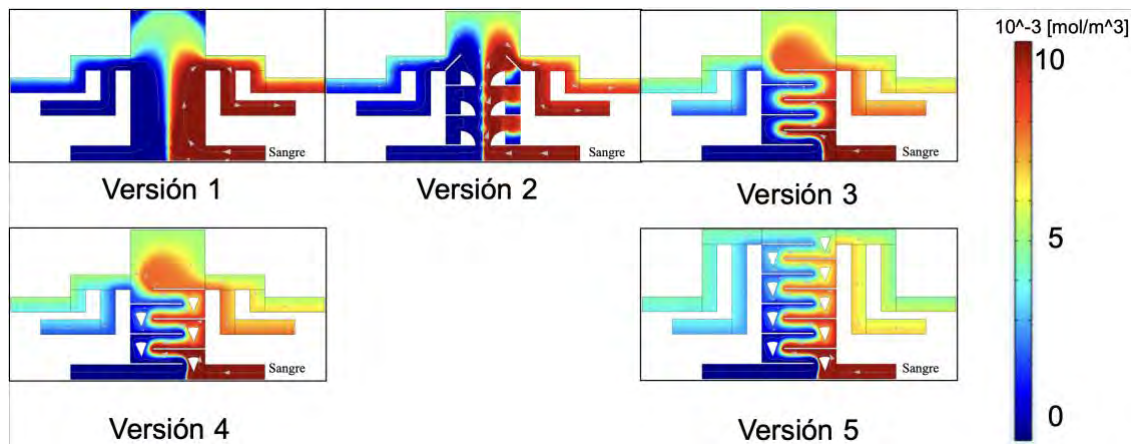


Figura 26. Campo de concentraciones del riñón en un chip de todas las versiones, en la entrada derecha se introduce sangre, color rojo. La barra de color de todas las imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3 .

El objetivo en cada una de las versiones que se muestran en la Figura 26, es el mezclar ambas sustancias, esto se evidencia visualmente en las regiones con verde fosforescente, o con un valor de $5 \times 10^{-3} \text{ mol/m}^3$. En ninguna de las versiones se logra esto antes de llegar a las alas del biorreactor, incluso con valores de velocidad y presiones altas.

4.2.2 Mezclador

En esta sección se presentan los resultados del módulo de transporte de especies diluidas de COMSOL, el cual arroja los campos de concentración de la interacción entre sangre humana y Sirolimus, en el mezclador que forma parte del Human-Body-on-a-Chip. La velocidad inicial es de 0.001 m/s , y las concentraciones iniciales de ambas especies es de $10 \mu\text{M}$. Cabe resaltar que los resultados de este apartado son tiempos dependientes; en este sentido, se enseñan dos momentos, $t=240 \text{ s}$, y $t=600 \text{ s}$. Esto, porque en $t=240 \text{ s}$, se observa una mezcla completa de las dos sustancias luego de pasar por la segunda unidad de mezclado. Defino una unidad de mezclado al espacio compuesto entre dos secciones rectas unidas por una curva, contando luego del primer apartado recto que comienza con la entrada en T, por donde ingresan las soluciones. Luego en $t=600 \text{ s}$, observamos que la mezcla completa de las soluciones termina de salir del mezclador.

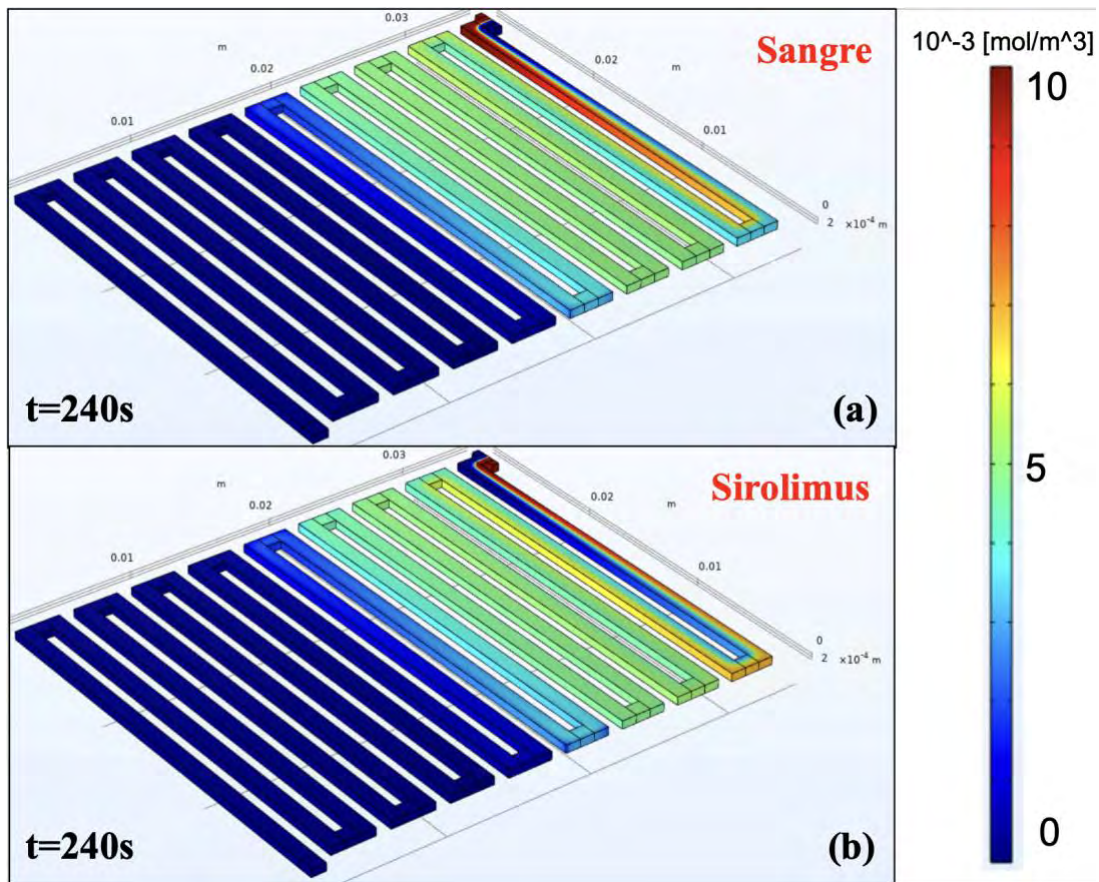


Figura 27. Mezcla de sangre y Sirolimus para $t=240s$. La barra de color de ambas las imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3 .

En la Figura 27, en (a) se representa el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c_1 , la cual es la sangre, en color rojo. (b) Representa el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c_2 , la cual es Sirolimus, en color rojo, en este caso. Ambas imágenes son el resultado para el tiempo $t=240 s$. La concentración de ambas soluciones es de $10 \mu M$, por tanto, cuando estas adquieren un color verde, esto representa $5 \mu M$, lo que significa que ambas sustancias fueron mezcladas por completo, o que su concentración se encuentra distribuida homogéneamente. Esto sucede luego de que las sustancias pasan por la segunda unidad de mezclado.

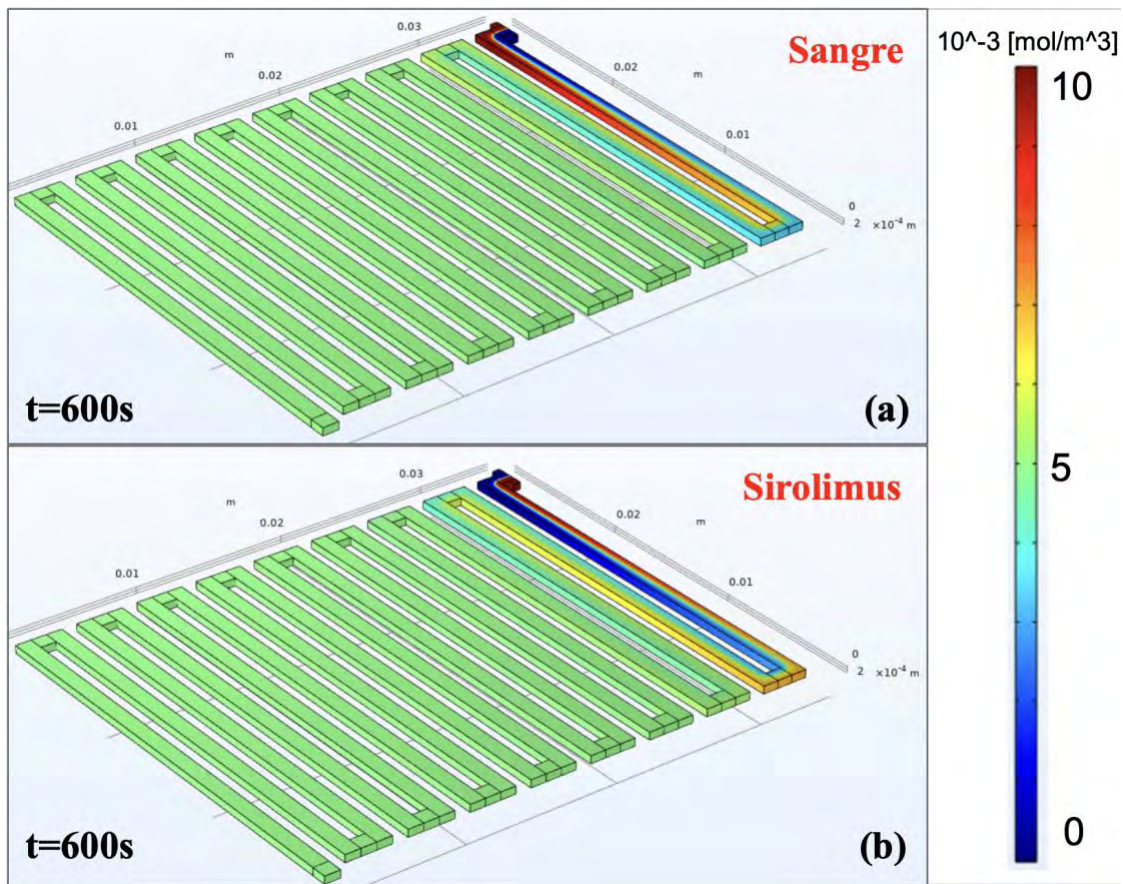


Figura 28. Mezcla de sangre y Sirolimus para $t=600s$. La barra de color de ambas imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3 .

En la Figura 28, en (a) se presenta el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c_1 , la cual es la sangre, en color rojo. (b) Representa el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c_2 , la cual es Sirolimus, en color rojo, en este caso. Ambas imágenes son el resultado para el tiempo $t=600s$. Debido a que la velocidad en las entradas es de 1 mm/s , se observa que el mezclado completo de las sustancias termina de salir del mezclador a los $600s$ aproximadamente, o 10 minutos .

4.2.3 Human-Body-on-a-Chip

En esta sección se presentan los resultados del módulo de transporte de especies diluidas de COMSOL, el cual arroja los campos de concentración de la interacción entre sangre humana y Sirolimus, en el Human Body on a Chip, o sea la conexión entre el mezclador y los chips. La velocidad inicial es de 1 mm/s , se definió que este módulo utilice los resultados del campo

de velocidades del módulo de Flujo Laminar, las concentraciones iniciales de ambas especies es de $10 \mu M$. Solo se simularon las versiones que contenían los esferoides, los cuales representan las células, las cuales serán bañadas por la mezcla de las soluciones. Se definió que la distribución del fármaco es intravenosa, en base a ello se define el orden y la dirección del flujo en los chips, primero tejido cardiaco, luego hepático y finalmente renal. Es importante destacar que las simulaciones presentan 0% de metabolismo en los chips, y 100% de excreción fuera del sistema. Las soluciones mezcladas solo pasan una vez por el sistema.

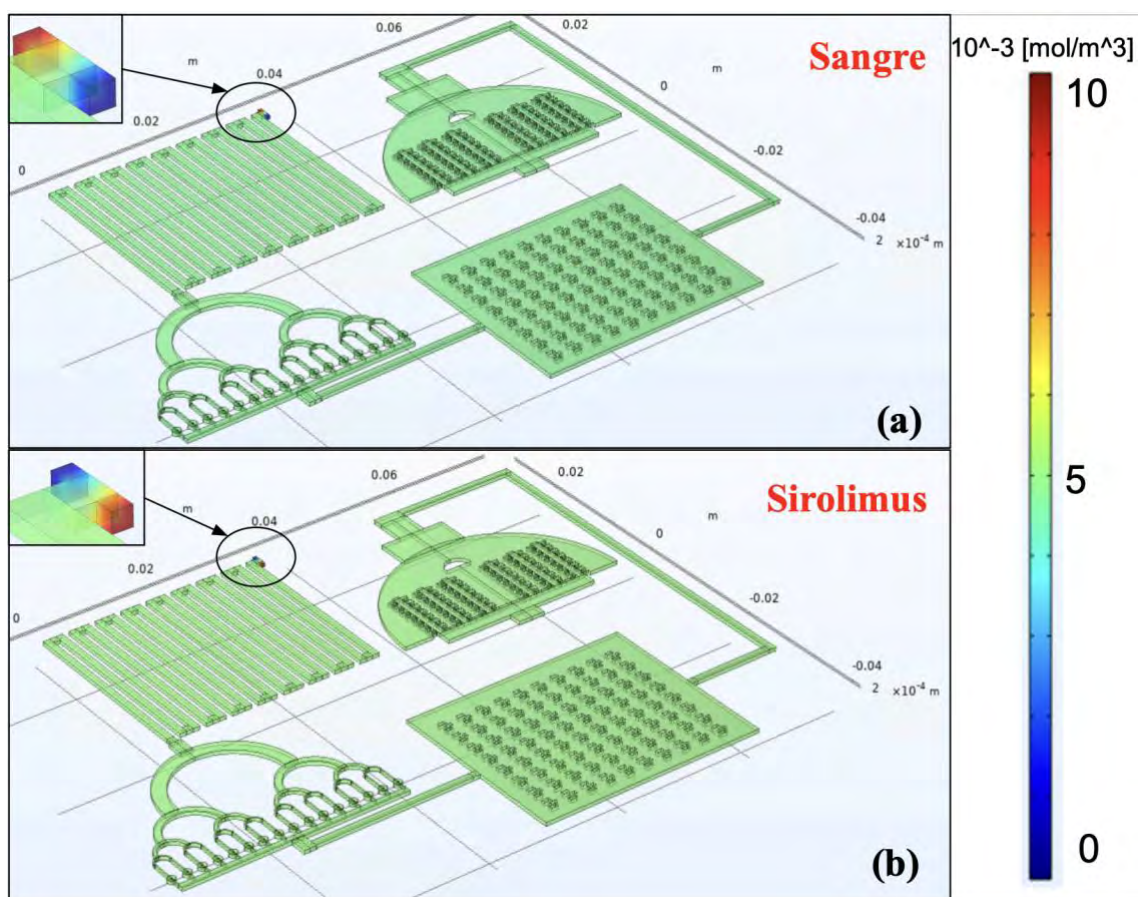


Figura 29. Campo de concentración de la mezcla entre sangre y Sirolimus en el Human-Body-on-a-Chip dispuesto en un mismo valor del eje Z. La barra de color de ambas imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3 .

En la Figura 29, en (a) se presenta el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c1, la cual es la sangre, en color rojo. (b) Representa el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c2, la cual es Sirolimus, en color rojo, en este caso. En ambos casos, las soluciones salen mezcladas del mezclador, como se muestra en el apartado anterior y esto

continúa así hasta la salida del chip de tejido renal, esto se observa gráficamente en el color de las soluciones, pasan de ser color azul y rojo, concentración de 0 y $10 \mu M$, a $5 \mu M$, lo que significa que se han mezclado completamente las dos especies, que ambas se encuentran distribuidas homogéneamente por todo el volumen del chip.

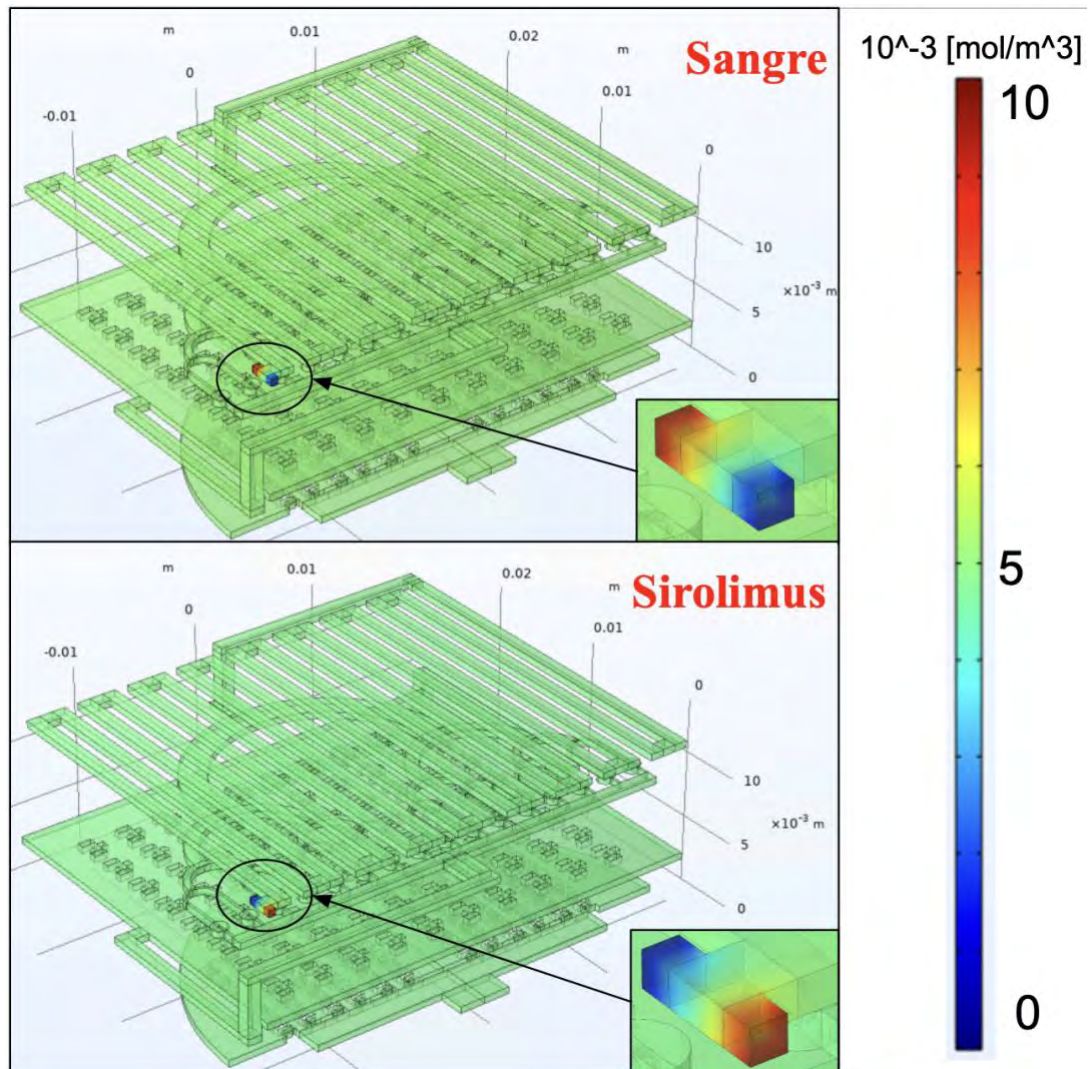
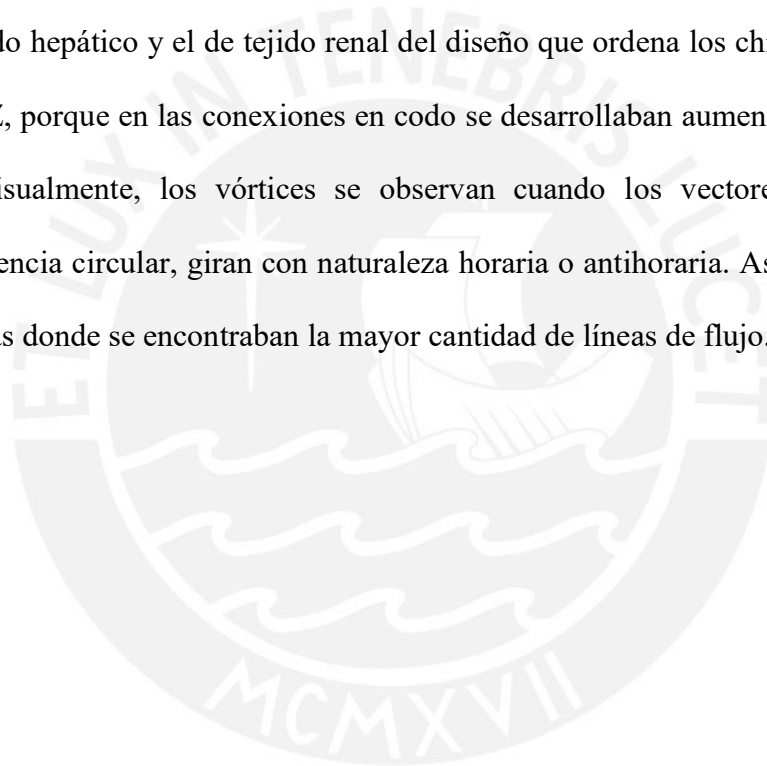


Figura 30. Campo de concentración de la mezcla entre sangre y Sirolimus en el Human-Body-on-a-Chip dispuesto en diferentes valores del eje Z. La barra de color de ambas imágenes que componen la figura está en 10^{-3} mol/m^3 .

En la Figura 30, en (a) se presenta el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c_1 , la cual es la sangre, en color rojo. (b) Representa el resultado de la mezcla desde la perspectiva de la especie c_2 , la cual es Sirolimus, en color rojo, en este caso. Al igual que en la configuración anterior, en esta sucede lo mismo con respecto al mezclado de las dos soluciones, es completa.

4.3 Caracterización del flujo ideal: análisis de vórtices en las secciones donde se encuentran los esferoides.

En esta sección se evalúa gráficamente el comportamiento de los vectores de velocidad en el campo de velocidades de las zonas donde se encuentran los esferoides, de la geometría del Human-Body-on-a-Chip. Como las velocidades en la configuración de un solo nivel en el eje Z fue el que alcanzó las mayores velocidades, este fue elegido para analizar los vórtices en él. No obstante, también se agregó una imagen del desarrollo del fluido en la sección que conecta el chip para tejido hepático y el de tejido renal del diseño que ordena los chips en diferentes valores del eje Z, porque en las conexiones en codo se desarrollaban aumentos de velocidad vertiginosos. Visualmente, los vórtices se observan cuando los vectores de velocidad desarrollan tendencia circular, giran con naturaleza horaria o antihoraria. Asimismo, sólo se observó las zonas donde se encontraban la mayor cantidad de líneas de flujo.



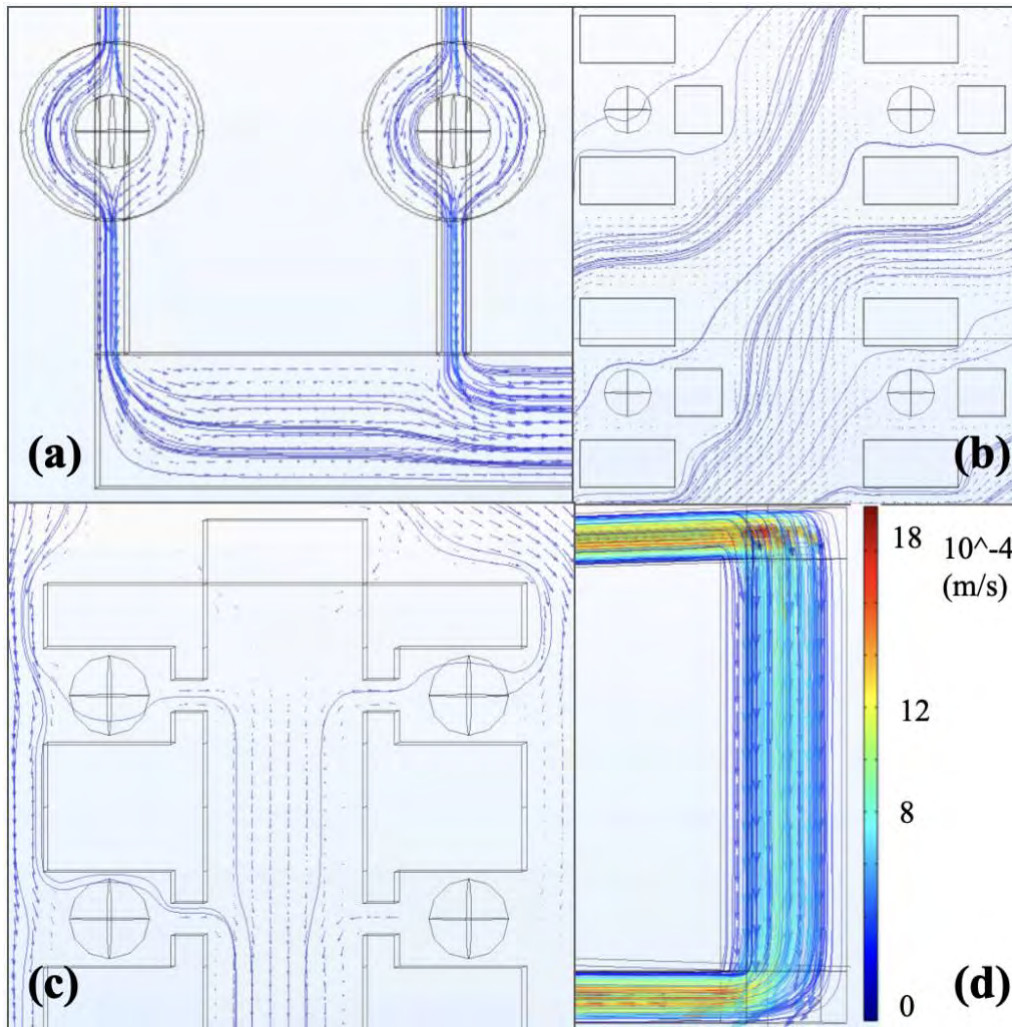


Figura 31. Análisis de los vectores del campo de velocidad para evaluar la presencia de vórtices. (a) Líneas de flujo de los lugares de siembra del chip para tejido cardíaco. (b) Líneas de flujo de los lugares de siembra del chip para tejido hepático. (c) Líneas de flujo de los lugares de siembra del chip para tejido renal. (d) Líneas de flujo de las conexiones del tejido hepático y renal.

En la Figura 31, en (a) observamos los esferoides que se encuentran en el chip para tejido cardíaco, los vectores de velocidad no desarrollan tendencia turbulenta, estos siguen las líneas de flujo sin mayor inconveniente. (b) esferoides que se encuentran en el chip para tejido hepático, los vectores de velocidad siguen las líneas de flujo sin desarrollar tendencia turbulenta. (c) esferoides que se encuentran en el chip para tejido renal, los vectores de velocidad siguen las líneas de flujo sin desarrollar tendencia turbulenta. (d) Esta es la sección que conecta el chip para tejido hepático y tejido renal del Human-Body-on-a-Chip con los chips en diferentes valores del eje Z, podemos observar claramente un aumento de velocidad a la

salida del chip de tejido hepático que luego se reduce mientras el líquido cae, y que aumenta en cuanto este cambia de dirección, asimismo, observamos generación de vórtices en la base de la conexión en codo, razón para no elegir esta geometría. Inicialmente se pensó que debería aumentar la velocidad del fluido en las secciones de interconexión a lo largo del eje Z, porque a la energía cinética que contiene el fluido se le agrega energía potencial gravitatoria gracias a la aceleración de la gravedad y la diferencia de altura; sin embargo, cuando observamos con detenimiento los valores de velocidad, observamos una disminución en los valores de la misma. Como la energía siempre se conserva en un sistema cerrado como este según la Ley de Conservación de la Energía, Primera Ley de la Termodinámica, entonces, se debe explicar porqué se pierde energía cinética, porque observamos una disminución de la velocidad. Esto probablemente se deba a que no estamos contando con la componente de la energía térmica. Lo que puede estar sucediendo es que cuando el fluido choca con las paredes se pierde la energía cinética que contiene, porque en las paredes la velocidad tiende a cero, y esta se transforma en energía térmica, conservando así la energía total del sistema. Se necesitarían simulaciones adicionales para observar las variaciones en los valores de temperatura y así confirmar esta hipótesis; sin embargo, ese estudio está fuera del alcance de este trabajo.

Para finalizar con las secciones de simulación, a continuación se comparte el link donde se encuentran cada uno de los chips simulados: la mezcla de Sirolimus y sangre en el mezclador, además de los campos de velocidades y presión de los chips para tejido cardíaco, hepático y renal. Asimismo, en el caso de las geometrías finales de los chips, así como del mezclador, todas estas se encuentran en estos archivos de simulación para su posterior modificación en COMSOL, o para poder exportarse en archivos .STL y modificarse en algún otro software CAD o directamente volverse a imprimir. Los archivos están en formato .mph, es el que usa COMSOL: <https://zenodo.org/record/7863432> .

4.4 Construcción de los prototipos de los organ-on-a-chip

Para cerrar la sección de resultados, se muestra en la siguiente figura el proceso de retiro de los chips de la impresora y su posterior limpieza de todos aquellos soportes que el programa que manda las ordenes a la impresora agrego a los diseños .STL que crearon originalmente.

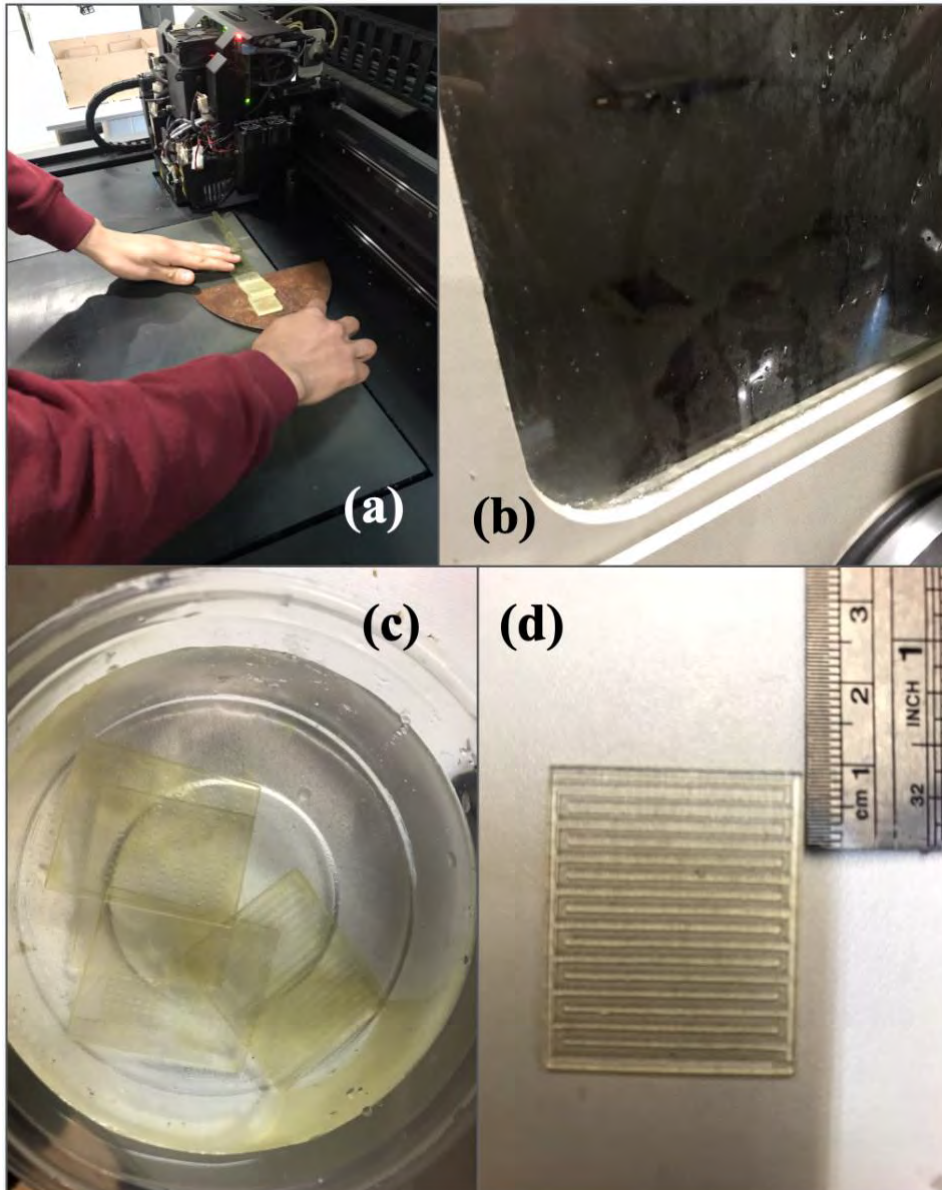


Figura 32. Retirada de la impresora y limpieza de los chips. (a) Retiro de los chips de la impresora. (b) Extracción de los soportes externos. (c) Limpieza de los soportes internos. (d) Mezclador impreso y limpio.

En la Figura 32, en (a) primero se usa una espátula para retirar cuidadosamente el chip de la base de la impresora. (b) Luego se coloca el chip en una máquina de agua a presión para retirar los soportes más grandes de la estructura del chip, esta es la Power Blast High Pressure Water

Cleaner. Cabe mencionar que si el diseño del chip presenta estructura aisladas, que no esté interconectada con todos los componentes, es probable que la presión del agua destruya la estructura, en el caso del mezclador no sucedió, pero en el del chip para tejido hepático, sí. (c) Para los componentes del soporte más pequeños que la presión del agua no pudo retirar, se utiliza una solución de soda cáustica al 1% por 30 *min*. (d) Finalmente, el chip de mezclador está listo.

Teóricamente, *a priori*, se conocía la resolución de la impresora, 200 μm , era esperable que la producción final de estos prototipos tuviera imperfecciones en los diferentes canales de los chips. Por tal motivo, se observó utilizando dos tipos de microscopios ópticos cada uno de los espacios y canales de los chips para afirmar si poseían imperfecciones, uno digital genérico con un aumento de 1600X y uno de la marca OPTYKA®, modelo SZM-LED2. De manera satisfactoria se puede afirmar que ninguno de los chips presentó alguna obstrucción en sus canales, al menos desde el lado de la óptica, como se observa en la Figura 33 y Figura 34. No obstante, se deben realizar pruebas con soluciones acuosas para verificar desde un punto de vista fluido la presencia de obstrucciones en los canales. Para ello, se deben agregar las respectivas tapas a los chips, luego, jeringas en las entradas, mangueras para las salidas y finalmente una bomba peristáltica ultra precisa para suministrar el caudal que se ha teorizado para cada chip individualmente y con los tres chips conectados al mezclador. El siguiente paso, después de verificar lo antes expuesto es alfombrar la superficie de los chips con las proteínas de la ECM que cada fenotipo celular requiera, para su posterior sembra.

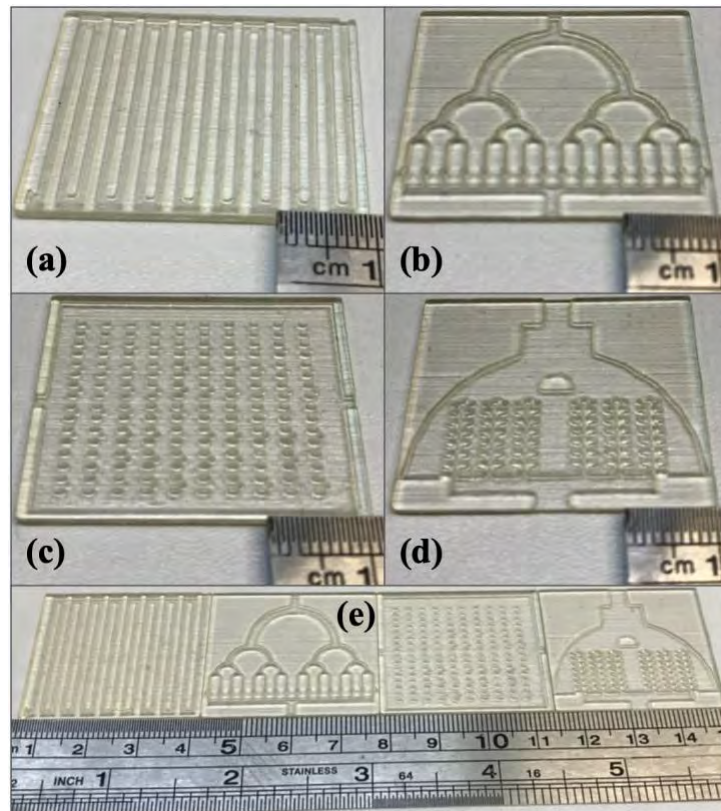


Figura 33. Chips impresos. (a) Chip del mezclador impreso. (b) Chip para tejido cardíaco. (c) Chip para tejido hepático. (d) Chip para tejido renal. (e) Los cuatro chips juntos distribuidos horizontalmente.

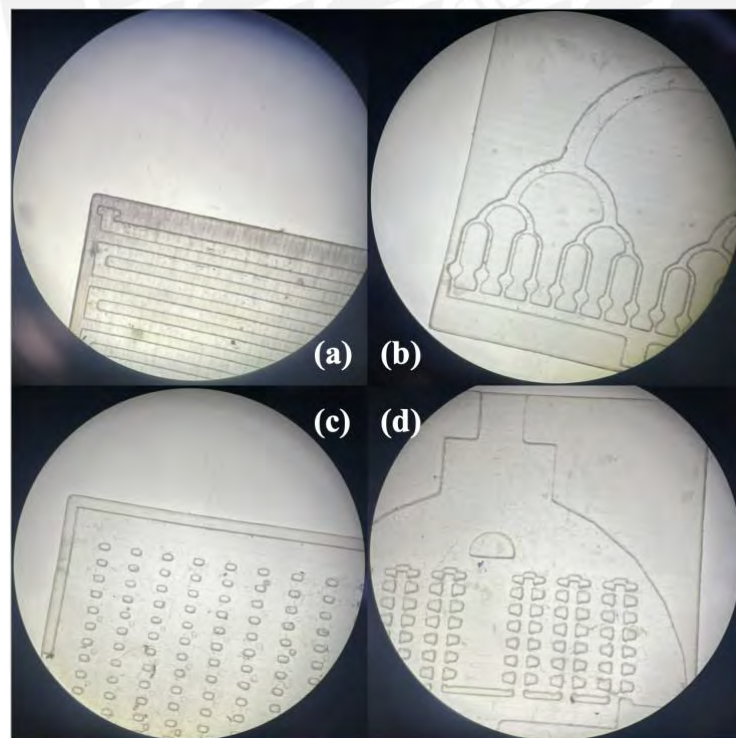


Figura 34. Imágenes microscópicas de los chips. (a) Entrada en T del mezclador. (b) Chip para tejido cardíaco. (c) Chip para tejido hepático, observamos que existen zonas incompletas en las trampas debido a que fueron retiradas por la bomba de agua. (d) Chip para tejido renal.

Conclusiones

- Este trabajo pertenece a la etapa de modelado *in silico*, la cual es previa al modelado *in vitro*. En este sentido, este trabajo busca servir como una herramienta de aproximación para informar a experimentos de modelado *in vitro*, observando las propiedades del esfuerzo cortante. Asimismo, en las simulaciones se observa la mezcla de una solución de Sirolimus con sangre humana gracias al funcionamiento del mezclador. El diseño desarrollado en este trabajo muestra la distribución homogénea de la solución de Sirolimus al ingresar a cada uno de los chips, evitando una gran variabilidad debido a la distribución del fármaco. Si bien este estudio asume una condición límite de 0% de metabolismo y 100% de secreción del fármaco, estudios adicionales que siembran células que metabolizan fármacos como Sirolimus abordarían con éxito la toxicidad en los modelos de tejido, Leung et al. (2022) y Monteduro et al. (2023).
- El modelado computacional resulta de gran utilidad en el prototipado y construcción de dispositivos. De hecho, gracias a este, el flujo de trabajo en el desarrollo de tecnologías cambia de seguir tres pasos: diseñar en software *Computer Aided Design* (CAD), imprimir en 3D y realizar pruebas; a cinco pasos: diseñar en software CAD, simular en COMSOL hasta que los resultados *in silico* sean apropiados, imprimir en 3D, realizar pruebas para luego compararlas con los resultados de la simulación, si los resultados de las comparaciones no resultan útiles para la aplicación, el flujo se vuelve a realizar, como se observa en la Figura 35.

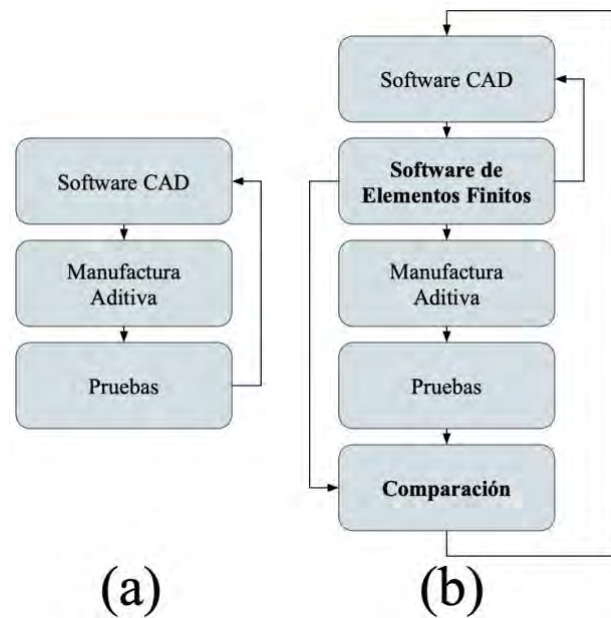


Figura 35. Comparación entre el flujo de trabajo de la etapa prototipado con y sin el uso de software de elementos finitos. (a) observamos los tres pasos del flujo de trabajo en un prototipado sin usar COMSOL, o algún tipo de software de elementos finitos. (b) los cinco pasos del flujo de trabajo en un prototipado usando COMSOL.

- Para el caso del desarrollo de células renales, es indispensable que el material sea permeable al oxígeno, no obstante, el PMMA presenta una permeabilidad de $5.69 \times 10^{-10} \frac{cm}{cm^2 \cdot s \cdot atm}$ según el análisis realizado por Früh et al. (2018), material al que se parece la resina VeroClear que se utilizaría para la impresión de los chips, frente a los valores de entre 75 y $85 \times 10^{-9} \frac{cm}{cm^2 \cdot s \cdot atm}$ calculados por Rea et al. (2019) para el caso del PDMS, lo que representa una permeabilidad de más de 130 veces del PDMS sobre el PMMA. Por ende, si bien el PDMS es de compleja construcción y necesita de un recubrimiento para ser óptimo para el desarrollo celular, su permeabilidad al oxígeno molecular es una propiedad indispensable en ingeniería de tejidos.
- Si bien la configuración en diferentes valores del eje Z ahorra bastante espacio, la configuración de las conexiones al tener ángulos de 90° en vertical, estos generan cambios de velocidad y turbulencia. Lo mismo sucede en el mezclador, y en las unidades donde se cultivarán las células hepáticas y renales, también se generan configuraciones de 90° . Por este motivo, y pensando también en la limpieza, interconexión entre chips y análisis de imágenes

histológicas que se pueden hacer en el futuro, la configuración del Human-Body-on-a-Chip predispuestos en diferentes valores del eje Z, resulta en la geometría más complicada para realizar las tareas antes mencionadas.

- El diseño para el chip representando tejido cardíaco sobrepasa el umbral del valor de cizallamiento establecido. El valor máximo de esfuerzo cortante del chip para tejido cardíaco, en las zonas de siembra celular, 3.17 Pa, es superior al límite que se estableció como umbral para el valor de esfuerzo cortante. El valor de 2.6 Pa fue escogido porque es el límite que soportan las células madre y no se conocen los valores específicos para cardiomiocitos, hepatocitos ni podocitos. Esto haría posible sembrar células madre, y añadir protocolos de diferenciación en el futuro para cada tipo celular. En el caso de los valores para tejido hepático y renal, los valores fueron inferiores a 2.6 Pa, 1.8 Pa para el chip de tejido hepático y 2.28 Pa para el de tejido renal.
- El mezclador que se diseñó para combinar sangre humana con Sirolimus realiza correctamente su función en solo tres unidades de mezclado de un total de ocho. Por lo que se podría disminuir su longitud. No se observaron vórtices en los lugares de siembra celular en ninguno de los chips.
- Se observa que las velocidades y presiones bajan enormemente en los resultados macro del Human-Body-on-a-Chip debido a la interconexión entre el mezclador y los chips para tejido cardíaco, hepático y renal.

Recomendaciones

Se recomienda buscar otro polímero para la construcción de los chips, diferente al PDMS y a la resina VeroClear. Dicho material debe poder utilizarse en impresión 3D y ser permeable al oxígeno molecular.

Se sugiere evaluar alternativas para la disposición de los canales de interconexión entre cada una de las unidades de siembra, para todos los chips, de manera que se garanticen las condiciones de desarrollo y comunicación celular.

Se puede reducir la velocidad inicial en el mezclador desde 1 *mm/s* que son los valores empleados en este trabajo hasta 0.3 *mm/s* que es el promedio que se alcanza en los capilares. Esto con el fin de reducir aún más los valores de presión; recordemos que los 2.6 Pa es el valor máximo de cizallamiento, mientras más alejados de ese valor, mejor para el desarrollo celular.

Se recomienda cambiar los ángulos en las esquinas de todos los chips, desde el mezclador hasta el chip renal. En la configuración de los chips predispuestos en el eje Z, las uniones de codo entre chips en forma vertical, deben ser suavizadas. Así, los ángulos de 90 grados deben ser reducidos, pues estos generan variaciones de velocidades y vórtices en las uniones en forma de codo. En el caso de las unidades de siembra del chip hepático y el chip renal, se sugiere cambiar los ángulos en los que están predispuestas sus paredes. Para simular la geometría del tejido hepático, se sugiere disponer las trampas en ángulos de 120°, como en un hexágono, la cual imitaría la estructura de la unidad de funcionamiento básico hepático, el lobulillo hepático.

En lugar de conectar una bomba peristáltica al inicio del mezclador que alimente a los cuatro dispositivos fluidicos, para tener un mejor control de las velocidades y presiones, se debe evaluar usar bombas peristálticas para cada uno de los chips, con el fin de reducir las velocidades y presiones, y con esto, los valores de cizallamiento.

Se recomienda reducir la longitud del mezclador a solo tres unidades de mezclado para que los chips pasen de recibir el resultado de la mezcla de sustancias de 10 minutos a solo 4 minutos. Esto disminuirá el tiempo en el que las soluciones mezcladas entren en contacto con las zonas donde se encuentran los esferoides que representan los lugares de siembra celular.

Por la forma en la que se diseñó el flujo del Human-Body-on-a-Chip, el flujo de la mezcla de las sustancias es unidireccional, esto quiere decir que lo que sale del chip para tejido cardiaco, pasa al chip de tejido hepático, y la suma de la interacción entre las hipotéticas células de estos dos tejidos desemboca en el chip para tejido renal, entonces solo el tejido renal se nutre de los dos tejidos y el tejido hepático se nutre del tejido cardiaco, mas este último no se nutre de la interacción de los otros dos tejidos, solo recibe el resultado de la mezcla de la sangre y Sirolimus. En este sentido, se recomienda evaluar conexiones con retroalimentación alternativa. Otra posible solución, sería tener dos bombas peristálticas, una en la entrada del mezclador y otro en la salida del chip de tejido renal, para que las soluciones puedan recircular. No obstante, las geometrías fueron diseñadas para recibir el flujo en una sola dirección porque si no se hace de esa manera, no existe barrera para contener los esferoides en el lugar que se precisó, es muy probable que, si el flujo viene en dirección contraria, los esferoides se salgan de los lugares de siembra originales.

Se deben rediseñar la geometría de los chips para poder comprobar que los fluidos se transportan libremente por los canales de cada chip, se sugieren dos formas de construcción: un monocasco donde tanto la base como la tapa sean uno mismo, y la segunda, con una división en dos de los chips, entre la base y la tapa. En el caso de la segunda, esta resultaría más cómoda para situar las células en su lugar, limpiar los chips; así como, la observación del desarrollo celular bajo el lente del microscopio, entonces lo único a agregar serían los tornillos para unir estas partes.

Se sugiere construir los chips en PDMS y sembrar los constructos celulares para observar diferencias en el desarrollo celular entre la utilización de este polímero y VeroClear.

Para finalizar con este trabajo se mencionan a continuación los pilares, identificados por el autor de este manuscrito, que debe contener el siguiente prototipo con el objetivo de sembrar células y estas se desarrollen exitosamente por un período de un mes como primer rango de tiempo ideal. En este sentido, estos pilares son siete, todos de igual importancia. Primero, elegir la(s) proteína(s) de la ECM para recubrir los Chips. Segundo, el polímero base de los Chips, PDMS o VeroClear, u otro. Tercero, el protocolo de diferenciación celular para las células madre. Cuarto, el sistema de control de velocidad en las secciones de ingreso de los fluidos. Quinto, sistema de recolección de productos de desecho celular. Sexto, sensores para biomarcadores de maduración celular; así como sensores de glucosa y oxígeno molecular. Séptimo, se necesita un control de las condiciones medio ambientales externas a los chips, como la temperatura y CO_2 . Un diagrama de lo antes descrito se puede observar en la Figura 35.

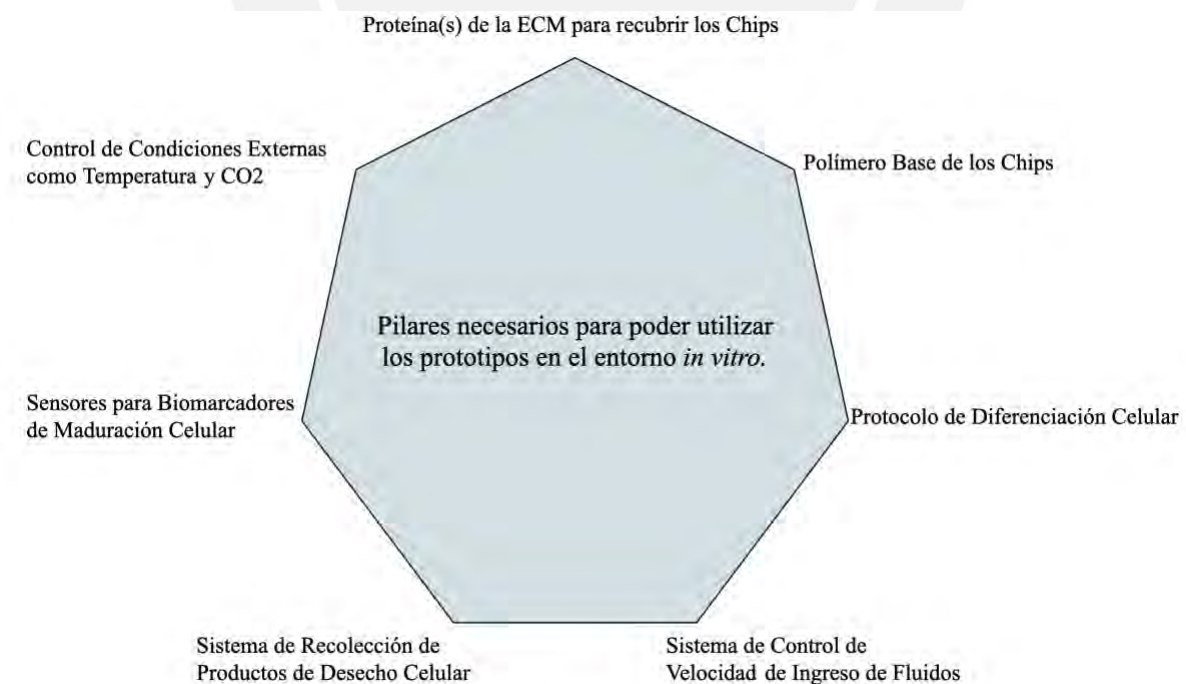


Figura 36. Pilares necesarios para poder utilizar los prototipos en el entorno *in vitro*.

Referencias Bibliográficas

Abaci H.E., Shuler M.L. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling, *Integr Biol Quantitative Biosci Nano macro*, 7 (4) (2015), pp. 383-391

Angel A. Justiz Vaillant; Pranav Modi; Oranus Mohammadi, (2021, 15 de octubre) *Graft Versus Host Disease*, National Center for Biotechnology Information, Accedido el 14 de febrero de 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538235/>.

Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*. 2019 Jan;70(1):151-171. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30266282.

Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23:1631–4.

Barisam, M., Saidi, M., Kashaninejad, N., & Nguyen, N.-T. (2018). Prediction of Necrotic Core and Hypoxic Zone of Multicellular Spheroids in a Microbioreactor with a U-Shaped Barrier. *Micromachines*, 9(3), 94. doi:10.3390/mi9030094

Barisam, M., Saidi, M., Kashaninejad, N., Vadivelu, R., & Nguyen, N.-T. (2017). Numerical Simulation of the Behavior of Toroidal and Spheroidal Multicellular Aggregates in Microfluidic Devices with Microwell and U-Shaped Barrier. *Micromachines*, 8(12), 358. doi:10.3390/mi8120358

Berdigaliyev, N., & Aljofan, M. (2020). An overview of drug discovery and development. *Future Medicinal Chemistry*. doi:10.4155/fmc-2019-0307

Bhagat, A.A.S., Papautsky, I., 2008. Enhancing particle dispersion in a passive planar micromixer using rectangular obstacles.

Bhatia SN and Ingber DE (2014) Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* 32 (8), 760–72.

Bird R. B. , W. E. Stewart y E. N. Lightfoot, *Transport Phenomena*. John Wiley y Sons Inc, 20 de nov. de 2006, 928 pages., isbn: 0470115394. direccion: https://www.ebook.de/de/product/5959440/r_byron_bird_warren_e_stewart_edwin_n_lightfoot_transport_phenomena.html , *Transport Phenomena* - R. Byron Bird, Warren E. Stewart, Edwin N. Lightfoot

Butler PJ, Norwich G, Weinbaum S, Chien S (2001) Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C962–C969

Cai Z, Xin J, Pollock DM, Pollock JS (2000) Shear stress-mediated NO production in inner medullary collecting duct cells. *Capretto, L., Cheng, W., Hill, M., Zhang, X., 2011. Micromixing within microfluidic devices. Top. Curr. Chem. 304, 27–68*

Cengel Y. y Cimbala J. M., Chapter 4: Fluid Kinematics - *Fluid Mechanics: Fundamentals and Applications*, Fourth Edition. McGraw Hill Book Co, 27 de feb. de 2017, 1056 págs., isbn: 1259696537. direccion: https://www.ebook.de/de/product/29153549/yunus_a_cengel_john_m_cimbala_fluid_mechanics_fundamentals_and_applications.html.

Cengel Y. y Cimbala J. M., Chapter 6: Momentum Analysis of Flow Systems - *Fluid Mechanics: Fundamentals and Applications*, Fourth Edition. McGraw Hill Book Co, 27 de feb. de 2017, 1056 págs., isbn: 1259696537. direccion: https://www.ebook.de/de/product/29153549/yunus_a_cengel_john_m_cimbala_fluid_mechanics_fundamentals_and_applications.html.

Cengel Y. y Cimbala J. M., Chapter 8: Internal Flow - *Fluid Mechanics: Fundamentals and Applications*, Fourth Edition. McGraw Hill Book Co, 27 de feb. de 2017, 1056 págs., isbn: 1259696537. direccion: https://www.ebook.de/de/product/29153549/yunus_a_cengel_john_m_cimbala_fluid_mechanics_fundamentals_and_applications.html.

Cengel Y. y Cimbala J. M., Chapter 9: Differential Analysis of Fluid Flow - *Fluid Mechanics: Fundamentals and Applications*, Fourth Edition. McGraw Hill Book Co, 27 de feb. de 2017, 1056 págs., isbn: 1259696537. direccion: https://www.ebook.de/de/product/29153549/yunus_a_cengel_john_m_cimbala_fluid_mechanics_fundamentals_and_applications.html.

Cenhrang K, Robart L, Castiaux AD, Martin RS. 3D printed devices with integrated collagen scaffolds for cell culture studies including transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) measurements. *Anal Chim Acta*. 2022 Aug 15;1221:340166. doi: 10.1016/j.aca.2022.340166. Epub 2022 Jul 13. PMID: 35934386; PMCID: PMC9511703.

Chakraborty S. , M. J. Davis and M. Muthuchamy, *Seminars in cell & developmental biology*, 2015

Christopher J.E. Watson, J. Andrew Bradley, Chapter 19 - mTOR Inhibitors: Sirolimus and Everolimus, Editor(s): Peter J. Morris, Stuart J. Knechtle, *Kidney Transplantation (Sixth Edition)*, W.B. Saunders, 2008, Pages 293-308, ISBN

Clarkson Michael, Barry Brenner, Ciara Magee, Chapter 40 - Clinical Aspects of Renal Transplantation, *Pocket Companion to Brenner and Rector's The Kidney (Second Edition)*, 2011, eBook ISBN: 9781455703784, 827–850. doi:10.1016/b978-14160-6640-8.00040-3

Cohen G, Horl WH. Immune dysfunction in uremia—an update. *Toxins (Basel)*. 2012;4:962–90.

Compagnon P, Cle'ment B, Campion JP, Boudjema K. Effects of hypothermic machine perfusion on rat liver function depending on the route of perfusion. *Transplantation* 2001;72:606–14.

COMSOL. (2022, 5 de mayo). The Laminar Flow Interface, The Laminar Flow Interface (comsol.com)

COMSOL. (2022, 5 de mayo). The Transport of Diluted Species Interface, The Transport of Diluted Species Interface (comsol.com)

Conway A. and D. V. Schaffer, *Stem cell research & therapy*, 2012, 3, 50

Currens ER, Armbruster MR, Castiaux AD, Edwards JL, Martin RS. Evaluation and optimization of PolyJet 3D-printed materials for cell culture studies. *Anal Bioanal Chem*. 2022 May;414(11):3329–3339. doi: 10.1007/s00216-022-03991-y. Epub 2022 Mar 11. PMID: 35274156; PMCID: PMC9018575.

Dasgupta I, Shroff R, Bennett-Jones D, McVeigh G, Group NHGD. Management of hyperphosphataemia in chronic kidney disease: summary of National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) guideline. *Nephron Clin Pract*. 2013;124:1–9.

Du Z, Duan Y, Yan Q, Weinstein AM, Weinbaum S, Wang T (2004) Mechanosensory function of microvilli of the kidney proximal tubule. *PNAS* 101:13068–13073

Falk, L., Commenge, J.M., 2010. Performance comparison of micromixers. *Chem. Eng. Sci.* 65, 405–411.

Faqi AS. 2012 A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development. New York, NY: Academic Press, ISBN 9780123878168, A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development, de Ali S. Faqi - Libros en Google Play.

Fries, E., Berli, M., Campana, D., Ubal, S., & Di Paolo, J. (2015). Computer Simulation of the Blood Flow in a Planar Configuration for a Pulsatile Ventricular Assist Device. *IFMBE Proceedings*, 892–895. doi:10.1007/978-3-319-13117-7_226 from disease models to opportunities for drug development. *Biosens Bioelectron*. 2023 Jul 1;231:115271. doi:10.1016/j.bios.2023.115271. Epub 2023 Mar 31. PMID: 37060819.

Früh, A., Egelhaaf, H.-J., Hintz, H., Quinones, D., Brabec, C. J., Peisert, H., & Chassé, T. (2018). PMMA as an effective protection layer against the oxidation of P3HT and MDMO-PPV by ozone. *Journal of Materials Research*, 33(13), 1891–1901. doi:10.1557/jmr.2018.74

Funk C, Laun FB, Wetscherek A. Characterization of the diffusion coefficient of blood. *Magn Reson Med*. 2018 May;79(5):2752–2758. doi: 10.1002/mrm.26919. Epub 2017 Sep 23. PMID: 28940621; PMCID: PMC5836916.

Gheorghe A, Griffiths U, Murphy A, Legido-Quigley H, Lamptey P, Perel P., The economic burden of cardiovascular disease and hypertension in low-and middle-income countries: a systematic review. *BMC Public Health*. 2018;18:975.

Ghaseddin, A., Pouri, H., Soleimani, M., Vasheghani-Farahani, E., Ahmadi Tafti, H., & Hashemi-Najafabadi, S. (2017). Cell laden hydrogel construct on-a-chip for mimicry of cardiac tissue in-vitro study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(2), 225–230. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.029

Giordano, N., Cheng, J.T., 2001. Microfluid mechanics: progress and opportunities. *J. Phys.: Condens. Matter* 13, 271–295.

Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gómez-Lechón MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Häussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhütter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin

Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stöber R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, Hengstler JG (2013) Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87: 1315-1530.

Godoy P., N. J. Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Goral V.N., Y. C. Hsieh, O. N. Petzold, J. S. Clark, P. K. Yuen and R. A. Faris, *Lab Chip*, 2010, 10, 3380-3386.

Gross M. Leberzirrhose und Komplikationen rechtzeitig erkennen. *MMW-Fortschr. Med.* 2019;161:48–52. doi: 10.1007/s15006-019-0408-9.

Haidekker MA, L'Heureux N, Frangos JA (2000) Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1401–H1406

Hall Jhon E. , Hall Michael E. , Chapter 35: Blood Types; Transfusion; Tissue and Organ Transplantation , Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (pp 445-450), 12th Edition.

Hall Jhon E. , Hall Michael E., Chapter 14: Overview of the Circulation; Biophysics of Pressure, Flow, and Resistance, Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (pp 157-166), 12th Edition.

Hall Jhon E. , Hall Michael E., Chapter 16: The Microcirculation and Lymphatic System: Capillary Fluid Exchange, Interstitial Fluid, and Lymph Flow, Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (pp 177-189), 12th Edition.

Hall, J. E., Hall M. E. (2020). Glomerular Filtration, Renal Blood Flow, and Their Control, W B Saunders, Guyton and hall textbook of medical physiology (14th ed.) (pp. 331 - 342).

Hall, J. E., Hall M. E. (2020). Renal Tubular Reabsorption and Secretion, W B Saunders, Guyton and hall textbook of medical physiology (14th ed.) (pp. 343 - 364).

Hallow DM, Seeger RA, Kamaev PP, Prado GR, LaPlaca MC, Prausnitz MR (2008) Shear-induced intracellular loading of cells with molecules by controlled microfluidics. *Biotechnol Bioeng* 99:846–854. doi:10.1002/bit.21651

Hegde M., R. Jindal, A. Bhushan, S. S. Bale, W. J. McCarty, I. Golberg, O. B. Usta and M. L. Yarmush, *Lab Chip*, 2014, 14, 2033-2039.

Herrera-Añazco, Percy, Atamari-Anahui, Noé, & Flores-Benites, Vladimir. (2019). Número de nefrólogos, servicios de hemodiálisis y tendencia de la prevalencia de enfermedad renal crónica en el Ministerio de Salud de Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 36(1), 62-67. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.4253>

Hessel, V., Löwe, H., Schönfeld, F., 2005. Micromixers—a review on passive and active mixing principles. *Chem. Eng. Sci.* 60, 2479–2501.

Hewitt NJ, Lecho'n MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 2007;39:159–234.

Hibbeler, R.C. (2004). *Mechanics of Materials*. New Jersey USA: Pearson Education. p. 32. , Hibbeler, *Mechanics of Materials*, 4th Edition | Pearson

Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global prevalence of chronic kidney disease—a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11:e0158765.

Himmelfarb J. Oxidative stress in hemodialysis. *Contrib Nephrol.* 2008;161:132–7.

Hossain, S., Kim, K.Y., 2015. Mixing analysis in a three-dimensional serpentine split-and-recombine micromixer. *Chem. Eng. Res. Des.* 100, 95–103.

Houle R, Raoul J, Le'vesque JF, Pang KS, Nicoll-Griffith DA, Silva JM. Retention of transporter activities in cryopreserved, isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2003;31:447–51.

- Hyndman, L., McKee, S., Mottram, N. J., Singh, B., Webb, S. D., & McGinty, S. (2020). *Mathematical modelling of fluid flow and solute transport to define operating parameters for in vitro perfusion cell culture systems*. *Interface Focus*, 10(2), 20190045. doi:10.1098/rsfs.2019.0045
- Jeon, W., Shin, C.B., 2009. Design and simulation of passive mixing in microfluidic systems with geometric variation. *Chem. Jeong, G.S., Chung, S., Kim, C.B., Lee, S.H., 2010. Applications of micromixing technology*. *Analyst* 135, 460–473.
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382:260–72.
- Junqueira L. C., Carneiro Jose, Capítulo 16: Órganos asociados al tracto digestivo, Texto y Atlas Histología Básica, (pp 279309), 12va edición, versión en portugues.
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004 Oct;22(10):1282–9.
- Keshan Balavandy, S., Li, F., Macdonald, N. P., Maya, F., Townsend, A. T., Frederick, K., ... Breadmore, M. C. (2021). Scalable 3D printing method for the manufacture of single-material fluidic devices with integrated filter for point of collection colourimetric analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1151, 238101. doi:10.1016/j.aca.2020.11.033
- Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, Baniyas MY, Al Suwaidi SKBM, AlKatheeri R, Alblooshi FMK, Almatrooshi MEAH, Alzaabi MEH, Al Darmaki RS, Lootah SNAH. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*. 2020 Jul 23;12(7):e9349. doi: 10.7759/cureus.9349. PMID: 32742886; PMCID: PMC7384703, recurso electronico: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7384703/>.
- Khetani S.R. and S. N. Bhatia, *Nat Biotechnol*, 2008, 26, 120-126.
- Kimura, H., Sakai, Y., & Fujii, T. (2018). Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33(1), 43–48. doi:10.1016/j.dmpk.2017.11.003
- Kogan M, Feng B, Norde'n B, Rocha S, Beke-Somfai T (2014) Shear-induced membrane fusion in viscous solutions. *Langmuir* 30:4875–4878. doi:10.1021/la404857r
- Korevaar JC, van Manen JG, Dekker FW, de Waart DR, Boeschoten EW, Krediet RT, et al. Effect of an increase in C-reactive protein level during a hemodialysis session on mortality. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2916–22.
- Krishna M. Anatomía microscópica del hígado. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2014 Jan 13;2(Suppl 5):109-112. Spanish. doi: 10.1002/cld.287. PMID: 31333838; PMCID: PMC6448680.
- Laffite G, Leroy C, Bonhomme C, Bonhomme-Courty L, Letavernier E, Daudon M, Frochet V, Haymann JP, Rouzie`re S, Lucas IT, Bazin D, Babonneau F, Abou-Hassan A (2016) Calcium oxalate precipitation by diffusion using laminar microfluidics: toward a biomimetic model of pathological microcalcifications. *Lab Chip* 16:115–116
- Lebedenko, C. G., & Banerjee, I. A. (2021). Enhancing Kidney Vasculature in Tissue Engineering—Current Trends and Approaches: A Review. *Biomimetics*, 6(2), 40. doi:10.3390/biomimetics6020040
- Lee S. A., d. Y. No, E. Kang, J. Ju, D. S. Kim and S. H. Lee, *Lab Chip*, 2013, 13, 3529-3537.
- Lee, S.W., Lee, S.S., 2008. Rotation effect in split and recombination micromixing. *Sens. Actuators B* 29, 364–371.
- Lefton HB, Rosa A, Cohen M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med Clin North Am*. 2009 Jul;93(4):787-99, vii. doi: 10.1016/j.mcna.2009.03.002. PMID: 19577114.
- Leung, C.M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K. et al. A guide to the organ-on-a-chip. *Nat Rev Methods Primers* 2, 33 (2022). <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>
- Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int*. 2007 Aug;72(3):247-59. doi: 10.1038/sj.ki.5002343. Epub 2007 Jun 13. PMID: 17568785.
- Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012;379:165–80.

Li AP, Lu C, Brent JA, Pham C, Fackett A, Ruegg CE, et al. Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug metabolizing activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drugdrug interaction potential. *Chem Biol Interact* 1999;121:17–35.

Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem*. 2011;44:1189–98.

Liu W, Xu S, Woda C, Kim P, Weinbaum S, Satlin LM (2003) Effect of flow and stretch on the $[Ca^{2+}]$ response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F998–F1012
Liu W, Murcia NS, Duan Y, Weinbaum S, Yoder BK, Schwiebert E, Satlin LM (2005) Mechanoregulation of intracellular Ca^{2+} concentration is attenuated in collecting duct of monociliumimpaired orpk mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F978–F988

Liu, Y., Deng, Y., Zhang, P., Liu, Z., Wu, Y., 2013. Experimental investigation of passive micromixers conceptual design using the layout optimization method. *J. Micromech. Microeng.* 23, 1–10.

Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* 2015;385:1975-82. doi: 10.1016/S0140- 6736(14)61601-9.

Ma C, Peng Y, Li H, Chen W. Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development. *Trends Pharmacol Sci*. 2021 Feb;42(2):119-133. doi: 10.1016/j.tips.2020.11.009. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33341248; PMCID: PMC7990030.

Monteduro AG, Rizzato S, Caragnano G, Trapani A, Giannelli G, Maruccio G. Organs-on-chips technologies - A guide from disease models to opportunities for drug development. *Biosens Bioelectron*. 2023 Jul 1;231:115271. doi: 10.1016/j.bios.2023.115271. Epub 2023 Mar 31. PMID: 37060819.

Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ, Naghavi M. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*. 2014 Apr 8;129(14):1483-92. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004042. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24573352; PMCID: PMC4181359.

Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int*. 2005;9:37–46.

Mozaffarian D, Benjamin E, Go A, et al., Heart disease and stroke statistics-2016 update. A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133:0.

Muthuchamy M. and D. Zawieja, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1131, 89-99.

Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res*. 2017 Apr;37(4):1547-1555.

Ostergaard L., A. Tietze, T. Nielsen, K. R. Drasbek, K. Mouridsen, S. N. Jespersen and M. R. Horsman, *Cancer research*, 2013, 73, 5618-5624.

Pahnke A., G. Conant, L.D. Huyer, Y. Zhao, N. Feric, M. Radisic, The role of Wnt regulation in heart development, cardiac repair and disease: A tissue engineering perspective, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473 (2016) 698-703.

Pepine CJ, Ischemic heart disease in women: facts and wishful thinking. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1727–1730.

Pereira R, Rocha S, Borges A, Nascimento H, Reis F, Miranda V, et al. Elastase release during the hemodialysis procedure seems to induce changes in red blood cell membrane proteins. *Hemodial Int*. 2011;15:429–31.

Perumal S. Srinivasan, K. Neef, P. Treskes, O.J. Liakopoulos, C. Stamm, D.B. Cowan, N. Madershahian, E. Kuhn, I. Slottosch, T. Wittwer, T. Wahlers, Y.-H. Choi, Enhanced gap junction expression in myoblast-containing engineered tissue, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422 (2012) 462-468.

Pinares-Astete, Franck, Meneses-Liendo, Víctor, Bonilla-Palacios, Juan, Ángeles-Tacchino, Pablo, & Cieza-Zevallos, Javier. (2018). Supervivencia a largo plazo en pacientes con enfermedad renal crónica estadio 5 tratada por hemodiálisis en Lima, Perú. *Acta Médica Peruana*, 35(1), 20-27

Piroddi M, Bartolini D, Cifollilli S, Galli F. Nondialyzable uremic toxins. *Blood Purif*. 2013;35:30–41

- Polacheck W. J., A. E. German, A. Mammoto, D. E. Ingber and R. D. Kamm, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111, 2447-2452.
- Prabhakaran D, Jeemon P, Sharma M, The changing patterns of cardiovascular diseases and their risk factors in the states of India: the Global Burden of Disease Study 1990-2016., et al. *Lancet Glob Health*. 2018;6:1339–1351.
- Radisic M., H. Park, S. Gerecht, C. Cannizzaro, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, Biomimetic approach to cardiac tissue engineering, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362 (2007) 1357-1368.
- Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, Davies PF (2003) Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1720–H1729. doi:10.1152/ajpheart.00344.2002
- Rojas-Acuña D, Polo-Samillan N, Vasquez-Chavesta AZ, Escalante-Arias C, Rios-Perez CJ, Toro-Huamanchumo CJ. Morbimortalidad asociada a la cirrosis hepática en Perú: un análisis ecológico para el período 2004-2016. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 25 de julio;19(15):9036. doi: 10.3390/ijerph19159036. PMID: 35897403; PMCID: PMC9332628, recurso electrónico: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9332628/#B1-ijerph-19-09036>.
- Roser M, Ritchie H. , Burden of Disease. Our World Data. [Mar;2020];<https://ourworldindata.org/burden-of-disease> 2016
- Rotenberg M. Y., E. Ruvinov, A. Armoza and S. Cohen, Lab on a chip, 2012, 12, 2696-2703.
- Roth GA, Johnson C, Abajobir A, et al., Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:1–25.
- Ruegg CE, Silber PM, Mughal RA, Ismail J, Lu C, Bode DC, et al. Cytochrome-P450 induction and conjugated metabolism in primary human hepatocytes after cryopreservation. *In Vitro Toxicol* 1997;10:217–22.
- Sampasa-Kanyinga H, Lewis RF, Frequent use of social networking sites is associated with poor psychological functioning among children and adolescents. *Cyberpsychology Behav Soc Netw*. 2015;18:380–385.
- Sateesh, J., Guha, K., Dutta, A., Sengupta, P., & Srinivasa Rao, K. (2018). Design and analysis of microfluidic kidney-on-chip model: fluid shear stress based study with temperature effect. *Microsystem Technologies*, 25(7), 2553–2560. doi:10.1007/s00542-018-4261-z
- Schepers, A., Li, C., Chhabra, A., Seney, B. T., & Bhatia, S. (2016). Engineering a perfusable 3D human liver platform from iPSC cells. *Lab on a Chip*, 16(14), 2644–2653. doi:10.1039/c6lc00598e
- Schlender M, Hernandez-Villafuerte K, Cheng CY, Mestre-Ferrandiz J, Baumann M. How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment. *Pharmacoeconomics*. 2021 Nov;39(11):1243-1269. doi: 10.1007/s40273-021-01065-y. Epub 2021 Aug 9. PMID: 34368939; PMCID: PMC8516790.
- Schwartz R.E., H. E. Fleming, S. R. Khetani and S. N. Bhatia, *Biotechnol Adv*, 2014, 32, 504-513.
- Sellgren K. L. , E. J. Butala, B. P. Gilmour, S. H. Randell and S. Grego, *Lab on a chip*, 2014, 14, 3349-3358.
- Shadrin I.Y., W. Yoon, L. Li, N. Shepherd, N. Bursac, Rapid fusion between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes yields electrically active, non-contractile hybrid cells, *Scientific reports*, 5 (2015).
- Sharei A, Zoldan J, Adamo A, Sim WY, Cho N, Jackson E, Mao S, Schneider S, Han MJ, Lytton-Jean A, Basto PA, Jhunjhunwala S, Lee J, Heller DA, Kang JW, Hartoularos GC, Kim KS, Anderson DG, Langer R, Jensen KF (2013) A vectorfree microfluidic platform for intracellular delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2082–2087. doi:10.1073/pnas.1218705110
- Shemesh, J.; Jalilian, I.; Shi, A.; Yeoh, G.H.; Tate, M.L.K.; Warkiani, M.E. Flow-induced stress on adherent cells in microfluidic devices. *Lab Chip* 2015, 15, 4114–4127.
- Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):374-84.
- Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:505–21.
- Stevens PE, Levin A, *Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline*. *Ann Intern Med*. 2013;158:825–30.

Stewart S, Murphy N, Walker A, McGuire A, McMurray J., The current cost of angina pectoris to the National Health Service in the UK. *Heart*. 2003;8:848–853.

Stratasys (2022, 7 de Noviembre), Proto 3000, Stratasys Object500 Connex3, https://proto3000.com/product/connex3/#product_overview

SUP706 (2022, 7 de noviembre), Stratasys, PACK OF 2, SUP706 B, SUPPORT, 1KG, dirección: <https://hub.stratasys.com/s/product/pack-of-2-sup706-b-support-1kg/01t0Y00000C89YS?language=es>

Suwanpayak N, Jalil MA, Aziz MS, Ismail FD, Ali J, Yupapin PP (2011) Blood clenar on-chip design for artificial human kidney manipulation. *Int J Nanomed* 6:957–964

Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014 May 17;383(9930):1749-61. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24480518.

Veroclear (2022, 7 de Noviembre), Stratasys, VeroClear transparencia rígida, dirección: <https://www.stratasys.com/es/materials/materials-catalog/polyjet-materials/veroclear/>

Virtanen M, Vahtera J, Singh-Manoux A, Elovainio M, Ferrie JE, Kivimäki M, Unfavorable and favorable changes in modifiable risk factors and incidence of coronary heart disease: the Whitehall II cohort study. *Int J Cardiol*. 2018;269:7–12.

Walsh Iii D. I., G. J. Sommer, U. Y. Schaff, P. S. Hahn, G. J. Jaffe and S. K. Murthy, *Lab on a chip*, 2014, 14, 2673-2680.

Wiksw J. P., E. L. Curtis, Z. E. Eagleton, B. C. Evans, A. Kole, L. H. Hofmeister and W. J. Matloff, *Lab Chip*, 2013, 13, 3496-3511.

Wouters, O. J., McKee, M., & Luyten, J. (2020). Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Xia Y and Whitesides GM (1998) Soft Lithography. *Angew Chem Int Ed Engl* 37 (5), 550–575.

Xiao Y., B. Zhang, H. Liu, J.W. Miklas, M. Gagliardi, A. Pahnke, N. Thavandiran, Y. Sun, C. Simmons, G. Keller, Microfabricated perfusable cardiac biowire: a platform that mimics native cardiac bundle, *Lab on a chip*, 14 (2014) 869-882.

Yang K., H.J. Park, S. Han, J. Lee, E. Ko, J. Kim, J.S. Lee, J.H. Yu, K.Y. Song, E. Cheong, S.R. Cho, S. Chung, S.W. Cho, Recapitulation of in vivo-like paracrine signals of human mesenchymal stem cells for functional neuronal differentiation of human neural stem cells in a 3D microfluidic system, *Biomaterials*, 63 (2015) 177-188.

Zamprogno, P., Thoma, G., Cencen, V., Ferrari, D., Putz, B., Michler, J., ... Guenat, O. T. (2021). *Mechanical Properties of Soft Biological Membranes for Organ-on-a-Chip Assessed by Bulge Test and AFM*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(7), 2990–2997. doi:10.1021/acsbmaterials.0c

Zhang, D., Luo, G., Ding, X., & Lu, C. (2012). Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(6), 549–561. doi:10.1016/j.apsb.2012.10.004

Zheng W, Wang Z, Zhang W, Jiang X (2010) A simple PDMS-based microfluidic channel design that removes bubbles for lonterm onchip culture of mammalian cells. *Lab Chip* 10:2906

Zuhriyah A., Muzzamil A., Astuti S.D. and Suhariningsih. Determination the Ischemic Stroke of Brain MRI Based On Apparent Diffusion Coefficient (ADC) with b Value Variation. 2020. doi: 10.1088/1742-6596/1505/1/012041