

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**Optimización y evaluación de una plataforma elástica de microtitulación
para aplicaciones en estudios toxicológicos con células adherentes**

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

Heillen Melisa Calderón Castillo

Asesor:

Fanny Lys Casado Peña

Lima, 2024

Informe de Similitud

Yo, **Fanny Lys Casado Peña**, docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesora de la tesis de investigación titulada “**Optimización y evaluación de una plataforma elástica de microtitulación para aplicaciones en estudios toxicológicos con células adherentes**”, de la autora **Heillen Melisa Calderón Castillo** dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 14%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 22/01/2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis, 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, 22 de enero del 2024

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

Dedicatoria

Dedicado a mis padres Nicolás y Eleana, por acompañarme a lo largo de este camino, a mi hermano Jesús, a Mechita, y Edu. Y, por último, a mis tres pequeños, Athos, Doghy y Oreo, por su compañía aún en la distancia.



Agradecimientos

Agradezco a mi asesora Fanny por su constante e incondicional apoyo; al Dr. Juan López Smith y Diego Sevilla del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear por haberme transferido los protocolos para el cultivo celular; a Marlon Morales, Etsel Suárez y Ana González del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada por su ayuda logística y camaradería.



Resumen

Se investigó la viabilidad de emplear una plataforma de microtitulación elástica elaborada en polidimetilsiloxano (PDMS) para su uso en estudios toxicológicos. Primero, se evaluó la compatibilidad del diseño propuesto en la solicitud de patente "Sistema de cultivo celular con componentes que generan excitaciones mecánicas" implementado en una silicona biocompatible, donde se encontraron varios puntos de mejora que fueron trabajados en aras de poder utilizarla en métodos estandarizados para ensayos farmacológicos o toxicológicos.

En la segunda parte de la investigación, se desarrollaron métodos para mejorar la hidrofiliidad de la superficie de PDMS, para ello se utilizó la modificación a través de la mezcla pre-polimerización con surfactantes y el recubrimiento con proteínas como colágeno y albúmina de suero bovino. A través de la medición del ángulo de contacto de agua, se estimó el incremento de hidrofiliidad, donde la mezcla con surfactantes no logró una diferencia significativa en el ángulo de contacto del material nativo de PDMS ($113.98^\circ \pm 0.70^\circ$); a diferencia del recubrimiento proteico con albúmina al 1 % que logró un ángulo de $56.08^\circ \pm 0.74^\circ$ igualando al control de poliestireno ($54.14^\circ \pm 2.24^\circ$).

Luego de establecer los protocolos de mejora de la plataforma elástica, se procedió a su evaluación biológica empleando la línea celular HeLa a través de los criterios de viabilidad, morfología y proliferación. La evaluación de la viabilidad celular, por 72 horas mostró que el recubrimiento con colágeno ($97.68\% \pm 1.42\%$) logró igualar al crecimiento logrado en la placa comercial de poliestireno con $98.98\% \pm 1.15\%$ y superar las viabilidades en los otros recubrimientos con albúmina. Si bien, el recubrimiento con colágeno tuvo resultados comparables al control de poliestireno en términos de viabilidad, las diferencias morfológicas fueron evidentes, desde la extensión de cada célula, hasta la formación de la monocapa del cultivo.

Se concluye que no basta mejorar propiedades del material, como la hidrofiliidad, sino que se debe explorar la interacción entre célula - sustrato desde un acercamiento bioquímico, ya que, como se ha demostrado, estas interacciones tienen un gran impacto en el desarrollo celular y en aplicaciones que involucran células adherentes



Índice general

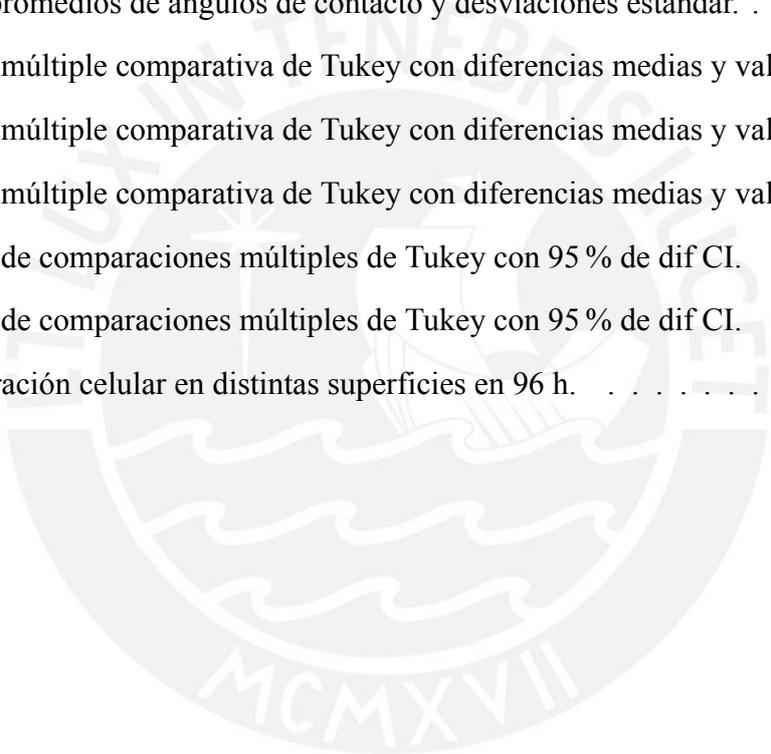
Resumen	iii
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo principal	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
1.2. Ingeniería de tejidos para la generación de modelos in vitro	4
1.3. Modelos in vitro como componentes biológicos	6
1.4. Líneas celulares inmortalizadas	8
1.4.1. Células HeLa	10
1.5. La matriz extracelular (MEC) como componente mecánico	11
1.6. Componentes bioquímicos	19
CAPÍTULO II	
EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA PLATAFORMA DE MICROTITULACIÓN ELÁSTICA	22
2.1. Plataformas de microtitulación	23
2.2. Desarrollo una plataforma de microtitulación elástica	25
2.2.1. Polidimetilsiloxano y sus características	26
2.2.2. Fabricación de la plataforma de PDMS	27
2.3. Modificación de la superficie de PDMS	31
2.4. Evaluación del ángulo de contacto	41
2.5. Métodos de evaluación de cultivos celulares para estudios farmacológicos	42

2.6. Elementos básicos para la fabricación y evaluación de un sistema de microtitulación elástica	44
2.7. Materiales y métodos	45
2.7.1. Evaluación de la plataforma inicial	52
2.8. Evaluación del crecimiento y proliferación de un cultivo celular de células adherentes	58
2.8.1. Morfología	58
2.8.2. Viabilidad	60
2.8.3. Proliferación	61
2.8.4. Optimización de diseño y proceso de fabricación	63
2.8.5. Nuevo protocolo de manufactura y esterilización de la plataforma elástica de microtitulación	66
2.8.6. Modificación de la hidrofobicidad	72
2.9. Evaluación del desarrollo de células adherentes (viabilidad, proliferación y morfología) en la plataforma optimizada	78
2.9.1. Evaluación visual: medio y morfología	81
2.9.2. Viabilidad y densidad celular	84
2.9.3. Proliferación celular	87
 CAPÍTULO III	
CONCLUSIONES	90
 BIBLIOGRAFÍA	92
 ANEXO A	
IMÁGENES DE DISEÑO DE PLATAFORMA	97

Índice de tablas

1.1. Principales líneas celulares y beneficios a la salud pública.[68]*Hasta 2019 . . .	9
1.2. Valores del módulo de Young de algunos materiales relevantes para los implantes y modelos biológicos	19
1.3. Factores claves de las condiciones del medio para el crecimiento de líneas celulares	20
2.1. Principales características del PDMS	28
2.2. Grado de rigidez de distintos tejidos humanos	29
2.3. Principales tipos de colágeno y sus funciones fisiológicas	37
2.4. Protocolos de esterilización del molde de PDMS, base y tapa de la plataforma .	46
2.5. Lista de verificación de compatibilidad con el microscopio invertido	47
2.6. Lista de verificación de compatibilidad con la incubadora	47
2.7. Lista de verificación de compatibilidad con la lectora de microplacas	47
2.8. Lista de verificación para evaluación del cultivo y su morfología	49
2.9. Evaluación de la compatibilidad con el microscopio invertido	55
2.10. Evaluación de la compatibilidad con la incubadora	56
2.11. Evaluación de la compatibilidad con la lectora de microplacas	57
2.12. Porcentaje de proliferación de la línea celular HeLa en superficie de PDMS y poliestireno por 96 horas	62
2.13. Concentraciones utilizadas para la mezcla de surfactantes con el pre-polímero de PDMS	65
2.14. Concentraciones y códigos para recubrimientos con proteína de superficies de PDMS	65

2.15. Protocolo de esterilización aplicado a cada pieza de la plataforma de microtitulación elástica	68
2.16. Evaluación de la compatibilidad de la plataforma modificada con el microscopio invertido	69
2.17. Evaluación de la compatibilidad de la plataforma elástica modificada con la incubadora	70
2.18. Evaluación de la compatibilidad de la plataforma elástica modificada con la lectora de microplacas	71
2.19. Datos promedios de ángulos de contacto y desviaciones estándar.	73
2.20. Prueba múltiple comparativa de Tukey con diferencias medias y valor P	74
2.20. Prueba múltiple comparativa de Tukey con diferencias medias y valor P	75
2.20. Prueba múltiple comparativa de Tukey con diferencias medias y valor P	76
2.21. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey con 95 % de dif CI.	86
2.22. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey con 95 % de dif CI.	86
2.23. Proliferación celular en distintas superficies en 96 h.	88



Índice de figuras

1.1. Componentes en ingeniería de tejidos. Creado en Biorender	5
1.2. Comparación entre células primarias e inmortalizadas en base a las características relevantes para el modelamiento biológico	7
1.3. Representación esquemática de las interacciones células – MEC en la membrana celular. Creado en BioRender.com	12
2.1. . Modificación de la superficie de Ps (a) Estructura química del poliestireno, (b) ejemplo de la funcionalización de la estructura química de poliestireno modificado para ingeniería de tejidos.	25
2.2. Modificación de la superficie de PDMS por tratamiento con plasma de oxígeno. Después de la oxidación, los grupos hidrofóbicos $-CH_3$ se reemplazan por los grupos silanol hidrofílicos (SiOH) y mejoran la humectabilidad. Modificado de [36].	33
2.3. Representación esquemática de la modificación de PDMS con colágeno I. Los grupos polares de colágeno I se unen covalentemente con la superficie de PDMS para autoensamblarse y proporcionar la plataforma para la unión celular. Modificado de [55]	38
2.4. Componentes en ingeniería de tejidos. Creado en Biorender	42
2.5. Factores a evaluar en la funcionalidad de la plataforma para el crecimiento celular. Creado en BioRender.com	48
2.6. Líneas de cuadrícula del hemocitómetro. Diagrama del hemocitómetro que indica (a) los cuatro conjuntos en rojo y (b) los 16 cuadrados dentro de uno de los conjuntos que deben usarse para contar. Recuperado de Stemcell Technologies (2023)	50

2.7. La reacción de las deshidrogenasas mitocondriales en contacto con el reactivo WST-1 dando lugar a la formación de formazán en la solución del medio de cultivo. Modificado de [96]	51
2.8. Resumen de la metodología del ensayo de proliferación con reactivo WST-1	52
2.9. Base de acero para la plataforma de microtitulación fabricada en PDMS.	53
2.10. Plataforma de microtitulación fabricada en PDMS en base de PMMA. Plataforma sin tapa, con surcos para flujo (a), plataforma con tapa (b).	53
2.11. Plataforma elástica con medio de cultivo situada en microscopio invertido.	53
2.12. Plataforma en microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss) a 5X. Se muestran distintas capas de la plataforma con medio de cultivo DMEM.	54
2.13. Vista en microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss) con medio de cultivo DMEM. 5X. Barra de escala 200 μm	54
2.14. Evaluación de la plataforma elástica en incubadora tras 72 horas de cultivo. Se observa el vapor formado en la tapa del sistema debido a la evaporación de medio de cultivo, se pueden visualizar gotas del vapor (en rojo) del medio en la tapa del sistema.	56
2.15. Evaluación de la compatibilidad de la lectora de microplacas DIAREader ELX800G (Dialab, Austria). (a) Vista superior de la base, (b) vista lateral en, en círculo rojo, parte de la plataforma incompatible con el equipo.	57
2.16. Morfología de la línea celular HeLa en placa de cultivo de poliestireno comercial para cultivo celular. Crecimiento de la línea celular de adenocarcinoma propagado en una plataforma PDMS, 0 horas (a), 24 horas (b), 36 horas (c), 48 horas (d), 60 horas (e) y 72 horas (f). Barra de escala: 100 μm . Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.	59
2.17. Cultivo línea celular HeLa en la plataforma de PDMS 0 h. Se observa que las células repelen el borde de PDMS. Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania) aumento 20X. Escala 50 μm	59

2.18. Morfología de la línea celular HeLa en PDMS. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 36 horas, (d) 48 horas, (e) 60 horas y (f) 72 horas. Barra de escala: 100 μm . Microscopio Invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X	60
2.19. Evaluación de viabilidad de la línea celular HeLa tras 72 horas de cultivo en la plataforma elástica de PDMS. ANOVA $p < 0.05$. Preparado con GraphPad Prism 9.5.1	61
2.20. Evaluación de la densidad de la línea celular HeLa tras 72 horas de cultivo en la plataforma elástica de PDMS. ANOVA $p > 0.05$. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1	61
2.21. Ensayo WST-1. Crecimiento HeLa en PDMS. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1	62
2.22. Métodos y reactivos utilizados para la modificación de la superficie de la plataforma de PDMS.	64
2.23. Metodología para la elaboración de la plataforma de PDMS. Creado en Bio-Render.com.	67
2.24. Vista de la plataforma d PDMS en microscopio invertido. (a) modelo inicial, (b) siguiendo las BPM. Aumento 10 X. Microscopio invertido (Zeiss, Alemania) cámara digital A1, AxioCam ERC 5s.	68
2.25. Plataforma de PDMS en la incubadora para cultivos Heracell™ VIOS 160i CO2 (Nuevo Hampshire, Estados Unidos).	69
2.26. Plataforma de microtitulación de 96 pocillos de PDMS: (a) Soporte/marco de la plataforma, (b) plataforma armada. Los planos del diseño se pueden encontrar en Anexo 1.	70
2.27. Compatibilidad de la plataforma con la lectora de microplacas. (a) Base inicial de la plataforma en la lectora de microplacas (se muestra incompatibilidad con la lectora), (b) nuevo diseño de base.	70
2.28. Valores de absorbancias obtenidos en la lectora de microplacas DIAREADER ELX800G (Dialab, Austria). $p > 0.05$. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1	71

2.29. Muestras de PDMS con surfactantes. (a) Mezcla recién realizada previa a desgasificación, (b) El cambio en la coloración se observa pasado 30 minutos de la mezcla inicial y se mantiene hasta el final del proceso de elaboración.	72
2.30. Fotografías tomadas para la evaluación del ángulo de contacto en las distintas superficies modificadas, Cámara digital Canon EOS 1300, EF-S 18-55 IS II.	73
2.31. Gráfico de barras con ángulos de contacto con D.E. de las superficies modificadas. (a) Poliestireno (Ps), (b) PDMS, (c) PDMS + colágeno (Co1), (d) PDMS + BSA 1 % (BSA1), (e) PDMS + BSA 10 % (BSA10), (f) Triton x – 100 -1 % (Tx1), (g) Triton x – 100 -2 % (Tx2), (h) Triton x – 100 -3 % (Tx3), (i) Pluronic 127-2 μ l (Pc2), (j) Pluronic 127-6 μ l (Pc6).	77
2.32. Procedimiento de evaluación de compatibilidad de la línea celular HeLa en distintas superficies de PDMS. Creado en BioRender.com	80
2.33. Crecimiento de la línea celular HeLa en poliestireno. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μ m. Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.	81
2.34. Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μ m. Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.	82
2.35. Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS + colágeno. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μ m. Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.	82
2.36. Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS + BSA 1 %. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μ m. Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.	83
2.37. Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS + BSA 10 %. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas.). Barra de escala: 200 μ m. Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10x.	84
2.38. Gráfico de barras relación superficie vs % de viabilidad. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1	85

2.39. Gráfico de barras relación superficie vs. densidad celular. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1	87
2.40. Ensayo de proliferación con WST-1 en plataformas elásticas de PDMS. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1.	88



Capítulo I

Introducción

El aislamiento de células y su cultivo, requiere combinar principios de ingeniería, bioquímica, biología, física y otras ramas, donde la supervivencia y desarrollo celular, ha sido y sigue siendo, el mayor desafío. Y a pesar, de aún no haber logrado con plenitud la regeneración de tejidos in vitro, se halló gran utilidad a estos cultivos celulares en los estudios toxicológicos, en especial en los ensayos preclínicos. Autores como [63] han realizado extensas revisiones en este tema, y como otros, han llegado a la conclusión que el desarrollo celular depende casi exclusivamente de la matriz extracelular, la cual no se basa tan solo en la selección del medio de cultivo, sino que es un conjunto equilibrado de condiciones mecánicas, bioquímicas y biológicas.

Es así como la ingeniería de tejidos se ha dedicado a desarrollar estructuras que puedan recrear condiciones, o al menos, intentar recrear espacios para reemplazar ambientes fisiológicos naturales que recapitulen las condiciones óptimas para el desarrollo y puedan permitir a las células formar tejidos nuevos funcionales. Como objetivo final las células deben contar con funciones adecuadas de adhesión, migración, proliferación y diferenciación, propias del tejido a imitar.

La construcción de un andamio, que es la región de la plataforma de cultivo en contacto con las células, implica establecer la matriz extracelular artificial. Solo si el entorno y el “cóctel” de factores bioquímicos resultan adecuados para el linaje celular se desarrollará un tejido funcional. A través de los años, diversos autores han diseñado y construido variedad de andamios, cada uno con diferencias claves acorde al tejido que buscan recrear. Entre ellos, [38], [8] y [70], dejan claro que la construcción de matrices apropiadas para el desarrollo de células funcionales requería de materiales resistentes y biocompatibles que además permitieran su maleabilidad.

Hace más de 10 años el polímero polidimetilsiloxano (PMDS) empezó a resonar, debido a sus únicas y atractivas características como transparencia óptica, resistencia térmica, maleabilidad y no toxicidad; que permitió a los investigadores diseñar nuevas plataformas, así como implementar diseños complejos en su topografía, además de poder acoplar elementos como bombas en sistemas similares a biorreactores. Sin embargo, este material también presenta grandes desafíos, tales como su hidrofobicidad y la dificultad en la estandarización tanto en su proceso de construcción como para su evaluación, ya que la mayoría de instrumentos utilizados para la evaluación de cultivos, como las lectoras de microplacas o microscopios invertidos están diseñados para las tradicionales placas de microtitulación hechas de poliestireno y no permiten la evaluación de estas nuevas plataformas. Por lo tanto, considerar una unión entre ambos elementos parece ser una idea apropiada.

Esta problemática fue tratada durante el desarrollo del proyecto N°52-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV “Plataforma avanzada para el estudio in vitro de parámetros toxicológicos de antibióticos de uso en pollos de engorde como alternativa humanitaria y de menor costo de los modelos in vivo” financiado por CONCYTEC, enfocado en la creación de una nueva plataforma que permitiera el cultivo de células epiteliales intestinales para su evaluación en estudios farmacológicos de toxicidad. Como se mencionó líneas arriba, un gran desafío de los nuevos diseños para mimetizar el ambiente in vivo, es la falta de herramientas para la evaluación de los conjuntos celulares, así como su estandarización para poder considerarlos, a través de normativa, como pruebas válidas.

[94] fue el encargado de diseñar esta plataforma elástica para microtitulación y el presente trabajo de investigación se enfocó en la evaluación de factores de mejora para la optimización del prototipo inicial y su posterior validación con una línea celular adherente de origen comercial. El presente trabajo de investigación hace una revisión general de los factores a considerar en la construcción de una matriz extracelular artificial, describe el proceso de la evaluación de la plataforma diseñada por [94]; para abarcar la optimización de su diseño para su posterior modificación, y, por último, la evaluación del crecimiento de una línea celular comercial en la plataforma optimizada.

A continuación, se enuncian los objetivos planteados para la presente tesis:

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo principal

Optimizar y evaluar una plataforma de microtitulación elástica para aplicaciones en estudios toxicológicos con células adherentes.

1.1.2. Objetivos específicos

- Optimizar una plataforma de microtitulación elástica en función de mayor transparencia y menor hidrofobicidad que permita su uso empleando técnicas estándar de evaluación de cultivos celulares.
- Evaluar la viabilidad, proliferación y morfología de las células adherentes cultivadas en la plataforma elástica optimizada.
- Realizar un análisis comparativo del crecimiento, viabilidad y morfología de células adherentes cultivadas entre la plataforma de cultivo modificada y la plataforma disponible comercialmente.

1.2. Ingeniería de tejidos para la generación de modelos in vitro

La ingeniería de tejidos aplica diversas técnicas provenientes de la física, química, ingeniería, biología, entre otros; con el objetivo de generar de tejidos funcionales. Esta rama de la bioingeniería tuvo su origen alrededor del año 1800 de la mano de Wilhelm Roux quien, a través del mantenimiento de embriones de pollo en solución salina, logró dar los primeros pasos hacia el desarrollo de cultivos celulares. Sin embargo, tuvieron que pasar más de 100 años para que Ross Granville, logre por primera vez un cultivo celular exitoso de células del sistema nervioso aisladas de rana, utilizando el método de la gota colgante [87].

Al ser las células los componentes fundamentales de los tejidos, y los tejidos conformar los órganos, quedó claro para los investigadores que lograr el desarrollo celular in vitro, tal como se daría in vivo era una parte crítica del éxito del cultivo de tejidos funcionales. Por lo tanto, en años posteriores, investigadores del área aunaron esfuerzos en el desarrollo de técnicas asépticas y desarrollo de medios de cultivos como Minimal Essential Medium (MEM) desarrollado por Harry Eagle y Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) desarrollado por Renato Dulbecco y G. Freeman, ambos publicados en 1959; además de la creación de “cócteles” bioquímicos con diversos factores de crecimiento y nutrientes que permitieron a las células aisladas desarrollarse en condiciones controladas [62].

En consecuencia, a las contribuciones de sus predecesores, en 1998 J. Thomson logró aislar células madre embrionarias, siendo este considerado como el último hito en el cultivo de tejidos [87]. Ya establecidas las nuevas bases del cultivo de células, y en consecuencia de la ingeniería de tejidos, investigadores de todo el mundo se dedicaron al aislamiento y generación de nuevas líneas celulares para estudios toxicológicos de distintos fármacos y materiales, además de la regeneración de tejidos. Sin embargo, pronto descubrieron que no todas las células aisladas se desarrollaban de la misma manera ante los mismos factores y aún, logrando una mezcla apropiadamente enriquecida para un desarrollo celular específico, las células no lograban desarrollarse, tal como lo harían en su ambiente natural [51].

En este punto el término “mecanotransducción” entra como un factor clave en la ingeniería de tejidos. La mecanotransducción puede explicarse como la habilidad de las células en percibir

fuerzas físicas, como la rigidez del sustrato, topografía, estimulación mecánica, entre otras; y luego traducirlas en respuestas biológicas [63]. Al reflexionar acerca de las condiciones a las que son expuestas las células de nuestros distintos tejidos u órganos, es fácil mencionar algunos estímulos mecánicos como cizallamiento (intestinos), flujos de aire (pulmones), fuerzas de torsión (músculos), entre otros. Pero la reflexión acerca de cuánto afectan estos estímulos el desarrollo de los distintos linajes celulares, no había sido abordado apropiadamente y, tal como se mencionó líneas atrás, resultó que las características mecánicas de la matriz extracelular, son cruciales para el desarrollo celular [57].

Lograr un óptimo desarrollo celular requiere de un delicado equilibrio entre los componentes bioquímicos, biológicos y mecánicos (Fig. 1.1). Esta sinergia de elementos es la responsable de enviar las señales adecuadas a las células para permitir su desarrollo; en este punto se debe agregar que estas tres características no son excluyentes, si no complementarias. Si bien la matriz extracelular (MEC) se puede considerar como el elemento mecánico de nuestro sistema in vitro, en un sistema nativo la MEC puede agrupar tanto características bioquímicas como mecánicas que impactarán en el desarrollo celular.

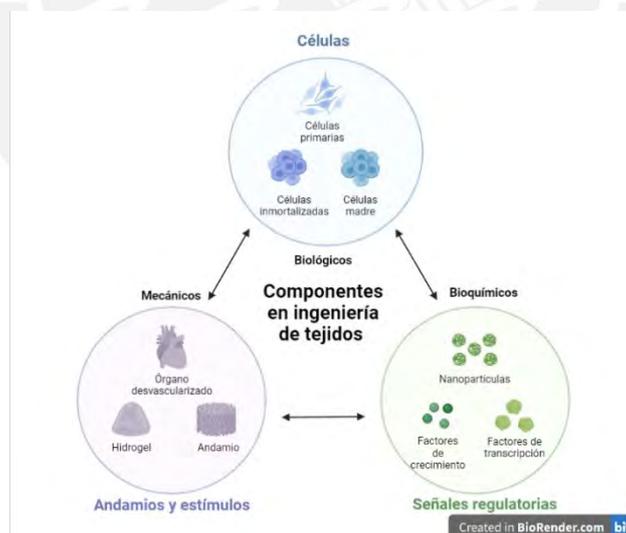


Figura 1.1: Componentes en ingeniería de tejidos. Creado en Biorender

1.3. Modelos in vitro como componentes biológicos

La célula es el factor más importante en el diseño de una matriz extracelular artificial, ya que, de su desarrollo, proliferación y diferenciación, depende la generación del tejido funcional objetivo. Si bien, la idea de tomar una muestra de tejido, añadir algunos pasos para su aislamiento (ya sea a través de métodos enzimáticos o mecánicos) y colocarlos en un medio de cultivo favorable para su crecimiento, parece algo sencillo y viable; en realidad, este proceso llamado aislamiento de células primarias, no solo resulta en extremo complicado, sino que también presenta una alta tasa de muerte celular, debido a las condiciones a las que son sometidas las células durante su aislamiento y aún si las células logran sobrevivir a este proceso, su periodo de vida resulta bastante limitado [63].

No es de extrañar que los investigadores pasaban más tiempo intentando mantener a las células con vida que experimentando con ellas. Es así como, la introducción de líneas celulares inmortalizadas marcó un antes y después en la historia. Este grupo celular ha formado parte de grandes logros, como la obtención de la vacuna de la polio, estudios sobre cáncer, estudios sobre radiación e incluso fueron enviadas al espacio para estudiar su comportamiento [18].

Además, la caracterización de cientos de líneas celulares con tecnologías ómicas, es decir, genómica, transcriptómica y proteómica, permitió reforzar el concepto de la utilidad de la línea celular en la investigación médica. De hecho, la mayoría de las líneas celulares aisladas a partir de células cancerígenas, se han secuenciado, publicado y puesto a disposición a través de conjuntos de datos en línea, lo que permitió explorar alteraciones moleculares y celulares detalladas, como mutaciones, variaciones en el número de copias y perfiles de expresión de genes y proteínas [11]. De esta forma, se ha mejorado significativamente el proceso de selección de los sistemas modelo más apropiado para fines experimentales. En este contexto, no se debe olvidar la obligación de cada investigador en el uso correcto de las líneas celulares continuas, siguiendo las pautas adecuadas. De hecho, en el pasado, la calidad y la reproducibilidad de los datos de investigación podrían verse comprometidas irremediablemente si se utilizaban líneas celulares con contaminación cruzada o mal identificadas o cuando los cultivos estuvieran contaminados con micoplasma [16, 68].

En la actualidad, se cuenta con la disponibilidad de una amplia gama de modelos celulares in

in vitro con características que los hacen de especial interés para fines específicos. Las células recién aisladas y los cultivos primarios son la mejor opción cuando se deben conservar los aspectos del tejido/órgano de origen y el cariotipo debe ser normal. Sin embargo, este tipo de cultivo no es de larga duración, con periodos de vida que van desde unas pocas horas hasta una o dos semanas, y también son incompatibles con la estandarización. Por otro lado, se cuentan con líneas celulares finitas, las cuales no suelen conservar todas sus características in vivo, y tal como insinúa su nombre, tienen una vida útil limitada: pueden durar algunos meses o incluso años, pero, después de un cierto número de pasajes, se vuelven senescentes y mueren [64].

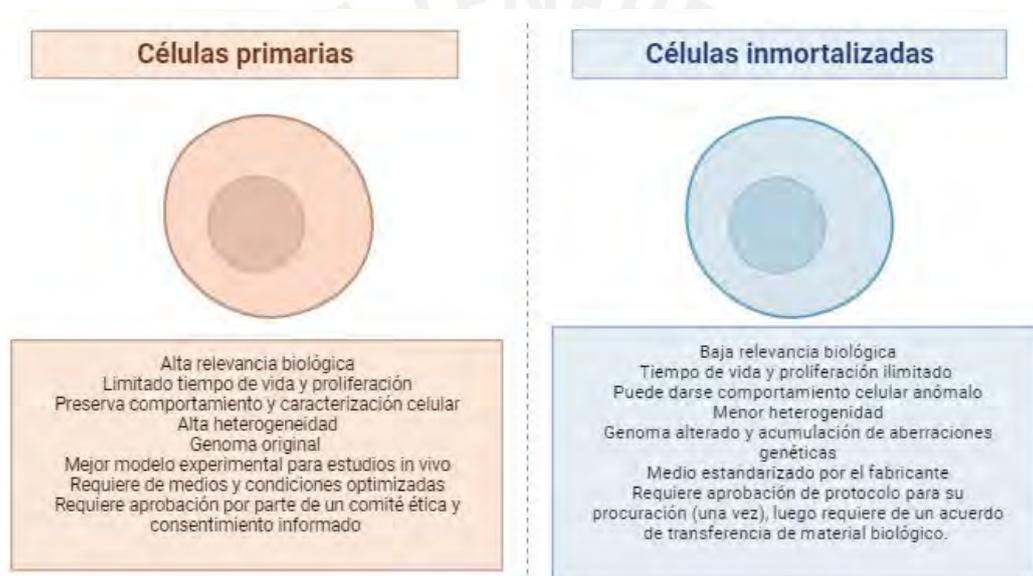


Figura 1.2: Comparación entre células primarias e inmortalizadas en base a las características relevantes para el modelamiento biológico

Por último, las líneas celulares continuas, también llamadas inmortales, son células transformadas o de origen tumoral, por lo que presentan grandes diferencias en comparación a las células nativas. La gran ventaja de este último grupo celular, es la posibilidad de la estandarización de los experimentos que garantizan una alta reproducibilidad.

Se debe tener en consideración que, si bien estas líneas celulares han logrado proporcionar un conocimiento instrumental, su mayor debilidad es quizás justo aquello que les da su tan apreciada inmortalidad, su origen cancerígeno, que les confiere grandes variaciones en términos de estado de diferenciación, metabolismo y proliferación [64, 74, 81]. En la Fig. 1.2, se realiza

una comparación de las ventajas y desventajas de las células primarias y las líneas celulares inmortalizadas.

1.4. Líneas celulares inmortalizadas

El interés en los modelos celulares in vitro se debe a que, la célula representa la unidad elemental de vida y, al menos teóricamente, se pueden cultivar células de cualquier especie y tejido, incluidos los de origen humano, pasando por alto la mayoría, si no todos, los problemas éticos relacionados con la experimentación humana.

Sin embargo, los cultivos in vitro de líneas celulares consisten en sistemas muy simplificados con respecto a la complejidad de todo el organismo que intentan representar, por lo que su aplicación se reduce a ciertos estudios o investigación de mecanismos muy específicos. Algunas ventajas y desventajas del uso de líneas celulares como modelos para evaluación toxicológica se describen a continuación:

- **Ventajas:**

Los mecanismos celulares y moleculares se exploran fácilmente.

Es posible la identificación detallada y temprana del daño celular.

Pueden usarse células humanas.

La reversibilidad del efecto es fácilmente comprobable.

El sistema es simple y altamente reproducible.

No se presentan dificultades debido a las pequeñas cantidades de sustancias.

Es posible realizar un número estadísticamente significativo de ensayos.

La tecnología es relativamente fácil y con potencial de automatización.

Los sistemas in vitro son menos costosos y consumen menos tiempo que los in vivo.

Permite reducir el número de experimentos con animales de investigación.

- **Desventajas:**

El sistema está demasiado simplificado en comparación con la complejidad del organismo.

No se pueden estudiar los efectos y respuestas tóxicos sistémicos.

En cada ensayo se pueden estudiar muy pocos mecanismos tóxicos.

Permite realizar pruebas de toxicidad aguda más que crónica.

Las concentraciones de sustancias con relevancia clínica son difíciles de elegir.

Debido a las propiedades fisicoquímicas de las sustancias de prueba, las condiciones de exposición pueden no ser reproducibles.

Dificultades para correlacionar la situación in vitro con la in vivo tanto en términos de diseño experimental como de resultados.

Hoy en día, los estudios in vitro del comportamiento celular son un requisito previo para modelar respuestas in vivo a agentes farmacológicos, terapias celulares, biomateriales y dispositivos implantables. Sin embargo, aberraciones genéticas de las líneas celulares inmortalizadas se acumulan con cada paso, lo que limita su utilidad y afecta la visión general final. Por lo tanto, la relevancia traslacional de las líneas celulares a menudo se cuestiona, ya que se considera que no son representativos del tejido original en términos de epigenética celular y perfiles de expresión génica.

A pesar de las diversas limitaciones del uso de líneas celulares, estas han tenido un papel clave en el progreso de la salud pública dando lugar a múltiples beneficios como el desarrollo de terapias, vacunas y tratamientos oncológicos. Además, han permitido la comparación entre investigaciones, dando la oportunidad de utilizar la misma línea celular en diferentes lugares del mundo. En la Tabla 1.1, se describen algunos de los principales logros del uso de líneas celulares inmortalizadas.

Tabla 1.1: Principales líneas celulares y beneficios a la salud pública.[68]*Hasta 2019

Línea celular	Año de establecimiento	Nº de publicaciones en el campo*	Beneficios a la salud pública
HeLa	1953	16 843	Vacuna contra el polio
RAJI	1964	1557	Def. mecanismos de infección por el virus Epstein-Barr
K562	1976	8001	Protocolos para el tratamiento de leucemia mieloide crónica
NB4	1991	1227	Protocolos para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda

El tipo de célula seleccionada para el cultivo y su exposición a distintas condiciones tiene un alto impacto en la adhesión, la proliferación y la viabilidad del cultivo. Autores [77] probaron que algunas células provenientes de carcinomas no requieren de un microambiente altamente específico para su proliferación, sino que cuentan con la capacidad de adherirse a otras células y a la matriz extracelular (MEC), estas se conocen como comunicaciones célula-célula y célula-MEC. Por lo tanto, alteraciones en estas interacciones, acarrearán consecuencias en las propiedades y características de las células, y que también se verán influenciadas por su origen tisular, morfología y estado patológico.

Por otro lado, el cultivo de distintos tipos de células en la misma superficie de cultivo podría dar como resultado una tasa de crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y viabilidad diferentes.

1.4.1. Células HeLa

Las células HeLa fueron la primera línea celular inmortal cultivada in vitro en el año 1951. Fueron aisladas de Henrietta Lacks, de ahí el origen del acrónimo HeLa, una mujer afroamericana con carcinoma cervical de quien se extrajo una muestra, por parte del Dr. George Otto Gey del Hospital Johns Hopkins de Baltimore. En este caso, es necesario mencionar que aún existe un debate si Henrieta otorgó su consentimiento para el uso de sus células en las investigaciones del Dr. Gey, teniendo en consideración que se trataba de una persona de raza negra con una enfermedad terminal, motivo por el cual muchos investigadores acusan de ser un acto poco ético seguir usando las células de Henrieta, por la manera en que fueron obtenidas y porque ni ella ni su familia gozaron de los beneficios y millones de dólares facturados por diversas compañías desde su aislamiento [28, 104]

Dejando el debate ético de lado, la realidad es que el aislamiento de las células HeLa cambiaron el mundo, gracias a los increíbles avances que permitió como la vacuna del polio, vacuna contra el VPH, mejora en las prácticas de cultivo celular, recuento de cromosomas, mapeo del genoma, entre otros [28]. Lo que hizo a estas células tan especiales es justamente su inmortalidad, debido a los graves males que aquejaban a Henrietta sus células mutaron a tal punto de tener 70-90 cromosomas (las células humanas somáticas saludables presentan 46 cromosomas),

ser extremadamente resistentes a distintos medios, buena adherencia y ciclos indeterminados de replicación [68].

Desde el punto de vista farmacológico y de ingeniería de tejidos, proporcionó por primera vez un modelo estándar para evitar diferencias entre donantes y permitiendo la reproducibilidad de los datos experimentales, así como la renovación del material biológico original, resultando de gran utilidad en el desarrollo de nuevos materiales y fármacos.

Los sistemas de cultivo celular tienen diferentes áreas de aplicación en el campo biomédico según el objetivo del estudio, pueden ser utilizadas para evaluar sustancias químicas (pruebas de toxicidad), para investigar un mecanismo de acción particular, evaluación de nuevos materiales y en la recreación o regeneración de tejidos [11]. La selección del material biológico a utilizar, dependerá esencialmente de qué se quiere lograr en la investigación desarrollada.

1.5. La matriz extracelular (MEC) como componente mecánico

El componente mecánico en un cultivo *in vitro* busca representar a la estructura de la matriz extracelular (MEC), que en realidad es la agrupación de componentes bioquímicos y mecánicos; es decir, en un ambiente nativo, es el conjunto de proteínas multifuncionales y polisacáridos altamente organizados, donde crecerá el conjunto celular anclado. A través de esta MEC las células son capaces de recolectar información de las características de su ambiente físico y químico [27]. Estos parámetros físicos y químicos también influyen en el destino de las células al crear señales direccionales que pueden definir su proliferación, migración y diferenciación, a través de la reproducción del nicho natural de cada célula [63, 92].

La composición de la MEC variará según su origen biológico, pero suele estar compuesta por colágeno, proteoglicanos, fibronectina (FN), laminina y otras glicoproteínas. En un ambiente nativo, las células son las responsables de desarrollar su propia matriz, para ello se basan en el micro y nano-ambiente que las rodea. Cabe agregar que, la composición de la MEC, afecta de manera directa o indirecta el comportamiento celular; por lo tanto, alterar su composición puede controlar la bioquímica específica celular e incluso puede controlar la adhesión celular

[92]. En un medio nativo, la MEC no es estática, por el contrario, se encuentra en constante remodelación a medida que las células la acumulan, la vuelven a ensamblar o la degradan, estos procesos se basan en el ensamblaje de integrinas en la membrana celular. Si bien, la jerarquía del ensamblaje de la MEC aún no se comprende por completo, se sabe que las integrinas celulares intervienen en el proceso y son esenciales para su formación.

Las integrinas son receptores de proteínas transmembrana entre la MEC y el citoesqueleto de actina (Fig. 1.3). Están compuestas por dos subunidades α y β ; se conocen 18 subunidades α y 8 subunidades β con 24 combinaciones registradas. Cada combinación α - β tiene su propia especificidad de unión y es capaz de enviar señales a través de la membrana celular en cualquier dirección [36].

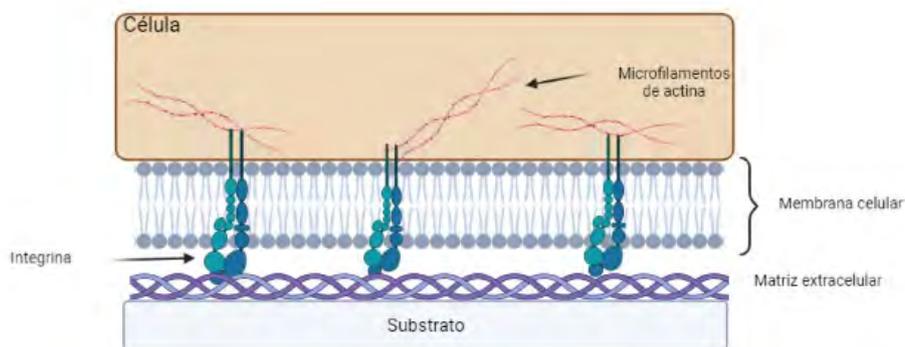


Figura 1.3: Representación esquemática de las interacciones célula – MEC en la membrana celular. Creado en BioRender.com

Las señales pueden darse de dos maneras: (i) la célula puede enviar señales a través de las integrinas para que se unan a la MEC: señalización de adentro hacia afuera o (ii) los cambios en la MEC o el entorno circundante pueden enviarse señales químicas a la célula: señalización de afuera hacia adentro. Fuera de la membrana, las integrinas son capaces de reconocer ciertas

secuencias de aminoácidos de proteínas MEC individuales y unirse a ellas. Una de las secuencias con mayor frecuencia unidas por integrinas es Arg-Gly-Asp (RGD) y se encuentra en FN y colágeno [17].

La unión de las integrinas a la MEC provoca una cascada de señalización y respuesta celular que incluye actividad de quinasa citoplasmática, factores de crecimiento, canales iónicos y reordenamiento del citoesqueleto. A medida que las integrinas se unen a la MEC, se agrupan en la membrana celular y estimulan el ensamblaje de los filamentos de actina. Una vez que las integrinas entran en contacto con la MEC, las células extenderán proyecciones de filopodios desde el borde de ataque de la célula (lamelópodos) para detectar el entorno circundante y continuar propagándose. Las integrinas en la punta de los filopodios se agruparán e iniciarán la formación de puntos focales de adhesión y fibras de estrés de actina.

Los puntos focales de adhesión se encuentran en los extremos de los filamentos de actina prominentes (fibras de tensión); mientras que los filamentos de actina del citoesqueleto están formados por polímeros helicoidales de dos cadenas de la proteína actina que se unen a las integrinas. El citoesqueleto de actina determina la forma de la célula y es necesario para el movimiento celular [7].

El vínculo entre las integrinas y el citoesqueleto de actina es fuerte, las alteraciones en el sistema pueden desencadenar una gran variedad de eventos de transducción de señales que incluyen morfología, motilidad, expresión génica y diferenciación. La señalización de adentro hacia afuera de las integrinas también ocurre con cambios en el citoesqueleto. El reordenamiento del citoesqueleto de actina puede señalar el reordenamiento de las integrinas y aumentar o disminuir su capacidad para unirse a la MEC. Por tanto, los cambios en el entorno ambiental de una célula invocan cambios en la organización del citoesqueleto, así como la organización de las moléculas adhesivas en la célula, como la integrina [17, 22].

La adhesión es la primera respuesta que logra una célula al entrar en contacto con una superficie. La célula hace contacto con la MEC a través de puntos de adhesión focales que tienen un área de unas pocas micras cuadradas y están ubicados en la periferia de la célula. Estos puntos unen fuertemente la célula al sustrato mediante el anclaje de los filamentos de actina con una placa compuesta por proteínas como la vinculina [5]. La formación de fibras de estrés de actina

es indicativa de una célula cultivada en un entorno plano, donde la célula es capaz de expandirse y crecer en grandes cantidades, poniendo tensión en la membrana celular. La tensión inicia adherencias focales para mantener las células grandes adheridas a la superficie y las fibras de actina ayudan a anclar la célula al entorno 2-D.

Las interacciones no específicas de la célula con el sustrato también alteran el comportamiento celular, estas interacciones se conocen como adhesión celular pasiva e incluyen fuerzas electrodinámicas, estéricas, hidrofóbicas y de van der Waals entre la membrana celular y la superficie del material. Estas interacciones no requieren el reconocimiento de las proteínas de la membrana celular. Una vez que las células han entrado en contacto con una superficie a través de la adhesión pasiva, alteran constantemente su membrana celular para estabilizar la interfaz célula-material mediante la adhesión activa [36].

El componente mecánico de las células en su estado fisiológico es conocido como la MEC; mientras que en los cultivos in vitro su análogo corresponde al andamio. La MEC actúa como un soporte de células, permite la recepción y repetición de distintas moléculas de señalización que dan origen a cadenas de respuestas a su interacción con el entorno celular y determina tanto el desarrollo como la organización de los tejidos [45, 83].

Las señales bioquímicas provienen del medio de cultivo y los suplementos utilizados, sin embargo, las células también son receptoras de señales provenientes de estímulos mecánicos, este fenómeno recibe el nombre de mecanotransducción, y resulta esencial en el desarrollo de tejidos funcionales [63].

Se puede definir la mecanotransducción como el fenómeno a través del cual las células perciben las fuerzas físicas y luego las traducen en respuestas biológicas. Para lograr que las células reciban la estimulación mecánica característica de su ambiente natural, investigadores como [47, 48, 63], entre otros, propusieron el diseño y construcción de nuevas matrices extracelulares artificiales con la capacidad de simular ciertos estímulos mecánicos en la superficie celular. En otras palabras, plantearon el uso de sustratos de cultivo que imiten las condiciones de la MEC nativa para estimular el desarrollo de las células. Incluso, consideraron que la inclusión de ciertos patrones podría guiar a las células a un linaje distinto.

Las dimensiones del rasgo topográfico son otra característica importante del sustrato de cultivo.

Por ejemplo, se ha demostrado que las topografías con una dimensión de microescala estimulan la formación y diferenciación del citoesqueleto; por otro lado, se sabe que los patrones con una dimensión a nanoescala generan redes interactivas interconectadas célula-célula [92].

Diversos modelos de plataformas han sido desarrollados a través de los años, partiendo del modelo más simple, las plataformas 2D. Los cultivos en monocapa resultan de fácil evaluación, en especial si se considera que la mayoría de técnicas para visualización y manipulación de cultivos celulares han sido diseñadas para estos cultivos [72]. A pesar de sus numerosas ventajas la mayoría de cultivos 2D suelen tener baja capacidad para la autorenovación de células madre y diferenciación celular [63]. Por otro lado, el cultivo celular en monocapa es el mejor para la prueba de citotoxicidad de líneas celulares y la quimiosensibilidad de varios materiales [27].

Para la fabricación de nuevas plataformas se recurrieron a nuevos procesos tales como los de microfabricación y micromoldeado, donde se fabrica un molde maestro para el andamio de biomaterial utilizando fotolitografía, microfresado, ablación láser o impresión 3D. Usando estos moldes maestros, generalmente se funde un molde más flexible de alguna silicona para la reproducción de patrones de crecimiento más complejos, en especial al trabajar con células primarias [72, 81].

Este nuevo enfoque en el desarrollo de plataformas de materiales con mayor maleabilidad, como las siliconas, se basa en varias ventajas tales como: bajo costo, disponibilidad, durabilidad, transparencia óptica, biocompatibilidad, integración simple de componentes (como interconexiones, tuberías y accesorios), la flexibilidad de diseño para una amplia gama de aplicaciones y sus propiedades químicas y físicas. Características que han sido explotadas en los últimos años en el desarrollo de sistemas de microfluidos, donde el vidrio, la silicona o el polímero han sido utilizados individualmente o combinados con otros materiales para su producción con resultados alentadores [25].

Algunos puntos clave en la selección de materiales para el desarrollo de una plataforma de cultivo celular se basan en el precio, disponibilidad y biocompatibilidad. Los materiales comunes incluyen poliestireno (PS), vidrio, acrilamida, polidimetilsiloxano (PDMS) y películas metálicas. Por otro lado, algunas características a considerar al diseñar una plataforma para el cultivo celular son: topografía de la superficie (complejidad 2D – 3D), química de la superficie, hu-

mectabilidad y propiedades mecánicas del material. Las cuales se describirán a continuación:

- Topografía de la superficie

El diseño de características superficiales para imitar un entorno biológico nativo fue propuesto durante el siglo pasado. El primer estudio registrado de cultivo de células en 3-D fue realizado por Ross Harrison en 1907 mientras investigaba el crecimiento de la fibra nerviosa [61]. Harrison implantó embriones de rana en una linfa de rana coagulada e invirtió el sistema para crear un cultivo de gotas colgantes creando uno de los primeros sistemas 3-D para el cultivo celular. Hoy en día, se utiliza una gran variedad de técnicas para alterar la arquitectura de la superficie y así poder controlar o alterar el comportamiento celular. Las técnicas más utilizadas son la litografía por haz de electrones y la fotolitografía para generar entornos no planos para el cultivo celular. Estas técnicas se pueden utilizar para fabricar estructuras orientadas al azar o topografías más ordenadas; en aras de controlar los eventos de señalización celular e incluso crear condiciones de cultivo celular similares a un entorno celular nativo [54].

La estructura de la superficie es imprescindible para la función biológica, tal como se denota en la variedad de formas y tamaños que se observan en los tejidos de los organismos vivos. La comprensión de la amplia gama de texturas superficiales en los organismos vivos conducirá al desarrollo de características superficiales artificiales para que los biomateriales imiten mejor los entornos nativos.

- Química de la superficie

Retomando la idea de que la MEC no es únicamente un componente físico, se debe considerar la química de la superficie, es decir el material con el que está elaborado y la manera en que interactuará con el cultivo. Las moléculas unidas a la superficie de la plataforma son una forma de nanotecnología, ya que forman películas o capas de 1 a 10 nm en una superficie con la capacidad de organizarse y modelarse. Los átomos y las moléculas en la superficie experimentan un entorno diferente al del resto y exhiben energía libre, movilidad y estructura diferentes [42].

Aunque las propiedades de los materiales como la dureza y la plasticidad, no se ven alteradas por la química de la superficie, las propiedades a granel han desempeñado un

papel importante en el diseño de materiales y sustratos biológicos. La química de la superficie puede definir las áreas adhesivas y no adhesivas de las células, además afecta indirectamente el comportamiento celular al alterar la deposición de proteínas e induce cambios en factores que controlan la señalización celular y el destino celular y por ende, la morfología, alineación y el patrón de las células [36].

- Humectabilidad de la superficie

La humectabilidad de la superficie relacionada con la hidrofobicidad y la hidrofiliidad, es un factor destacado en muchas interacciones célula-sustrato, ya que todos los sistemas biológicos están basados en agua.

Esta propiedad se determina midiendo el ángulo de contacto de microlitros de gotas de agua en la superficie a evaluar. Diversos autores [49, 90]; han documentado que cada tipo celular puede presentar distintas preferencias en cuando a la hidrofobicidad o hidrofiliidad de los andamios en los cuáles crecerán. Como ejemplo, las células HeLa tienen una mayor adherencia en superficies con un ángulo de contacto de 50° , pero las células endoteliales de la vena umbilical humana prefieren superficies con un ángulo de contacto de 40° [15, 36]. No solo las propiedades químicas influyen en la humectabilidad de la superficie, sino que las propiedades topográficas de la superficie también juegan un rol importante en esta característica. Resulta en extremo complicado cuantificar el comportamiento celular basándose únicamente en la química de la superficie o la topografía, por lo tanto, se asume que ambos tienen responsabilidad en el comportamiento celular y la adsorción de proteínas [15, 20].

La humectabilidad de la superficie también establece la energía libre de la superficie. Cuando se forma una superficie hay rupturas de los enlaces intermoleculares y la superficie se vuelve menos favorable, desde el punto de vista energético, en comparación a la mayor parte del material. En otras palabras, se puede definir la energía libre de la superficie como el exceso de energía de la superficie en comparación con el volumen. La cantidad de energía libre en una superficie depende de varios factores, como el material, la química, la temperatura y el material de interfaz.

La energía libre de la superficie se puede cuantificar mediante el análisis de la capacidad

de un líquido para esparcirse o no sobre la superficie. El método más fácil para calcular la energía libre superficial es examinar los ángulos de contacto de diferentes líquidos (polares y no polares) en la superficie.

- Propiedades del material a granel

Las propiedades del material a granel y su efecto sobre el cultivo celular se estudian en el campo de la mecanobiología. Algunas de las características más importantes a buscar en los materiales que pueden alterar el comportamiento celular son: transparencia óptica, conductividad eléctrica, biocompatibilidad y flexibilidad. Al replicar o intentar imitar una región de un organismo vivo, se deben tener en cuenta las propiedades de los materiales y las propiedades del sistema nativo [67]. Por ejemplo, el tejido cerebral y la grasa son mucho más suaves y maleables en comparación con los músculos o los huesos. Incluso fuera de un entorno nativo, algunos linajes celulares se pueden cultivar y proliferar en una amplia variedad de materiales, pero es posible que su comportamiento *in vitro* observado no represente a las células *in vivo*.

Una de las propiedades claves es la elasticidad, también llamada rigidez de un material; la cual se cuantifica por el módulo elástico o de Young (E) del material y es igual a la tensión aplicada a un material dividido por la deformación como se describe en la Ecuación 1.1. La deformación de un material (ΔL) se puede dividir por la longitud en reposo del material (L) para obtener la deformación (ϵ) y la tensión aplicada al material (σ) se define como la fuerza aplicada (F) dividida por el área de la sección transversal (A). La porción lineal de una curva de tensión-deformación define el módulo de Young.

$$E = \frac{\text{tension}}{\text{deformacion}} = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L} = \frac{Fx \Delta L}{AxL} \quad (1.1)$$

Las células perciben la rigidez de los sustratos y el módulo de Young del mismo modo que pueden percibir la química y la arquitectura de la superficie. Ciertos tipos de células prefieren materiales más rígidos o más blandos, ese factor dependerá de su origen y estado de diferenciación. Por ejemplo, algunas células como los osteoblastos, crecerán de forma natural en un entorno más duro, a diferencia de las células del músculo esquelético, los mioblastos, que preferirán entornos más blandos. En la Tabla 1.2, se describen los

Tabla 1.2: Valores del módulo de Young de algunos materiales relevantes para los implantes y modelos biológicos

Material	Modulo de Young, E (GPa)
Acero	212.0
Titanium	115.7
Vidrio de sílice	72.4
Ácido poliláctico	3.5 - 10.0
Poliestireno	~3.5
PDMS	2.6×10^{-3}
Gel de colágeno	1.5×10^{-6}

módulos de Young de diversos materiales comúnmente utilizados para el cultivo celular. La rigidez del material no solo afecta a la célula, sino que las mismas células afectan al material. Investigadores [33] demostraron que las células poseen la capacidad de deformar un material más blando e incluso pueden producir suficiente fuerza para doblar ciertos objetos; hecho que solo confirma la importancia de las propiedades mecánicas de los materiales en el desarrollo celular.

Al trabajar con polímeros se cuenta con una gran ventaja que es la de mayor control en el módulo de Young. Este material otorga a los investigadores la facultad de aumentar la densidad de reticulación o disminuir la densidad de reticulación durante la síntesis del polímero y poder seleccionar la posibilidad de seleccionar la rigidez del polímero, según el objetivo de la investigación. Estos cambios afectan la química de la superficie inmediata que interactúa con la célula y las alteraciones observadas en el comportamiento de la célula no pueden vincularse completamente con los cambios en la rigidez del sustrato. Sin embargo, ofrece nuevas posibilidades en el diseño de plataformas que emulen las condiciones in vivo.

1.6. Componentes bioquímicos

Al igual que en microbiología, donde cada microorganismo requiere de medios y condiciones específicas para su desarrollo; las células también requieren de medios y condiciones de cultivo especiales, siendo estas últimas más sensibles y de mayor cuidado al trabajar.

Tabla 1.3: Factores claves de las condiciones del medio para el crecimiento de líneas celulares

Componente	Descripción
Suero	Contiene factores de crecimiento y adhesión, hormonas, lípidos y minerales para el cultivo de células en medios basales. Regula la permeabilidad de la membrana celular y sirve como portador de lípidos, enzimas, micronutrientes y oligoelementos en la célula. Tiene un costo elevado, por lo que su uso debe ser evaluado. Presenta problemas de estandarización, especificidad, variabilidad y efectos no deseados, como sobreestimulación o inhibición de crecimiento y la función celular.
pH	La mayoría de las líneas celulares de mamíferos normales crecen bien a pH 7.4 y hay muy poca variabilidad entre las diferentes cepas celulares. El medio de crecimiento amortigua el pH del cultivo, para ello se suele incluir un tampón orgánico como HEPES.
Dióxido de carbono	La cantidad de dióxido de carbono CO_2 y HCO_3^- disueltos, así como los cambios en el CO_2 atmosférico pueden alterar el pH del medio. El uso de CO_2 exógeno se recomienda al usar medios tamponados. Se considera común el rango de 4 a 10 % de CO_2 . Se deben seguir las recomendaciones dadas por fabricantes del medio de cultivo a utilizar.
Temperatura	La temperatura óptima depende de la temperatura corporal del huésped del que se aislaron las células y, en menor grado, de la variación anatómica de la temperatura. Se suele usar un rango entre 33 – 37 °C. El sobrecalentamiento es un problema más serio que el subcalentamiento para cultivos celulares; por lo tanto, a menudo la temperatura en la incubadora se establece un poco más baja que la óptima, lo que provocará un crecimiento más lento, pero evitará el sobrecalentamiento.

Las condiciones de cultivo pueden variar ampliamente para cada tipo de célula, pero el entorno artificial en el que se cultivan las células consta invariablemente de un sustrato o medio que suministra los nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales), factores de crecimiento, hormonas y gases (O_2 , CO_2) para regular el entorno fisicoquímico (pH, presión osmótica, temperatura) [103].

La mayoría de las células dependen del anclaje y deben cultivarse unidas a un sustrato sólido o semisólido, conocidos como cultivo adherente o monocapa, mientras que otras pueden crecer

flotando en el medio de cultivo, conocidos como cultivo en suspensión, la elección de qué tipo de célula se utilizará recaerá en el investigador y dependerá del objetivo de su investigación.

En consecuencia, se considera que el medio de cultivo es el componente de mayor importancia del ambiente de desarrollo, ya que proporciona las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Otros componentes claves que se integran junto al medio de cultivo se consideran: suero, pH, dióxido de carbono y temperatura, y son descritos en la Tabla 1.3.

Mantener los niveles de dióxido de carbono en un nivel específico es un factor crucial para estabilizar el pH del cultivo celular con medios que contienen tampones a base de carbonato.

Es fundamental controlar con precisión los cambios de CO₂ atmosférico, debido a que estos pueden alterar el pH del medio [103].



Capítulo II

Evaluación y optimización de la plataforma de microtitulación elástica

El uso de plataformas de microtitulación junto a líneas celulares es un método estandarizado para evaluaciones farmacológicas, en especial en evaluaciones pre-clínicas. Estos cultivos in vitro permiten evaluar la eficacia de un fármaco o materiales, así como su toxicidad. Se han dado grandes avances en cuanto a las técnicas de aislamiento y cultivo de células primarias; sin embargo, aún es desafiante lograr que expresen todas las características que expresarían in vivo [27].

Es así como el desarrollo de nuevos andamios como MEC se presenta como una nueva oportunidad en cuanto al diseño y cultivo celular, los sistemas van desde cultivos en monocapa 2D hasta complejos sistemas 3D (bioreactores) que logran recrear diversos estímulos mecánicos [68]; pero aún sin encontrar un punto ideal, en cuanto a la relación funcionalidad - costo – esfuerzo.

La mayoría de sistemas de evaluación de cultivo celulares han sido diseñados para sistemas 2D; por lo tanto, evaluar un nuevo andamio 3D por microscopía simple puede ser un verdadero desafío; al ser elementos no estandarizados, no pueden ser evaluados según normativas, dificultando aún más su impacto real y la salud; factores que no deben ser dejados de lado al diseñar nuevas matrices.

Durante la primera etapa del proyecto N°52-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV “Plataforma avanzada para el estudio in vitro de parámetros toxicológicos de antibióticos de uso en pollos de engorde como alternativa humanitaria y de menor costo de los modelos in vivo” financiado por CONCYTEC, se desarrolló una nueva plataforma para el cultivo de enterocitos de pollos

de engorde, siguiendo el principio de mecanotransducción. Se diseñó y construyó una plataforma flexible que permite reproducir tensiones de cizallamiento superficial mediante el flujo de líquido aplicado directamente sobre las células para imitar los efectos del flujo a los que son sometidos los enterocitos, el linaje celular más abundante que se encuentra en el intestino.

En el presente proyecto de investigación, se evaluó la plataforma diseñada por Suárez [94], donde se aseguró que cumpliera cinco requerimientos: (i) dimensiones estándar, (ii) que sea modular, (iii) de fácil manipulación, (iv) que permita y facilite el cultivo celular y (v) que sea esterilizable. Asimismo, en la presente investigación, el uso de una línea celular comercial se consideró como apropiada, ya que permitió estandarizar el componente biológico, sin limitarse por el tiempo de vida de los cultivos celulares primarios ni en los conflictos éticos usualmente implícitos en la obtención de las células; de esta manera se centraron esfuerzos en la evaluación de la plataforma.

2.1. Plataformas de microtitulación

Las placas de microtitulación también llamadas microplacas se han convertido en consumibles de laboratorio omnipresentes en el siglo XXI. Se utilizan ampliamente en todas las instalaciones de pruebas biomédicas. Al igual que muchas invenciones a lo largo de la historia, esta invención nace de una necesidad. En 1951, el Dr. Gyula Takatsy buscaba una solución rentable para realizar análisis de sangre por lotes para detectar un virus en medio de un brote de influenza en Hungría. Takatsy usó bucles en espiral calibrados en lugar de una pipeta y placas de vidrio con pocillos en lugar de tubos para realizar múltiples diluciones en serie simultáneas, de esta manera inventó la primera microplaca de 8 por 12 pocillos. Simultáneamente, en otro rincón del mundo, el inventor estadounidense John Liner ideó un panel basado en vacío con 96 pocillos y, en 1953, le dio al mundo el primer panel desechable basado en estireno al vacío [34]. Durante los años previos a 1990, se dieron varios avances. Entre los que más destacan la creación de una placa moldeada de 96 pocillos, el mecanizado del filtro de la placa de 96 pocillos y la placa negra de 96 pocillos. En 1998, una de las evoluciones más importantes de la microplaca fue liderada por la Sociedad para la Detección Bimolecular y un grupo clave de fabricantes que se propusieron establecer estándares que todas las microplacas cumplirían en el futuro [78].

La estandarización condujo a una mayor capacidad para desarrollar equipos automatizados para mover, clasificar y lavar placas en futuros instrumentos. Todos los fabricantes de microplacas en ese momento modificaron su equipo de producción según las especificaciones exactas de los nuevos estándares de microplaca, y hoy en día tanto el material (poliestireno) para su fabricación, así como los equipos para su evaluación se encuentran estandarizados.

El poliestireno (Ps) es un polímero termoplástico que se obtiene de la polimerización del estireno monómero. Puede venir en dos formas: poliestireno cristal y poliestireno de alto impacto. La transparencia del material de poliestireno cristalino hizo que las placas y bandejas para cultivos de tejidos de este material, se consideren ideales para la investigación con microscopía y debido a que se usan en grandes volúmenes son relativamente económicas [31].

A pesar de los usos mencionados del material como plataformas para el cultivo de células, el poliestireno, no es recomendado cuando la biocompatibilidad es un requisito, esto debido a que es inherentemente hidrofóbico con un ángulo de contacto de 109.5°C y, por lo tanto, inadecuado para el cultivo celular [59]. De igual forma, este material tampoco es compatible con métodos de esterilización como la autoclave, en su lugar, se recomienda el uso de radiación gamma.

Para lograr la biocompatibilidad del Ps, se recurre a la exposición de las placas a descargas de corona o plasma para generar iones de oxígeno que se insertan en las cadenas de Ps, tal como se muestra en la Fig. 2.1. Específicamente, los grupos hidroxilo formados en la superficie promueven la unión de las células parcialmente al facilitar la adsorción de las proteínas de adhesión (p. ej., fibronectina) en el suero incluido en el medio de crecimiento celular [36].

La uniformidad de la fabricación de placas y matraces de Ps proporciona un sistema para el cultivo celular con resultados reproducibles y un sustrato universalmente aceptado para la biología celular comparativa; ventaja de notable importancia.

Si bien el Ps es la opción dominante de materiales para la biología molecular y celular convencional, su aplicación para el desarrollo de nuevas plataformas de cultivo se ha visto limitada debido a su estructura rígida, que impulsa el uso de nuevos materiales que permitan la generación de prototipos rápidos, de bajo volumen y bajo costo.

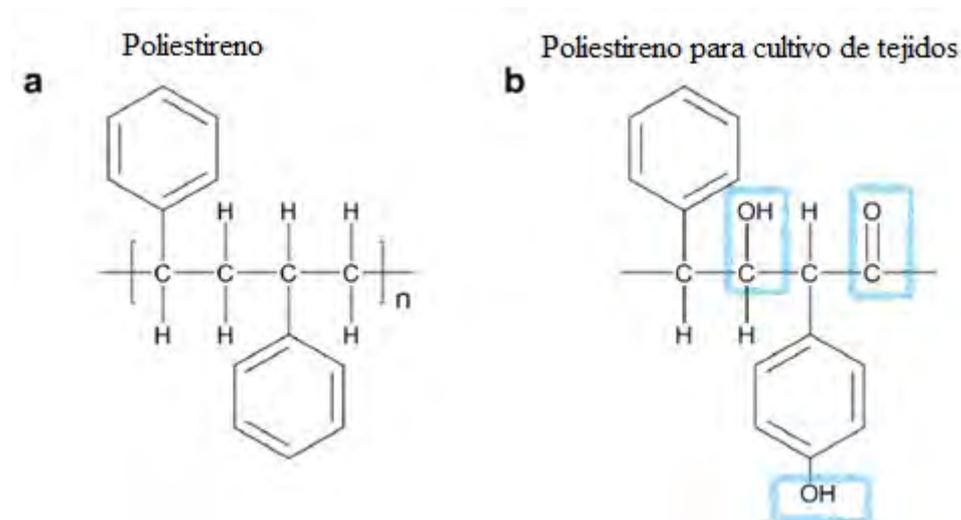


Figura 2.1: . Modificación de la superficie de Ps (a) Estructura química del poliestireno, (b) ejemplo de la funcionalización de la estructura química de poliestireno modificado para ingeniería de tejidos.

2.2. Desarrollo una plataforma de microtitulación elástica

Añadir una bomba de aire para simular un flujo en una placa de cultivo tradicional de poliestireno es una labor impensable para la mayoría de investigadores, más aún, incorporar diseños de micrografía, puede resultar complicado y contraproducente. Si bien, los diversos diseños y simulaciones computacionales ayudan a recrear los estímulos que estaríamos generando en nuevas matrices, la realidad es que la construcción de estos sistemas, más allá de imaginación e ingenio, requiere del uso de materiales manipulables, resistentes y biocompatibles [25].

Materiales como el vidrio, óxido de silicio, y siliconas han sido utilizados para la construcción de nuevos andamios extracelulares artificiales, cada uno ofreciendo ventajas y desventajas propias de los materiales. La alta inercia en el entorno fisiológico ha ocasionado darles mayor relevancia a las siliconas en diferentes aplicaciones biomédicas, incluida la matriz blanda para la administración de fármacos, dispositivos de microfluidos, microestampado de compuestos biológicos, cosméticos, apósitos para heridas, partes de diferentes dispositivos, revestimiento de catéteres, implantes mamarios, entre otros [41].

Dentro de los diversos materiales probados, el uso de las siliconas, en especial del polidimetilsiloxano (PDMS) resultó de gran interés. Este material es parte del grupo de los compuestos organosilícicos, considerado como un material viscoelástico y cuenta con muchas propiedades útiles que incluyen buena transparencia óptica, biocompatibilidad, permite la replicación de

geometrías finas y complejas, permeabilidad a los gases, estabilidad térmica y es de bajo costo. Por lo que se convirtió en un candidato ideal para reproducir las propiedades geométricas y estructurales de estructuras in vivo [72, 88].

Al trabajar con nuevas plataformas de cultivos, el factor crítico a considerar siempre es la célula. El diseño propuesto debe garantizar su biocompatibilidad y favorecer la viabilidad celular. El PDMS, pasó esta prueba y fue reportado por diversos investigadores [25, 76, 77] y será explorado con mayor profundidad en las siguientes secciones de este trabajo.

2.2.1. Polidimetilsiloxano y sus características

El PDMS está formado en una cadena repetitiva de moléculas de Si-O con dos grupos metilo unidos a silicio $C_2H_6OSi_n$, en presencia de un agente de curado que contiene una molécula de catalizador (típicamente platino) y a través del estímulo térmico, provocan un entrecruzamiento que forma un material elastomérico transparente sólido, ideal para la litografía blanda. En este caso, la mezcla de ambos componentes (generalmente en proporción 10:1) se vierte en un molde maestro, fabricado mediante fotolitografía o micromecanizado, de tal manera que el PDMS no reticulado se ajusta a la topología 3D del molde, inversamente, replicando las características a micro y nanoescala.

El diseño y manufactura de andamios celulares basados en PDMS ha sido trabajado a través de la investigación en microfluidos, donde dos marcas han sido los más destacados: (i) RTV-615 de Momentive Performance Materials y (ii) Sylgard 184 de Dow-Corning, ambos kits consisten en una base y un agente reticulante; siendo Sylgard 184 la de mayor uso y mejor accesibilidad. Recientemente, el PDMS, ha generado una atención considerable en numerosas aplicaciones biomédicas incluidos dispositivos implantables, implantes de tejidos blandos (p.ej. lentes de contacto), equipos de laboratorio (p.ej. platos, matraces y placas de pocillos), chips de diagnóstico (p.ej. micromatrices para análisis de ADN) y componentes microfluídicos. Esta amplia gama de aplicaciones del PDMS se debe a sus propiedades multifacéticas que incluyen ser inerte, no tóxico, biocompatible, permeable a los gases, flexible, ópticamente transparente y fácil fabricación a bajo costo. Estos atributos también lo convierten en un bioandamio prometedor

para aplicaciones en medicina regenerativa [41, 84].

Tomando en consideración las características mencionadas es que se propone al PDMS como un material idóneo para su aplicación en litografía blanda para la creación de prototipos rápidos y de bajo costo que puedan proporcionar flexibilidad en el diseño del sistema. Se define a la litografía blanda o suave, como un conjunto de técnicas para replicar estructuras utilizando diversos moldes, para la cual necesita materiales “blandos” que permitan la replicación de tales geometrías. Las propiedades únicas del PDMS permitieron que se convirtiera en el material predilecto para su aplicación. El uso de esta técnica, permitió la fabricación de estructuras complejas que incluyen redes de canales, depósitos, bombas y mezcladores en un solo dispositivo; la fácil integración de estos elementos proporcionó un control analítico completo sobre los experimentos, antes no posible [9].

2.2.2. Fabricación de la plataforma de PDMS

La fabricación de PDMS incluye la mezcla de dos agentes en proporciones determinadas, pero además del método convencional y establecido por las condiciones dadas por el fabricante, existen otros dos métodos alternativos para combinar las capas del dispositivo: (a) el uso de una polimerización fuera de relación y (b) un curado parcial, ambos métodos se describen a continuación:

- (a) Polimerización fuera de relación: cada capa del dispositivo se fabrica usando una relación base - agente curado, donde una capa se fabrica con exceso de base y la otra con exceso del agente de curado. Luego, las dos capas del dispositivo se alinean y se ponen en contacto para extender el proceso de polimerización térmica entre las dos capas debido a la disponibilidad de un exceso de polímeros no reticulados y moléculas de catalizador, formando un dispositivo monolítico al final.
- (b) Curado parcial: el proceso de polimerización de las dos capas del dispositivo se interrumpe antes de completarse y las dos capas se alinean y se ponen en contacto conforme para llevar el proceso de polimerización hasta el final y obtener un dispositivo monolítico.

Cada uno de estos tres métodos (convencional, fuera de relación y curado parcial) tiene sus

propias ventajas y limitaciones para aplicaciones biológicas. Lo ideal es buscar que al final del proceso de polimerización, la cantidad de polímeros de PDMS no reticulados sea el mínimo, ya que pueden filtrarse en los pozos de cultivo y afectar negativamente a los ensayos de cultivo celular; incluso se recomienda dejar a los dispositivos fabricados incubando con medio de crecimiento durante la noche para facilitar la lixiviación de sustancias químicas no deseadas dentro de la losa de PDMS a granel [59].

Por otro lado, las características del material dictan las ventajas y limitaciones específicas del uso de PDMS para aplicaciones biológicas. Algunas de estas propiedades se describen en la siguiente sección y en la Tabla 2.1. Otras propiedades que serán descritas son: propiedades ópticas, elásticas, rigidez, permeabilidad de gases, conductividad térmica, conductividad eléctrica, absorción de moléculas e hidrofobicidad [59].

Tabla 2.1: Principales características del PDMS

Característica	Valor
Densidad	0.96 g/ml
Índice de refracción	1.40
Módulo elástico	0.57 - 3.70 MPa
Ángulo de contacto	109.00 - 115.00°
Permeabilidad de gases 35°C	34.00 y 22.00 x 10 ⁻⁶ cm ² /s
Conductividad térmica	0.15 W/mK
Constante dieléctrica	2.30 - 2.80
Conductividad eléctrica	4.00 x 10 ¹³ Ω

- Propiedades ópticas

El PDMS es un material transparente con un índice de refracción (IR) de 1.40, mientras que el IR del vidrio es 1.50; es decir, a pesar de tener un rendimiento menos óptimo que el vidrio, el PDMS permite una óptima visualización de imágenes de cultivos celulares [86].

- Propiedades elásticas

Cuenta con un módulo de elasticidad de 0.60 a 3.70 *MPa*, mucho más bajo que los materiales comúnmente utilizados para el cultivo celular, como el vidrio (50 *GPa*) y los termoplásticos como poliestireno con 3 *GPa*. Es justo esta característica la que le permite el moldeado a través de litografía blanda [58].

- Propiedades de rigidez

Se ha descrito que el PDMS posee un rango amplio de rigidez que puede ir de 5 *kPa* a 1.72 *MPa* [89]. La rigidez puede ser modificada a través de la variación de la relación del producto base - agente de curado; de tal manera que puede imitar la rigidez de una variedad de tejidos como los descritos en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Grado de rigidez de distintos tejidos humanos

Grado de rigidez	Tejido humano
1.4 - 1.9 <i>kPa</i>	Cerebro
10.0 - 15.0 <i>kPa</i>	Músculo cardíaco
0.5 - 0.9 <i>MPa</i>	Cartílago
7.0 - 30.0 <i>GPa</i>	Hueso

Algunos autores [23, 37] también han mencionado que la rigidez de la MEC puede afectar la diferenciación de células, así como su destino celular y linaje; por lo tanto, el control preciso de la rigidez de las matrices ofrece la oportunidad de regular, dirigir y favorecer la diferenciación de las células.

- Permeabilidad de gases

El PDMS presenta permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono de 34 y 22 x 10⁻⁶ *cm²/s* respectivamente. Al tener una estructura altamente porosa posee una alta permeabilidad a los gases y permite un rápido intercambio de gases [59]. En la práctica, las losas gruesas de PDMS sirven como reservorios que permiten la difusión y el suministro constante de gases vitales (O₂ y CO₂) para el cultivo celular. Si el grosor de la capa de PDMS sobre el cultivo celular es comparable al de los medios en un matraz o placa de Petri típicos (1 –

4 mm), entonces el intercambio de gases y las concentraciones de oxígeno serán similares a los del cultivo celular convencional proporcionando un tampón de medio adecuado para mantener un pH fisiológico. Pero si se trabaja con membranas más finas ($\leq 50 \mu m$), permitirán una difusión más rápida de oxígeno que puede conducir a un microambiente hipóxico; por lo tanto, los dispositivos que involucran tales geometrías deben evitarse o debe controlarse el suministro de oxígeno cuidadosamente [59]. Además, el PDMS también es permeable al vapor de agua ($1700 m^2/s$ a $25^\circ C$), lo que requiere un control preciso de la humedad sobre el cultivo, así como del control de la evaporación ya que puede provocar cambios sustanciales en las concentraciones de iones y reactivos y, por lo tanto, inducir cambios desfavorables en la osmolaridad y el pH del medio de cultivo [6].

- Conductividad térmica

La conductividad térmica de PDMS es de tan solo $0.15 W/mK$, significativamente menor que la del agua de $0.59 W/mK$, esto implica que las paredes de PDMS minimizan la disipación de calor y, por lo tanto, mantienen el cultivo celular a una temperatura estable. Esta propiedad junto al control de la humedad ambiental, ayuda a que los dispositivos de PDMS minimicen las fluctuaciones de temperatura del cultivo, así como posibles influencias negativas en el crecimiento celular, actividad enzimática y expresión de proteínas [59]

- Conductividad eléctrica

El PDMS es un aislante eléctrico con una resistencia eléctrica muy alta ($4 \times 10^{13} \Omega m$). Diversos investigadores [29, 52, 66] han aprovechado la baja conductividad de PDMS para la integración de electrodos en dispositivos, con gran potencial de aplicación para medir las propiedades eléctricas de células individuales, clasificación celular, entre otros.

- Absorción de moléculas

Por otro lado, debido a su permeabilidad el PDMS es propenso a la absorción/adsorción de moléculas pequeñas y biomoléculas. El agotamiento de moléculas pequeñas debido a la absorción por PDMS puede tener un efecto profundo en las aplicaciones de cultivo

celular debido al papel fundamental de los factores solubles secretados en la señalización, el comportamiento y la función celular. Este fenómeno puede compensarse con el recubrimiento superficial de PDMS con materiales de baja permeabilidad como parileno, cera y el pretratamiento de superficies con métodos sol-gel. También se recomienda hornear los moldes de PDMS por al menos durante 24 horas para garantizar que se complete el proceso de curado [59].

- **Hidrofobicidad**

El PDMS es un material hidrofóbico con un ángulo de contacto de $109 - 115^\circ$, esta característica interrumpe gravemente la adhesión y el crecimiento de algunas líneas celulares. El PDMS, a diferencia del poliestireno no puede seguir el mismo proceso de tratamiento con plasma, debido a la recuperación hidrofóbica, donde las superficies hidrofílicas no son estables a largo plazo.

Este proceso se debe a los oligómeros de PDMS no reticulados de bajo peso molecular, los cuales se difunden desde la mayor parte a la superficie, devolviendo así el sustrato a su estado hidrofóbico. Obligando a los investigadores a realizar los ensayos de cultivos celulares en periodos cortos (incluso de menos de 1 hora) después de los tratamientos con plasma para que las superficies mantengan una hidrofiliadad adecuada para la adhesión y proliferación celular [76].

En términos generales, se puede considerar al PDMS como un material biocompatible, ya que no resulta tóxico en contacto con cultivos celulares; sin embargo, sí se debe considerar una modificación de su superficie para mejorar su compatibilidad con cultivos celulares adherentes. Además, la absorción de moléculas pequeñas y la lixiviación emergen como problemas potenciales en las aplicaciones de cultivo de células en PDMS.

2.3. Modificación de la superficie de PDMS

El principal desafío al trabajar con PDMS, además de ser un proceso estrictamente manual algo tedioso y largo, es su ya mencionada hidrofobicidad y absorción de proteínas. El mantenimiento de la adhesión de células de mamíferos en la superficie del sustrato es crucial para determinar la viabilidad, proliferación y diferenciación celular. Por lo tanto, la hidrofobicidad

inherente del PDMS puede resultar desfavorable para el cultivo celular, que provoca que las células finalmente se desprendan de la superficie.

Ante esta problemática diversos autores [82, 90, 93] consideraron la modificación de la superficie de plataformas de PDMS como parte de su proceso de fabricación, siendo los métodos más usados: exposición a alta energía, mezcla con surfactantes y recubrimientos proteicos [53]. Algunos autores, incluso recomiendan la combinación de distintos métodos para una mejorar hidrofiliidad, una de las combinaciones más populares serían el tratamiento con plasma de oxígeno y su posterior recubrimiento con proteínas que promueven la adhesión, como fibronectina, laminina y colágeno, para que sean adecuadas para el cultivo celular [39, 40].

Aun cuando, la mayoría de las líneas celulares prefieren una superficie relativamente hidrófila para su adhesión y proliferación; algunos autores [43] mencionan que las superficies altamente hidrófilas exhiben propiedades antiincrustantes que impiden el cultivo celular en dichas superficies. Los citados sugieren que las cámaras de cultivo donde tendría lugar el crecimiento y la proliferación celular deben tratarse para que sean relativamente más hidrofílicas, mientras que el resto del dispositivo debe tratarse para que sea muy hidrofílico, minimizando la absorción de moléculas pequeñas y la adsorción no deseada de proteínas como, por ejemplo, enzimas.

En la siguiente sección se describe los métodos más utilizados para la modificación de superficies de PDMS.

Exposición a alta energía

El método de exposición de alta energía se basa en la aplicación de energía en la superficie para introducir varios grupos polares. Con este fin se han utilizado descargas de corona, radiación UV en combinación con tratamientos con plasma de ozono, oxígeno y otros gases [2, 12].

Entre las variantes mencionadas, el tratamiento con plasma es el más utilizado, debido a que es un proceso relativamente simple y corto. Los gases de oxígeno, nitrógeno, argón, bromuro de hidrógeno y cloro se utilizan principalmente en el tratamiento con plasma. Estos gases se disocian y reaccionan con la superficie del PDMS para introducir grupos funcionales [10]. Entre todos, el tratamiento con plasma de oxígeno muestra el aumento más rápido de la hidrofiliidad de la superficie de PDMS al eliminar los grupos de hidrocarburos e introducir grupos de silanilo

polar (SiOH) a través de la oxidación químicos (Fig. 2.2).

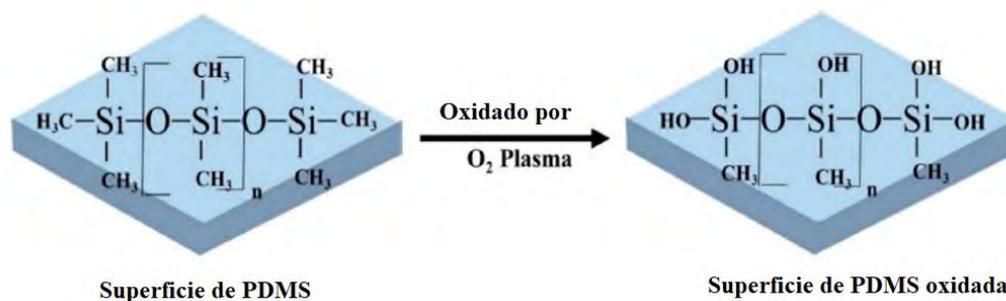


Figura 2.2: Modificación de la superficie de PDMS por tratamiento con plasma de oxígeno. Después de la oxidación, los grupos hidrofóbicos $-CH_3$ se reemplazan por los grupos silanol hidrofílicos (SiOH) y mejoran la humectabilidad. Modificado de [36].

Este proceso se logra mediante el uso de una descarga de gas inducida por radiofrecuencia a baja presión, La superficie a hidroxilar se carga en la cámara de reacción y se evacua bajo una bomba de vacío. El gas portador, O₂, se dispone sobre la superficie y se expone a energía de radiofrecuencia que se aplica alrededor de la cámara y da como resultado la ionización. Los electrones subsiguientes chocan con moléculas de gas neutro produciendo radicales libres, iones y electrones libres químicamente activos. Este tratamiento permite modificar la mayoría de las superficies de manera uniforme y no hay subproductos dañinos de la reacción [36].

Durante el tratamiento con plasma de oxígeno se dan dos procesos simultáneamente: grabado de la superficie con oxígeno atómico para dar productos de reacción volátiles y la formación de grupos funcionales que contienen oxígeno en la superficie. Además de los grupos hidroxilo, el tratamiento con plasma de oxígeno también generará enlaces C=O, C-O y C-O-C en la superficie, lo que aumentará la energía libre superficial [36].

La hidrofilia mejorada resulta evidente al disminuir el ángulo de contacto con el agua (WCA, por sus siglas en inglés) en la superficie del PDMS en aproximadamente 30° [71]. El principal inconveniente de esta técnica resulta en que es una modificación energéticamente desfavorable y el aumento de la energía es superficial, por lo tanto, las cadenas cortas de polímero sin tratar en la mayor parte del polímero migrarán a la superficie para devolver la química de la superficie a su forma original en un proceso conocido como: envejecimiento.

En consecuencia, la recuperación hidrofóbica se inicia en cuestión de minutos y al cabo de 24h,

la superficie exhibe una recuperación completa, lo que limita su idoneidad para la siembra de células [4, 42]. Por lo tanto, en lugar de usar un dispositivo PDMS tratado con plasma para el cultivo celular directamente, el tratamiento con plasma es sugerido como un pretratamiento para facilitar la adhesión de otros materiales de recubrimiento para una unión celular sostenible [13, 56].

Algunos métodos para ralentizar o evitar que ocurra esta recuperación incluyen mantener la superficie en agua inmediatamente después del tratamiento y eliminar los polímeros sin curar mediante extracción con solventes [53]. Sin embargo, no se ha establecido la utilidad de estos enfoques para microfluidos de gotas, y es probable que la exposición de la superficie al aceite anule estos efectos.

Cabe resaltar que, los polímeros con mayor densidad de reticulación, como el PS, son estables después del tratamiento con plasma y, por lo tanto, menos propensos al envejecimiento. Por otro lado, también se debe considerar que los métodos de exposición a alta energía vuelven la superficie de PDMS quebradiza debido a que los rápidos cambios en la química de la superficie facilitan que se doblen o rompan durante esta etapa, lo que puede llevar a hoyos o grietas de tamaño nano a micro en la superficie [79]. Este proceso debe reconocerse si se está evaluando la rugosidad de la superficie.

Absorción y adsorción de biomoléculas

La adsorción de proteínas por MEC es un método bien aceptado y ampliamente utilizado de modificación de la superficie en todo tipo de sustratos; incluso en dispositivos como los biorreactores de microfluidos [82]. La modificación de proteínas mejora la biofuncionalidad de la superficie mientras mantiene las propiedades del sustrato, especialmente para los elastómeros que se emplean para investigar la mecanotransducción, como el PDMS. Este método puede subdividirse según la forma en la cual interactúa con la superficie, pudiéndose dar una unión por fisisorción, quimisorción o por unión a través de enlaces covalentes; los mismos que se describen a continuación:

- **Fisisorción**

Es una interacción basada principalmente en las interacciones de Van der Waals entre las

proteínas y la superficie. La fisisorción de proteínas permite crear superficies biológicamente activas gracias a la creación de capas uniformes casi inmediatamente después de la incubación en una solución biológica.

Si bien, la fisisorción de una proteína representa un método fácil para la modificación de la superficie, no se comprende completamente por qué y cómo se adsorben en la superficie. Se sabe que algunos parámetros como la fuerza iónica y la temperatura pueden alterar el comportamiento de adsorción, pero se acepta que la principal fuerza impulsora detrás de la adsorción de proteínas es una ganancia de entropía por la liberación de iones de agua y sal adsorbidos en la superficie y por reordenamientos estructurales dentro de la proteína.

A bajas densidades superficiales, las proteínas se orientarán de modo que las regiones con carga opuesta entren en contacto con la superficie. Análogamente, si la superficie es hidrofílica, las proteínas harán contacto superficial con sus residuos hidrofílicos. A medida que aumenta la densidad de proteínas de la superficie, las interacciones proteína-proteína se vuelven más dominantes y las proteínas se reorientarán para disminuir las fuerzas repulsivas generales [36].

La adsorción física de proteínas a una superficie no es considerada como un enfoque sólido para la modificación de la superficie, ya que es conocido que las proteínas fisisorbidas en superficies de PDMS oxidadas se desorben en cultivo estático con el tiempo. La fibronectina (FN) y la albúmina de suero bovino (BSA) son proteínas comunes para modificar metales, polímeros y vidrio para áreas adhesivas y no adhesivas de células, respectivamente [36].

- **Quimisorción**

Corresponden a los métodos basados en propiedades electroestáticas más fuertes o uniones de hidrógeno. Por ejemplo, superficies de vidrio y silicona se han modificado químicamente mediante el autoensamblaje capa por capa de polielectrolitos o la copolimerización por injerto de ácido acrílico. Además, debido a la simplicidad y estabilidad de la reacción, la modificación de la superficie a través de la silanización es la más utilizada.

- **Enlaces covalentes**

Este método generalmente implica la unión de dos tratamientos para facilitar la unión covalente de la superficie modificada con la proteína objetivo y puede lograrse de diversas maneras. Por ejemplo, se ha reportado el uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) para activar cualquier grupo de ácido carboxílico generado por el tratamiento con plasma para unirse covalentemente con las proteínas [26]. La reacción covalente de glutaraldehído a la amina primaria en el silano proporciona un grupo final para la reacción adicional de las aminas primarias de proteínas.

- **Proteínas para el recubrimiento de superficies**

Las proteínas de la MEC, como el colágeno y fibronectina, se utilizan generalmente para recubrir el PDMS y proporcionar un medio natural para la unión y la supervivencia de las células. Las proteínas presentes en la MEC pueden mostrar un autoensamblaje en la superficie de PDMS mediante un enlace covalente y facilitan la adhesión del cultivo celular en la superficie al alterar la hidrofobicidad de la superficie de PDMS. Sin embargo, la adición y disociación de las células en la superficie dependerá del tipo de célula y su MEC nativa [71]. En la siguiente sección, se explorará acerca de la interacción entre PDMS – colágeno y PDMS –BSA, dos de las proteínas más utilizadas como recubrimiento.

Colágeno

El colágeno es la principal proteína fibrosa insoluble que se encuentra en la matriz extracelular (MEC) y el tejido conectivo. Los colágenos representan los principales componentes que proporcionan la rigidez e integridad general del tejido. Hay 28 tipos diferentes de colágeno en esta superfamilia de proteínas. La superfamilia del colágeno se caracteriza por tener cada cadena que contiene uno o más motivos de aminoácidos repetitivos (Gly-X-Y), donde X es la prolina o hidroxiprolina e Y representa cualquier aminoácido.

La cadena de aminoácidos se autoagrega para formar una estructura de triple hélice dextrógira, la glicina reside dentro del núcleo de la proteína mientras que X e Y están expuestos en la superficie. La estructura de triple hélice se estabiliza mediante la prolina y la hidroxiprolina mediante la formación de un enlace de hidrógeno que impide la rotación, de los cuales, las variaciones en términos de composición de aminoácidos, longitud y empaquetamiento de dominios de triple

hélice difieren entre los tipos de colágeno [46]. Los colágenos tipo I-III son los más abundantes y constituyen el 80-90 % del colágeno corporal total, otros colágenos de consideración se describen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Principales tipos de colágeno y sus funciones fisiológicas

Tipos de colágeno	Funciones
Tipo I	Actúa como un andamio estructural en el tejido musculoesquelético, como en los tendones y los huesos, y en la piel
Tipo II	Se presenta en la mayoría del cartílago y cuerpo vítreo.
Tipo III	Existe en paralelo con el colágeno tipo I excepto en huesos y tendones
Tipo IV	Principal formador de redes en la membrana basal. Subyace en las células epiteliales y endoteliales, actuando como una barrera entre los compartimentos tisulares
Tipo V	Proteína estructural y de señalización. Tiene una estructura de filamento de perlas moleculares única y se encuentra en la interfaz entre la membrana basal y la matriz intersticial

Como se mencionó, el colágeno es un componente universal de las proteínas constituyentes de la matriz extracelular en los organismos vivos y tiene varias funciones, como apoyar la división celular, la migración y la diferenciación en el cuerpo. El colágeno se ha utilizado para una variedad de cultivos, incluidos 2D, 3D, así como diversos tipos de células y organoides, además de aplicaciones biomédicas, incluido el cultivo extendido de células terapéuticas, piel artificial, cosméticos y reconstrucción de tejidos [65].

Por otro lado, esta proteína también tiene la capacidad de aumentar la hidrofilia de PDMS en mayor medida entre las proteínas de MEC y, por lo tanto, es el más utilizado para el cultivo celular [69] y como recubrimiento de la superficie de PDMS. En la Fig. 2.3 se muestra el autoensamblaje en la superficie de PDMS mediante un enlace covalente de los enlaces apolares, esta acumulación proteica en la superficie se da a través de fuerzas débiles como la electrostática, hidrofóbica y de van der Waals. Por lo tanto, es bastante fácil que las moléculas de colágeno se

filtran en la solución, lo que da como resultado un recubrimiento de colágeno no uniforme [71, 90].

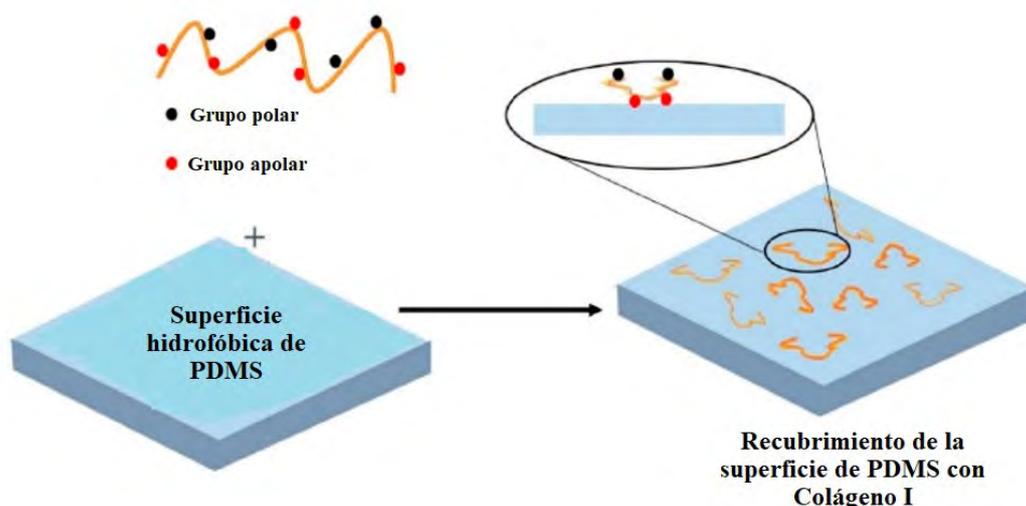


Figura 2.3: Representación esquemática de la modificación de PDMS con colágeno I. Los grupos polares de colágeno I se unen covalentemente con la superficie de PDMS para autoensamblarse y proporcionar la plataforma para la unión celular. Modificado de [55]

En consecuencia, el colágeno podría no ser adecuado para experimentos a largo plazo. Además del colágeno tipo I, también se ha reportado usos del colágeno tipo IV como recubrimiento, dando como resultado la reducción del ángulo de contacto con el agua (WCA) en PDMS en aproximadamente un 10 %, lo que indica que es un reactivo débil para usar en la siembra en PDMS [55]. Por último, dado que el recubrimiento de colágeno es un paso costoso y lento, se debe evaluar seriamente su uso como recubrimiento.

Albúmina de suero bovino

La albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) es una proteína que se encuentra predominantemente en el sistema circulatorio de la vaca, también es un constituyente del componente de suero de la leche bovina. Tiene un peso molecular de 66 433 Da (583 aminoácidos) y se cree que se encuentra en la leche debido a un deterioro de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias que restringen el movimiento de moléculas desde la sangre hasta el compartimento secretor de la glándula mamaria bovina [69, 95].

La albúmina de suero bovino se usa a menudo como suplemento proteico en medios de cultivo

celular, sin embargo, existen reportes que indican que la albúmina de suero bovino residual en algunas formulaciones a veces ocasiona efectos adversos debido a sus propiedades antiadherentes [73]. A pesar de que los efectos del BSA combinados con tensioactivos han sido estudiados, los efectos de BSA de forma independiente han sido dejados de lado y se desconoce en gran parte los efectos causados por la adsorción de BSA en PDMS, incluso algunos autores [1] demostraron que varias preparaciones comerciales de BSA tenían un potencial inhibidor del crecimiento de la línea celular de cáncer de mama humano, MCF-7. Sin embargo, el BSA también ha sido utilizado como proteína para la modificación de hidrofiliidad de superficies de PDMS, por lo tanto, se deja en claro la necesidad de investigar a mayor profundidad la interacción de esta proteína con las líneas celulares y las matrices extracelulares artificiales.

Modificación con agentes surfactantes

La modificación química de la superficie de PDMS a través de su mezcla con surfactantes proporciona un enlace covalente fuerte y estable a los restos de adhesión celular, Pluronic F127, F68, Tween 20, Triton X-100 y PDMS-EO son algunos agentes tensioactivos no iónicos que han sido utilizados con este fin en la modificación de PDMS [71]. Los agentes tensioactivos típicamente consisten en porciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, han sido ampliamente reconocidos como materiales útiles para esparcir soluciones acuosas sobre superficies hidrofóbicas.

Una desventaja de usar un agente humectante, como los mencionados agentes surfactantes, para mejorar la humectabilidad es el riesgo de alterar la solución de manera no deseada. Por lo tanto, normalmente se utilizan concentraciones muy bajas del agente humectante. Estas concentraciones bajas también pueden ser laboriosas de aplicar si se dispone de una cantidad limitada de soluciones objetivo [14, 35]. En la presente investigación se consideraron tres surfactantes: Pluronic F127, Triton X-100 y Tween 20.

- **Pluronic 127**

Es un copolímero tribloque que comprende una parte hidrófoba, poli-óxido de propileno (PPO, por sus siglas en inglés) en el medio (70 unidades) flanqueada por dos cadenas hidrofílicas poli-óxido de etileno (PEO, por sus siglas en inglés) (20 unidades cada una),

su fórmula es: $\text{HO}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_2\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_{70}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_2\text{OH}$.

La existencia de partes hidrofóbicas aumenta la probabilidad de interacción hidrofóbica con PDMS, mientras que las partes hidrofílicas brindan la oportunidad de aumentar la humectación hidrofílica al introducir una interfaz externa de dominio de porciones hidrofílicas [97]. La solución Pluronic F127 suele prepararse en etanol, donde el copolímero en bloque forma fácilmente micelas complejas con una concentración crítica de micelización (CMC) muy baja, junto con los unímeros en la solución. Al añadir una pequeña cantidad de solución de Pluronic F127 al pre-polímero de PDMS, los unímeros y las micelas de Pluronic F127 quedan rodeados por el entorno muy hidrofóbico del prepolímero huésped: PDMS.

Las micelas originales de la solución a base de etanol, con partes de PPO en el interior y partes de PEO como moléculas de etanol en el exterior, se disuelven en el entorno hidrofóbico. Seguiría un reordenamiento de los unímeros de Pluronic F127 o la formación de un nuevo tipo de micela. Sin embargo, dado que tal reordenamiento ocurrió junto con el proceso de curado de PDMS, el proceso podría congelarse en un estado de transición.

Además, como aditivo anfifílico en PDMS, Pluronic F127 tiene tendencia a migrar a la superficie. Esto significa que puede haber algunas moléculas de Pluronic F127 en la superficie del PDMS curado (incrustado en la superficie), que no están en la configuración ideal para producir una alta hidrofilia, ya que la molécula se configura durante el proceso de curado, donde hay poca o ninguna interacción hidrofílica. Estas configuraciones se reorganizan a la configuración óptima en presencia de agua; que es cuando la parte hidrofóbica (PPO) está en la superficie, pero incrustada en el PDMS, mientras que la parte hidrofílica, la PEO, se extiende desde la superficie [35, 44].

- Triton X-100

Triton X-100 es un surfactante no iónico (sin carga) que contiene cadenas de polioxietileno como restos hidrofílicos, es usado como agente humectante de soluciones de tinción, limpieza y grabado. Su fórmula es $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2$, y es un derivado de poli(etilenglicol) que es poli(etilenglicol) en el que uno de los grupos hidroxilo terminales se ha convertido en el p-(2,4,4-trimetilpentan-3-il)fenil éter correspondiente [14, 98]. Ha sido utilizado para

la reducción del ángulo de contacto en superficies de PDMS; se ha reportado la reducción del ángulo de contacto desde 113° hasta 46° gracias a la aplicación de Tritón en la superficie de PDMS con tolueno [75].

- Tween 20

El reactivo sorbitán de polietilenglicol, conocido como Tween 20, tiene la fórmula molecular: $C_{26}H_{50}O_{10}$. Se clasifica como un ingrediente inactivo o necesidad farmacéutica, en productos tópicos que funcionan como analgésicos, antirreumáticos, óticos, quemaduras y quemaduras solares. Este polisorbato es utilizado en productos farmacéuticos por varias razones, incluida la modificación de la absorción de un ingrediente activo. También es considerado como un agente clarificante o de relleno en productos oftálmicos y como agentes de limpieza, humectantes o solventes para lentes de contacto en concentraciones que no excedan el 1.0% [99].

2.4. Evaluación del ángulo de contacto

El ángulo de contacto es un parámetro fundamental para conocer propiedades como la humectabilidad (hidrofilicidad en caso del agua) de los materiales. Una superficie es hidrofílica si el ángulo de contacto es menor de 90°, hidrofóbica si el ángulo de contacto es mayor de 90°, y superhidrofóbica si es más de 150° [50].

Las mediciones estáticas del ángulo de contacto se obtienen depositando una gota de 1 a 2 μl de agua desionizada sobre el sustrato. Se mide el ángulo (θ) en el que se encuentra la gota de agua (u otro líquido) que descansa sobre la interfase líquido-sólido. Una gota que descansa sobre una superficie con un ángulo de contacto definido ($\theta > 0^\circ$) existe en un estado de equilibrio parcialmente humectante. Si, $\theta = 0^\circ$, ese estado se define como mojado completo. La humectación parcial se puede describir con la ecuación de Young (Ecuación 2.1).

$$Y_{gs} - Y_{sl} = Y_{lg} \cos \theta \quad (2.1)$$

El equilibrio mecánico de un ángulo de contacto se expresa en términos de equilibrio de fuerzas utilizando un sistema trifásico: líquido, gas y sólido, como se ve en la Fig. 2.4. Aquí, la energía interfacial del sólido-líquido (γ_{sl}), la energía interfacial del líquido-gas (γ_{lg}) y la energía inter-

facial del gas-sólido (γ_{gs}) pueden describir el ángulo de contacto. Los cambios en las variables de energía interfacial dan como resultado cambios en el ángulo de contacto medido.

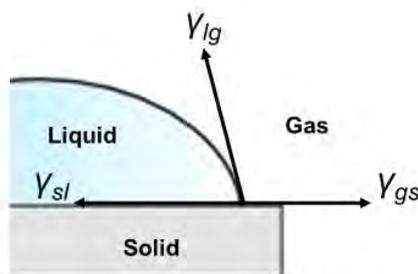


Figura 2.4: Componentes en ingeniería de tejidos. Creado en Biorender

Explicado de otra manera, en un sistema ideal, la forma de la gota de líquido estaría completamente determinada por la tensión superficial del líquido. En un líquido puro, cada molécula en el sistema a granel es atraída por igual en todas las direcciones por sus moléculas vecinas, lo que da como resultado una fuerza neta cero.

Esto no es cierto para una gota de líquido. Las moléculas líquidas expuestas a la superficie son atraídas hacia adentro por las moléculas vecinas creando un desequilibrio en la fuerza neta. Esto hace que el líquido contraiga su área superficial para mantener su energía superficial libre más baja y se conoce como tensión superficial. Por lo tanto, un ángulo de contacto medido es el resultado de la tensión superficial de los líquidos y las fuerzas externas [36].

En la presente sección se evalúa la implementación de un nuevo método para la fabricación de las plataformas elásticas, así como la modificación de superficies para mejorar su hidrofiliidad con colágeno y BSA; además de la modificación a través de surfactantes tales como Triton x – 100, Pluronic 127 y Tween 20.

2.5. Métodos de evaluación de cultivos celulares para estudios farmacológicos

En comparación con otras disciplinas biomédicas, los sistemas de cultivo celular se han adoptado sistemáticamente para su uso en toxicología solo recientemente, debido a la dificultad de extrapolar los datos *in vitro* a la situación *in vivo* con fines regulatorios. Sin embargo,

en las dos últimas décadas, los avances tecnológicos que utilizan sistemas de cultivo celular y esfuerzos para limitar el uso de animales de investigación por razones éticas y técnicas, han promovido su uso en investigaciones toxicológicas.

Los factores de crecimiento, así como el uso de nuevos sustratos capaces de estimular la proliferación celular y/o la expresión de funciones específicas, así como el uso de técnicas analíticas sofisticadas para estudios mecanísticos, junto con procedimientos automatizados, han jugado un papel fundamental para promover el uso de estos métodos alternativos al uso de animales de investigación [11]. La continua evolución de diversos modelos *in vitro* basados en células madre, líneas celulares humanizadas y tejidos organotípicos diseñados, así como numerosos ensayos celulares basados en líneas celulares derivadas de tumores establecidas y sus derivados genéticamente modificados, fueron desarrollados con el objetivo de incrementar la predictividad y relevancia en los ensayos toxicológicos [21, 24].

Inicialmente, la mayoría de ensayos *in vitro* eran relativamente sencillos con una aplicación muy limitada [3], pero no lograban la relevancia necesaria en su campo. Es así como la búsqueda de modelos celulares de mayor relevancia llevó al desarrollo de novedosas técnicas, así como modelos *in vitro* basados en ciencias ómicas y métodos *in silico* de mayor complejidad. Sin embargo, la estandarización y reproducción de estos ensayos sigue siendo un desafío.

La normativa ISO 10993-5 describe los métodos utilizados y estandarizados para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de dispositivos médicos. Esta normativa también indica los equipos y métodos aprobados para su evaluación; entre los equipos mínimos requeridos se encuentran: cabina para cultivo celular (cabina de flujo laminar o de bioseguridad), incubador (CO₂ y humedad), lectora de microplacas, centrífuga, refrigerador y congelador (-20 °C), contador de células, microscopio invertido, tanque para nitrógeno líquido o criostato y esterilizador. Entre los insumos requeridos encontramos: contenedores para el cultivo de células como frascos, placas Petri, botellas con tapa rosca (roller bottles), placas multipocillos, además de sistemas de filtración al vacío de 0.22 μm , pipetas descartables y micropipetas, jeringa y agujas, contenedores de desechos, medios de cultivo, suero, reactivos y células. Por último, otros equipos no necesarios pero que se pueden considerar: bomba de aspiración (peristáltica o de vacío), pH metro, microscopio confocal y citómetro de flujo.

Por tal motivo, se consideró importante garantizar la compatibilidad de la plataforma diseñada con los métodos disponibles y estandarizados para la evaluación, en este caso se prestó especial atención a tres equipos: incubadora, microscopio invertido y lectora de microplacas.

2.6. Elementos básicos para la fabricación y evaluación de un sistema de microtitulación elástica

El uso de nuevos materiales presenta oportunidades para el diseño y construcción de plataformas, además de nuevas expectativas acerca del desarrollo de los cultivos in vitro. La introducción del PDMS ha beneficiado a los investigadores con nuevos procesos de diseño y fabricación que ayudan a crear dispositivos personalizados para una aplicación biomédica específica en un tiempo y presupuesto razonables. El PDMS es considerado la opción líder para el cultivo de células en sistemas de microfluidos debido a su conveniencia, confiabilidad y versatilidad [71].

En contraparte, este material también presenta grandes desafíos para los investigadores durante su proceso de fabricación, ya que, al utilizar métodos y diseños únicos, la automatización de procesos es limitada y los productos pueden no ser fácilmente reproducibles. El desarrollo de la plataforma elástica retratada en la presente investigación, intenta hacer frente a parte de esta problemática a través de dos enfoques: en primer lugar busca que la plataforma presente dimensiones estandarizadas, similar a las plataformas más utilizadas en diversas investigaciones en cultivo de tejidos y estudios farmacológicos, y en segundo lugar, busca que no solo presente similitudes entre los diseños utilizados, sino que busca asegurar su compatibilidad con los equipos más utilizados en la evaluaciones toxicológicas.

Los resultados expuestos en el capítulo anterior dejaron en claro que la plataforma elástica aún no cumplía con todos los requerimientos para considerarla funcional para el cultivo de células. Por consiguiente, en el presente capítulo se ahondaron esfuerzos en mejorar el diseño (para mejorar su compatibilidad con los equipos), el método de elaboración (para disminuir posibles contaminantes) y por último, su biocompatibilidad.

El nuevo método de elaboración de la plataforma se basó en el marco de normativa de Buenas Prácticas de Manufactura [102] y sugerencias de diversos autores. Por último, se realizó una

investigación de mayor extensión en cuanto a la mejora de la biocompatibilidad, donde se concluyó que el punto clave de mejora se encontraba en la disminución de la hidrofobicidad de la superficie, que provoca una pobre adhesión celular, así como la creación de islas de disociación de agregados celulares. En este capítulo también se exploran dos métodos utilizados para mejorar la hidrofiliidad de la superficie: revestimiento con proteínas y la modificación a través de la mezcla con surfactantes.

2.7. Materiales y métodos

La línea celular HeLa (ATCC CCL-2) fue gentilmente compartida por el Dr. Juan Lopez Smith del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, sección Química de la PUCP. Las placas microtituladoras estériles de poliestireno para cultivo celular de 24 pocillos Corning® 24 Well TC-Treated Microplates fueron adquiridas de la empresa Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Phosphate buffered saline (PBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium: High glucose con L-glutamina y Sodium Pyruvate, Gibco™ Antibiotic Antimycotic Solution (100×), trypsin-EDTA 0.25 % y Fetal Bovine Serum (FBS) fue adquirido de Fisher Scientific (Pittsburg, PA). Triton X-100, Bovine Serum Albumin (BSA), Pluronic – 127, Azul de tripano y kit listo para usar WST1, fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Solución de colágeno (3 mg/ml) fue adquirido de Stemcell Technologies (Vancouver, Canadá). El prepolímero Sylgard 184 fue adquirido de Dow Corning (Midland, MI).

La instrumentación utilizada para esta investigación incluyó la cámara digital Canon EOS 1300, EF-S 18-55 IS II (Tokio, Japón), micropipeta de 10 μ l, software ImageJ, hemocitómetro convencional Isolab (Wertheim, Alemania), microscopio invertido Zeiss A1, Axiocam ERC 5s Imágenes analizadas con software (Jena, Alemania), lectora de microplacas DIAREader ELX800G (Dialab, Austria), incubadora para cultivo celular Heracell™ VIOS 160i CO2 (Nuevo Hampshire, Estados Unidos), autoclave VS-2/1-L de la empresa Steelco (Riese Pio, Italia), incubadora ECOCELL® de MMM Group (Simmelweisstraße, Alemania), sonicador (JP Selecta™, España).

La plataforma elástica diseñada por [94], fue fabricada en PDMS a través de un proceso de curado con piezas de ácido poliláctico (PLA, por sus siglas en inglés) impresas en 3D con el

método de *Fused Deposition Modelling* (FDM). Para la pieza base se utilizó VeroClear, un material transparente que simula el polimetilmetacrilato (PMMA, por sus siglas en inglés) y fue impreso con tecnología Polyjet. Cabe resaltar que el diseño base de la plataforma cuenta con las dimensiones descritas en la Norma ANSI/SBS 1-2004 de las placas convencionales con una matriz de 6 x 4 y un pocillo individual de 15 mm de diámetro.

Siguiendo las indicaciones del diseño inicial [94], se realizó la mezcla manual 20:2 (en peso) de los dos componentes de SYLGARD® 184 por 10 minutos, se aplicó a vacío -0.95 atm entre 45 - 60 minutos, para luego colocar la muestra en los moldes, previamente desinfectados con isopropanol, y se incubaron con la mezcla a 60 °C por 6 horas. Finalizado este periodo, se desmoldó cuidadosamente y se ensamblaron las piezas utilizando SYLGARD® 184 como pegamento, y fueron nuevamente incubadas por 6 horas.

Se dividió en tres partes la plataforma elástica: base impresa en tecnología Polyjet, la plataforma en PDMS, y la tapa del sistema. Asimismo, describe que para garantizar la esterilización de todas las partes se siguieron tres protocolos resumidos en la Tabla 2.4 y descritos a continuación:

- Protocolo 1: limpieza con IPA con hisopo sobre las superficies, ventilación por 10 min en la cabina de extracción, sonicación por 10 min con alcohol 70°C, ventilación final por 30 - 60 min en la cabina de extracción
- Protocolo 2: Autoclavado modo descontaminación (137 °C, 1.25 atm, 45 min).
- Protocolo 3: Piezas en contenedor hermético con pastillas de formalina por espacio de 8 horas.

Tabla 2.4: Protocolos de esterilización del molde de PDMS, base y tapa de la plataforma

Pieza	Protocolo		
	1	2	3
Plataforma PDMS	X	X	
Base y tapa	X		X

En esta tesis, la plataforma elástica fue evaluada a través de dos factores claves: (a) compa-

tibilidad con los equipos que permitirán su evaluación y (b) funcionalidad para el crecimiento y evaluación de un cultivo celular. Esta evaluación se realizó tomando como control una plataforma de microtitulación comercial. La metodología utilizada para la evaluación de la plataforma elástica fue a través de la comparación con una plataforma de microtitulación comercial, los equipos evaluados fueron: microscopio invertido, incubadora y lectora de microplacas. Para su evaluación se utilizaron las listas de verificación indicadas en las Tablas 2.5, 2.6, 2.7.

Tabla 2.5: Lista de verificación de compatibilidad con el microscopio invertido

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo			
Permite el paso de luz para la visualización			
Permite la observación del fondo de la plataforma			
Permite distinguir formas celulares de posibles contaminantes			

Tabla 2.6: Lista de verificación de compatibilidad con la incubadora

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo			
Permite la difusión y equilibrio de CO ₂ y humedad			
Permite el cierre de la incubadora			

Tabla 2.7: Lista de verificación de compatibilidad con la lectora de microplacas

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo			
Permite el paso de luz para la visualización			

Por otro lado, la compatibilidad con el crecimiento y evaluación de un cultivo celular se realizó a través de la evaluación de tres factores complementarios: morfología, viabilidad y proliferación, tal como se muestra en la Fig. 2.5.

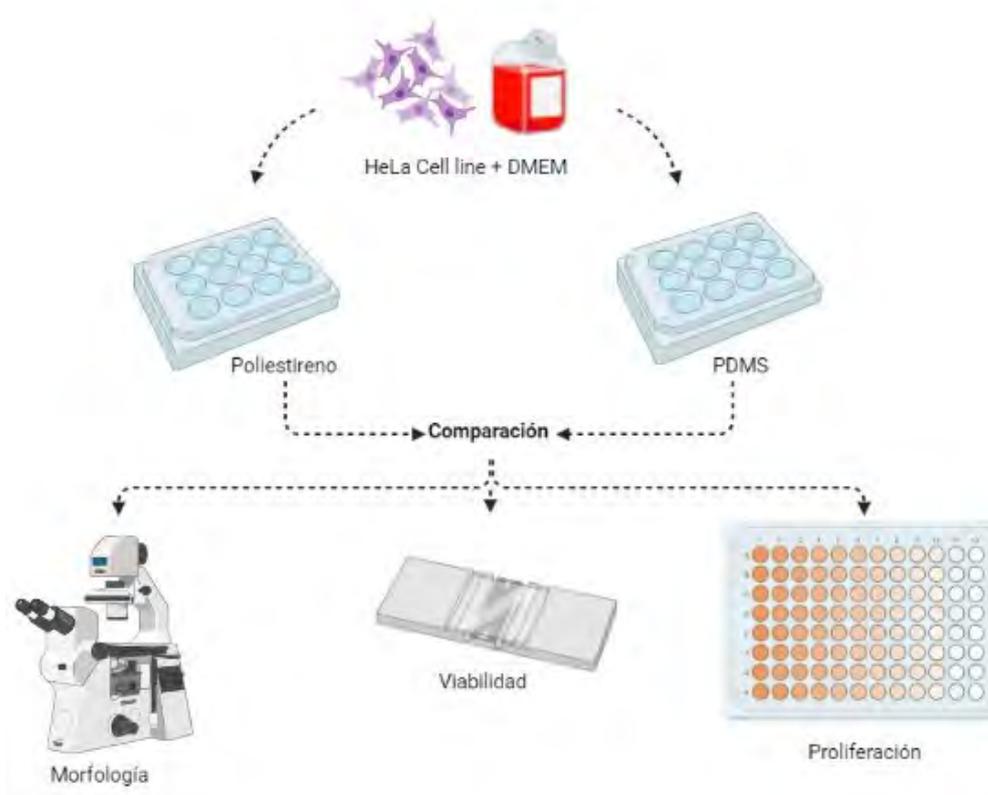


Figura 2.5: Factores a evaluar en la funcionalidad de la plataforma para el crecimiento celular. Creado en BioRender.com

La morfología de las células cultivadas fue evaluada con el microscopio invertido Axio-Vert Bio (Zeiss, Alemania). Las células adherentes como las HeLa tienen forma poligonal con dimensiones más regulares y crecen en monocapa extendida en la superficie. Por lo tanto, en el examen visual, se busca confirmar esta forma de crecimiento como señal del estado saludable de las células y advertir posibles signos de degradación o contaminación. Algunos de las señales de deterioro de las células incluyen granularidad alrededor del núcleo, desprendimiento de las células del sustrato, vacuolación citoplásmica, acumulación celular, inhibición en la extensión

celular y crecimiento no estratificado [103].

Otro factor a evaluar a simple vista es el cambio en la coloración del medio. En el desarrollo de la presente investigación se utilizó el medio DMEM con indicador rojo fenol, por lo tanto, en caso de que se desarrollen contaminantes; el medio se acidificará y dará como resultado un tono naranja; en cambio, si se produce la muerte celular, el medio virará a un color violeta característico de un medio básico. Para sistematizar la evaluación, se elaboró la Tabla 2.8 de verificación del cultivo y su morfología.

Tabla 2.8: Lista de verificación para evaluación del cultivo y su morfología

Criterio	Cumple	No cumple	Observación
Color del medio rojizo – cereza			
Apariencia blanquecina en el medio de cultivo			
Granularidad alrededor del núcleo			
No se observa desprendimiento celular del sustrato			
No se observa vacuolación citoplasmática			
No se observa acumulación celular			
Crecimiento en extensión			
Crecimiento estratificado			
Crecimiento de contaminantes			

La evaluación de la viabilidad celular se realizó por el método de exclusión con el colorante azul de tripano y un hemocitómetro. El principio de esta técnica se basa en que las células viables no captarán el colorante debido a que la membrana celular conserva su integridad, mientras que las células que se tiñen de azul son las que tienen la membrana dañada y carecen de viabilidad [18]. Al ser las HeLa células adherentes, para poder estudiar su viabilidad por el método de exclusión requieren primero ser desadheridas de la superficie de cultivo. Para ello se siguieron los protocolos establecidos para el subcultivo de células con la solución enzimática de tripsina –EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.25 % dadas por el fabricante.

Se inició pipeteando y desechando el medio de cultivo de las plataformas y se procedió a lavar tres veces con PBS frío para eliminar todos los residuos del medio de cultivo. Luego se agregó suficiente reactivo Tripsina –EDTA 0.25 % para cubrir la superficie y se incubó a 37 °C por 5 minutos, se confirmó la desadherencia celular observando en el microscopio de inversión (en caso de no observar suficiente desadherencia, se aumentó 5 minutos de tiempo y se volvió a evaluar), una vez observada la desadherencia de la mayoría de las células se procedió a finalizar la reacción añadiendo medio suplementado con FBS 10 % en proporción 3:1. De la suspensión resultante se tomaron 100 μl , se mezclaron con 400 μl del reactivo azul de tripano 0.4 % (1:4) y se colocaron 10 μl en la cámara de conteo. Luego usando un microscopio en enfoque 10 x, se procedió a realizar el conteo utilizando las líneas del hemocitómetro (Fig. 2.6, según indicaciones estandarizadas [101] este proceso se realizó por triplicado.

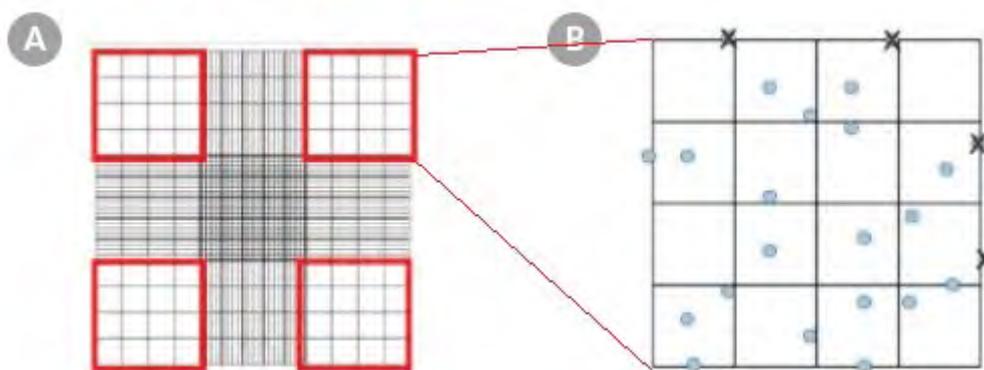


Figura 2.6: Líneas de cuadrícula del hemocitómetro. Diagrama del hemocitómetro que indica (a) los cuatro conjuntos en rojo y (b) los 16 cuadrados dentro de uno de los conjuntos que deben usarse para contar. Recuperado de Stemcell Technologies (2023)

Para calcular la densidad celular, se realizó el conteo de los cuatro cuadros remarcados en rojo (Fig. 2.6a), luego se calculó el promedio de los conteos, se multiplicó por 10 000 (volumen) y por 5 (factor de dilución); el valor final corresponde al número de células viables por ml de la suspensión celular original. Por último, para calcular el porcentaje de viabilidad se sumaron los conteos de células vivas y muertas y así se obtuvo el número total de células; luego se dividió el conteo de células vivas entre el total de células. En este punto se puede considerar el subcultivo, tomando en cuenta el número de células calculados en la suspensión, se puede realizar una

dilución para un subcultivo en un nuevo pocillo recubierto a 1×10^5 células / cm^2 .

La proliferación celular se estimó a través del kit listo para usar del ensayo WST-1, en microplacas de 96 pocillos y con la lectora de microplacas DIAREADER ELX800G (Dialab, Austria).

El reactivo de ensayo WST-1 es considerado como ensayo simple y preciso para medir la proliferación celular, la viabilidad celular y la citotoxicidad en células de mamíferos.

Este método se basa en la escisión de la sal de tetrazolio WST-1 en formazán por deshidrogenasas mitocondriales (Fig. 2.7). A mayor número de células viables, aumenta la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, lo que a su vez da como resultado un aumento en la cantidad de colorante de formazán producido. Este aumento del tinte puede ser cuantificado midiendo la absorbancia del tinte a OD=440 nm. Este ensayo se considera más sensible que los ensayos basados en MTT, XTT o MTS, se puede realizar en la placa de microtitulación y no requiere pasos adicionales como lavado, recolección o solubilización celular.

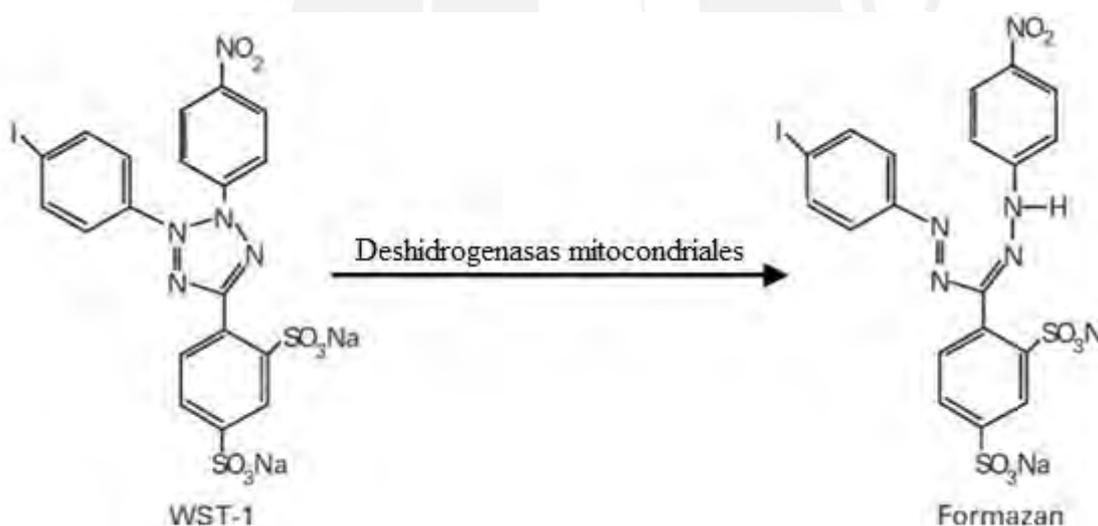


Figura 2.7: La reacción de las deshidrogenasas mitocondriales en contacto con el reactivo WST-1 dando lugar a la formación de formazán en la solución del medio de cultivo. Modificado de [96]

El diseño experimental para la evaluación de proliferación incluyó dos tipos de plataformas: una plataforma convencional de poliestireno tratada para el cultivo celular y otra plataforma elástica elaborada de PDMS. El tiempo de evaluación total de proliferación fue de 96 horas y se realizaron tres repeticiones por cada experimento.

Para llevar a cabo el ensayo, se siguieron las instrucciones del fabricante del kit de Sigma-

Aldrich®: se cultivaron células HeLa en densidad $0.1 - 5 \times 10^4$ células/pocillo en la placa de microtitulación de 96 pocillos en un volumen final de $100 \mu\text{l}$ de medio de cultivo. Las células fueron incubadas por espacio de 24 horas, para luego agregar $10 \mu\text{l}$ de reactivo WST-1 a cada pocillo; como blanco se utilizó un pocillo solo con medio de cultivo y se agregó $10 \mu\text{l}$ de WST-1. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C y $5\% \text{CO}_2$. El proceso se resume en la Fig.2.8.

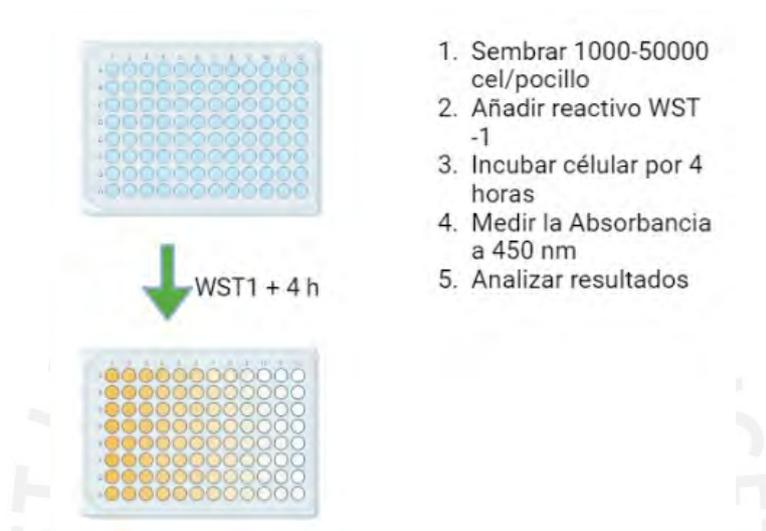


Figura 2.8: Resumen de la metodología del ensayo de proliferación con reactivo WST-1

Antes de la lectura, se agitó la placa por 30 s para mezclar el contenido y proceder con la medida de las absorbancias a $OD = 450 \text{ nm}$ con la lectora de Elisa DIAREader ELX800G (Dialab, Austria). De considerarse apropiado, el ensayo era detenido agregando $10 \mu\text{l}$ de SDS al 1% en cada pocillo. Para la interpretación de los datos se promediaron las lecturas de cada muestra, luego de restar la absorbancia de pocillos con controles negativos, que no contenían células, solo medio de cultivo. La cantidad de absorbancia resulta proporcional al número de células y se presenta en forma de porcentaje (%).

2.7.1. Evaluación de la plataforma inicial

La primera etapa de la evaluación inicial se enfocó en comprobar la compatibilidad con los equipos más utilizados en un laboratorio para el cultivo celular y ensayos toxicológicos, los equipos evaluados fueron: microscopio invertido, incubadora y lectora de microplacas. Se evaluó la plataforma otorgada por Suárez, con dos bases: una de acero Fig.2.9 y otra de PMMA

Fig.2.10 y las tapas tradicionales utilizadas en los sistemas de cultivos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



Figura 2.9: Base de acero para la plataforma de microtitulación fabricada en PDMS.

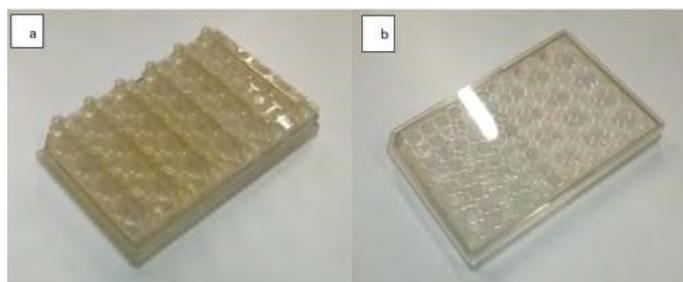


Figura 2.10: Plataforma de microtitulación fabricada en PDMS en base de PMMA. Plataforma sin tapa, con surcos para flujo (a), plataforma con tapa (b).

Microscopio invertido

Se realizó la evaluación en el microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss), en primera instancia resultó evidente que la base de acero no permitiría el paso de luz en el microscopio y, por lo tanto, la visualización resulta incompatible con dicho material, por lo que fue rápidamente descartado.

Al observar la plataforma bajo el microscopio invertido (Fig. 2.11), se pudo notar con objetivo

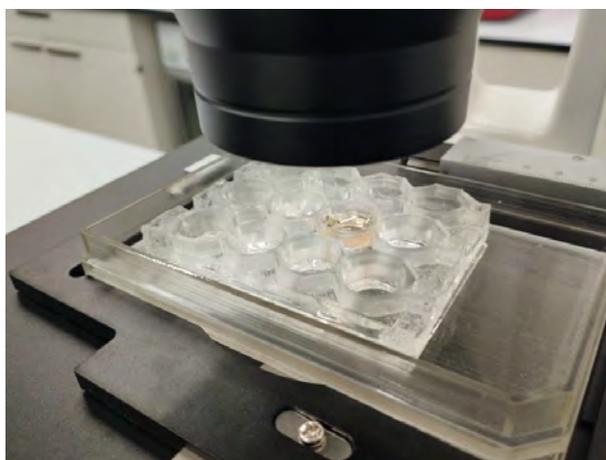


Figura 2.11: Plataforma elástica con medio de cultivo situada en microscopio invertido.

5X las particulares topografías no intencionadas de los materiales usados, así como muestras significativas de contaminación, tal como muestra la Fig. 2.12.

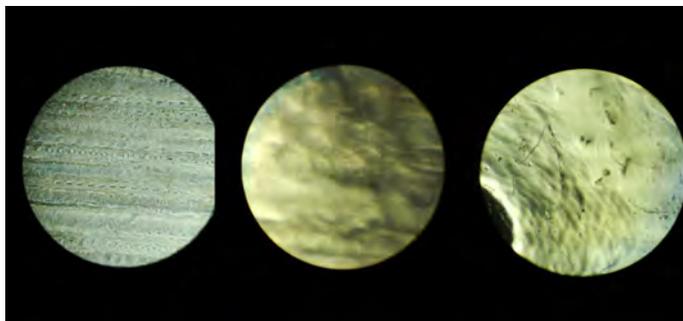


Figura 2.12: Plataforma en microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss) a 5X. Se muestran distintas capas de la plataforma con medio de cultivo DMEM.

Diversos factores se pueden atribuir a la baja visibilidad mostrada por la plataforma, uno de ellos es la base de la plataforma, misma que le agregó 30 mm de altura, además que el proceso de fabricación de la misma no guarda aspectos asépticos y el material utilizado para los moldes, por ser termosensible, tampoco permite formas de desinfección óptimas.



Figura 2.13: Vista en microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss) con medio de cultivo DMEM. 5X. Barra de escala 200 µm.

Por tales motivos, se decidió descartar la base de PMMA y se procedió a observar solo la plataforma de PDMS con medio DMEM adaptada en una placa de Petri desechable con el fin de

determinar si solo la modificación de la base podría permitir una visualización por microscopía invertida.

Los resultados en la Fig. 2.13 demostraron que, no solo la base de plataforma debía ser modificada, sino que se debía replantear el método de fabricación para evitar la formación de burbujas y la presencia de contaminación cruzada.

Realizadas las observaciones iniciales se procedió a completar la tabla de verificación ideada para la evaluación. Los resultados obtenidos se pueden resumir en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9: Evaluación de la compatibilidad con el microscopio invertido

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo	x		
Permite el paso de luz para la visualización	x		
Permite la observación del fondo de la plataforma		x	
Permite distinguir formas celulares de posibles contaminantes		x	

Incubadora

La función de una incubadora en un laboratorio de cultivo celular es mantener la temperatura, % humedad y % CO₂ en las condiciones idóneas para cumplir los requerimientos de los cultivos y favorecer su desarrollo. Por lo tanto, se consideró como un factor crucial su compatibilidad con la nueva plataforma elástica.

Se evaluó la factibilidad que ofrecía para mantener el cultivo por periodos mínimos de 72 horas (tiempo promedio de evaluaciones toxicológicas), ofreciendo estabilidad en cuanto a temperatura, % CO₂ y % humedad. Fueron tres los ítems a considerar en evaluación y se describen en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10: Evaluación de la compatibilidad con la incubadora

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo	x		
Permite la difusión y equilibrio de CO ₂ y humedad		x	
Permite el cierre de la incubadora	x		

La concentración de los gases ambientales CO₂ y O₂ pueden dar lugar a desviaciones inesperadas en el pH. Asimismo, el control activo de la humedad anula el impacto de la evaporación, minimizando así los cambios en la osmolaridad y evita la formación de burbujas [59]. Si bien la plataforma cumplió con dos de los tres factores evaluados, se observó que la base y la tapa del sistema de plataforma de microtitulación elástica le confieren un cierre hermético a la plataforma, evidenciándose incluso gotas de vapor en la contratapa tras 2 horas de incubación (Fig. 2.14).

Este proceso puede resultar perjudicial en el delicado balance bioquímico de los medios de cultivo, así como favorecer la sobre-evaporación y modificar en balance de pH.

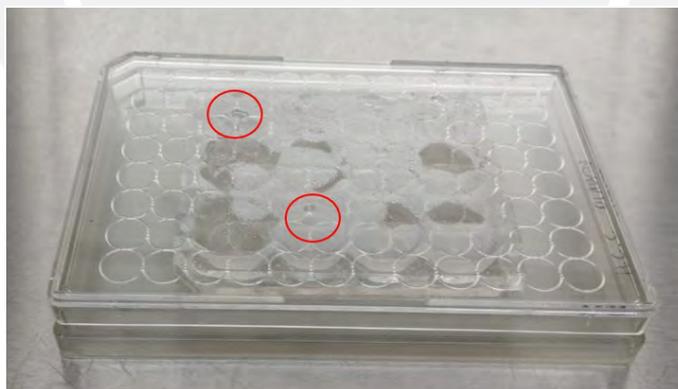


Figura 2.14: Evaluación de la plataforma elástica en incubadora tras 72 horas de cultivo. Se observa el vapor formado en la tapa del sistema debido a la evaporación de medio de cultivo, se pueden visualizar gotas del vapor (en rojo) del medio en la tapa del sistema.

Lectora de microplacas

El uso de las lectoras de microplacas resulta de gran utilidad en los laboratorios de cultivos al realizar evaluaciones de citotoxicidad, ya que resultan en un método rápido, eficaz y altamente reproducible. El modelo convencional de este equipo cuenta con un espacio lateral

donde se inserta la plataforma de cultivo sin tapa (Fig. 2.27a), al cerrar el equipo la plataforma es introducida en el mismo a través de un sistema de correas y se procede con la lectura de la absorbancia a la longitud determinada. Por lo tanto, la compatibilidad de este equipo reside en permitir el ingreso de la plataforma elástica en el espacio determinado para su posterior lectura (Fig. 2.27b).

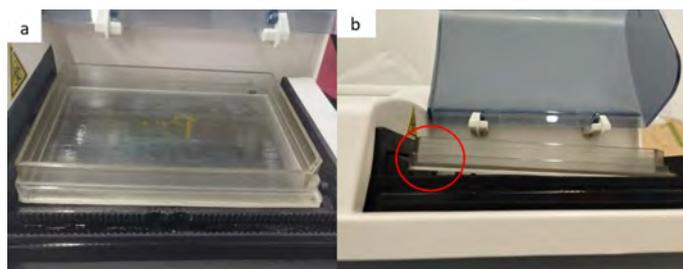


Figura 2.15: Evaluación de la compatibilidad de la lectora de microplacas DIAREader ELX800G (Dialab, Austria). (a) Vista superior de la base, (b) vista lateral en, en círculo rojo, parte de la plataforma incompatible con el equipo.

Las pruebas realizadas mostraron una gran limitante, la base para la plataforma elástica no era compatible con el equipo, ya no se logró posicionar la placa en el mismo, menos aún permitió realizar mediciones de prueba en la plataforma. La evaluación realizada se puede resumir en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11: Evaluación de la compatibilidad con la lectora de microplacas

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo		x	
Permite el paso de luz para la visualización		x	
Permite registrar mediciones		x	

Al ser la lectora de microplacas un equipo estandarizado en las evaluaciones toxicológicas, se debe considerar replantear el diseño de la base de plataforma para que permita su ingreso y evaluación en el equipo.

2.8. Evaluación del crecimiento y proliferación de un cultivo celular de células adherentes

Para poder evaluar el crecimiento de un cultivo celular, se continuó reemplazando la base de la plataforma con una placa Petri descartable. Asimismo, se elaboraron nuevas plataformas de PDMS siguiendo lineamientos y recomendaciones de Buenas Prácticas de Manufactura [60], de tal manera que permitiera la diferenciación entre células y contaminantes.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para evaluar la reproducibilidad de los datos y se usó como control el crecimiento de la línea celular HeLa en una placa comercial de poliestireno de cultivo celular. Se realizó la evaluación de la morfología, proliferación y viabilidad.

2.8.1. Morfología

Se evaluó el crecimiento celular en una incubadora húmeda a 37 °C y 5% CO₂. La evaluación se realizó a las 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas después del cultivo; se observó el cultivo en el Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania) con enfoque 10X y se tomaron fotografías en los periodos de tiempo establecidos a través de ZEN Imaging Software.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la línea celular HeLa fue DMEM alto en glucosa, con L-glutamina, 10% FBS y 1x de antibiótico—antimicótico, y fue utilizado tanto en la plataforma convencional de poliestireno como en la plataforma elástica de PDMS.

En el sistema control de poliestireno, se observó que a las 0 horas las células tenían forma circular y se encontraban por toda la placa (Fig. 2.16a), pasadas 24 horas se observó cómo las células HeLa empezaron a adherirse a la plataforma y mostrar su típica forma y expansión en forma mosaico, a las 60 horas se verificó la confluencia del cultivo (Fig. 2.16b), mientras que a las 72 horas se empezaron a notar cúmulos celulares, al carecer las células de espacio para continuar su crecimiento.

El ensayo del crecimiento de la línea celular HeLa en la plataforma de PDMS nativo se realizó bajo las mismas condiciones que el ensayo realizado en poliestireno. A diferencia de lo observado en la Fig. 2.16a, las células HeLa no logran expandirse en la superficie de la plataforma, sino que las células se alejan de los bordes, tal como se muestra en la Fig. 2.17. Se evaluó

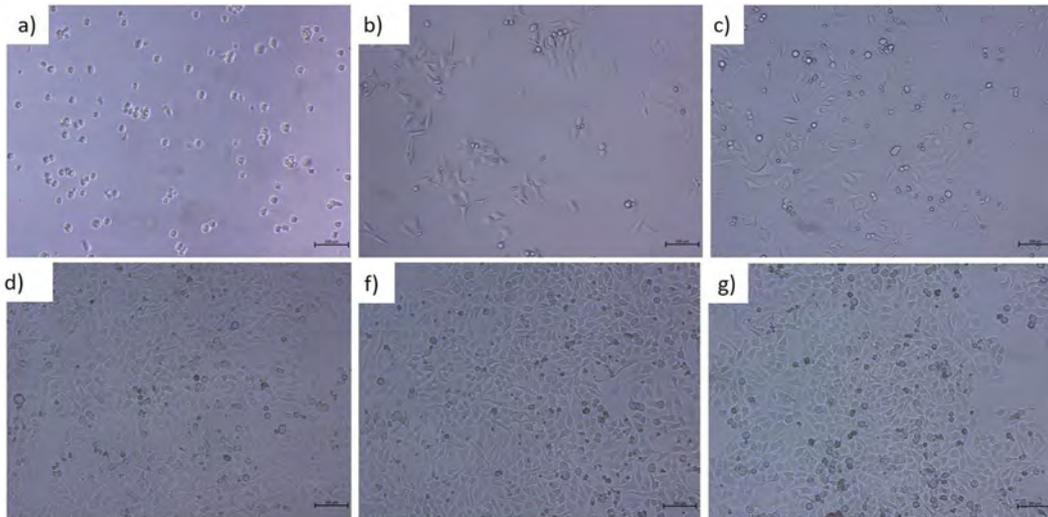


Figura 2.16: Morfología de la línea celular HeLa en placa de cultivo de poliestireno comercial para cultivo celular. Crecimiento de la línea celular de adenocarcinoma propagado en una plataforma PDMS, 0 horas (a), 24 horas (b), 36 horas (c), 48 horas (d), 60 horas (e) y 72 horas (f). Barra de escala: 100 μm . Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.

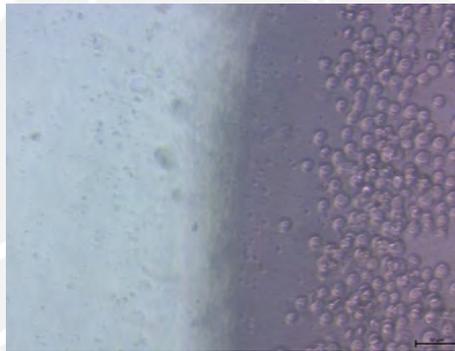


Figura 2.17: Cultivo línea celular HeLa en la plataforma de PDMS 0 h. Se observa que las células repelen el borde de PDMS. Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania) aumento 20X. Escala 50 μm .

el crecimiento tomando los mismos intervalos de tiempo utilizados en la evaluación de la plataforma de poliestireno, así como las mismas condiciones. En la Fig. 2.18, se observa que a las 24 horas las células no logran la formación en mosaicos extendidos, sino que la aglomeración celular empieza antes, ni lograron llegar a confluencia a las 60 horas. Por otro lado, la acumulación celular, debido al agrupamiento empieza a notarse a las 36 horas postcultivo (Fig. 2.18c), este fenómeno ya ha sido reportado por otros autores como [39, 85], quienes lo atribuyeron a a la poca hidrofiliidad de la superficie de PDMS, que impediría la adherencia de las células y, por lo tanto, inhibe su expansión y terminan creciendo una sobre otra.

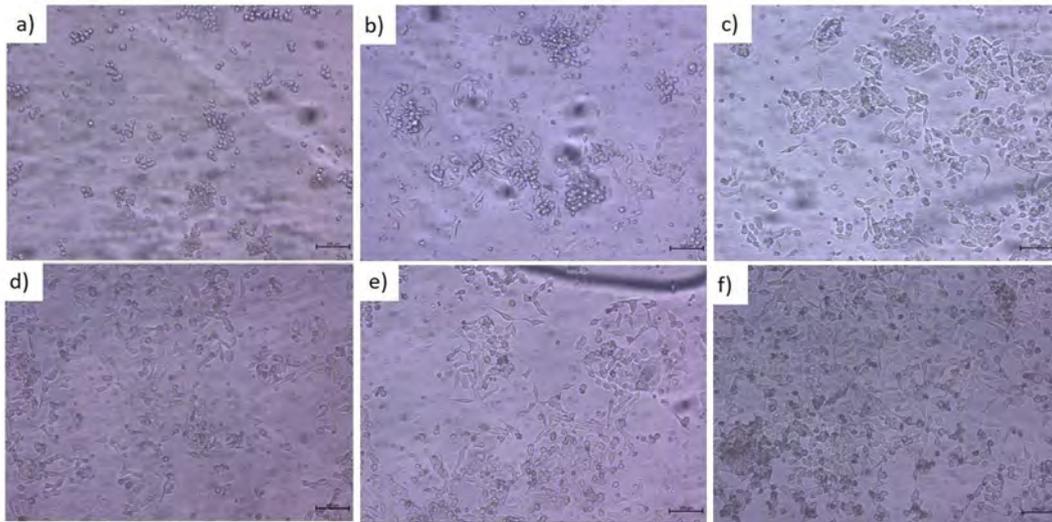


Figura 2.18: Morfología de la línea celular HeLa en PDMS. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 36 horas, (d) 48 horas, (e) 60 horas y (f) 72 horas. Barra de escala: $100 \mu\text{m}$. Microscopio Invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X

2.8.2. Viabilidad

La viabilidad de las células en ambas plataformas: PDMS y poliestireno, se evaluó a través del método de exclusión con azul de tripano y con el uso de un hemocitómetro. A medida que las células en los pocillos de control alcanzaron la confluencia, después de 72 horas de cultivo, se procedió a desadherir las células de las plataformas utilizando tripsina/EDTA 0.25 %, siguiendo las indicaciones del fabricante, y se contó el número total de células. Los recuentos de células para la viabilidad y la proliferación se realizaron por triplicado y se expresaron utilizando el promedio y la desviación estándar.

Se encontró que las células del control contaban con una viabilidad de 98.04 % con D.E. ± 0.44 mientras que las células en la plataforma elástica de PDMS presentaron una viabilidad de 79.83 % con D.E. ± 0.35 . Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) entre los datos obtenidos, se encontró que $p < 0.05$, por lo tanto, sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad de ambas plataformas (Fig. 2.19).

La densidad celular del cultivo en la superficie de PDMS tras 72 horas de cultivo fue de $768,333 \text{ cel/ml}$ con D.E. $\pm 100,000$; mientras que la densidad celular en el mismo periodo, pero en la plataforma de poliestireno fue de $868,333 \text{ cel/ml}$ con D.E. $\pm 79,931$ (Fig. 2.20). Se realizó un ANOVA para determinar diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($n=3$), donde

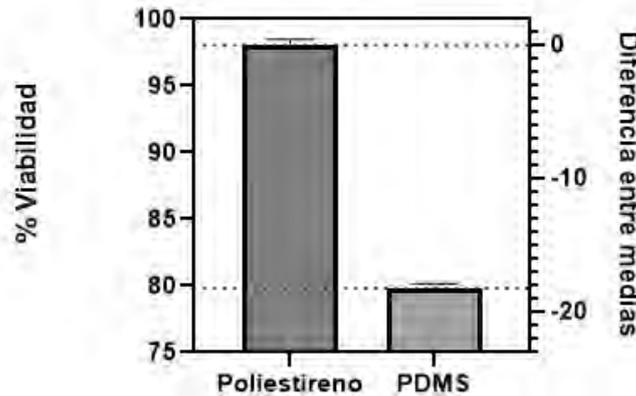


Figura 2.19: Evaluación de viabilidad de la línea celular HeLa tras 72 horas de cultivo en la plataforma elástica de PDMS. ANOVA $p < 0.05$. Preparado con GraphPad Prism 9.5.1

se obtuvo que $p > 0.05$; por lo tanto, se concluye que no existe diferencia significativa.

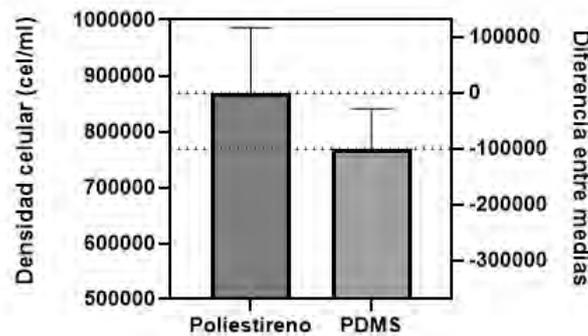


Figura 2.20: Evaluación de la densidad de la línea celular HeLa tras 72 horas de cultivo en la plataforma elástica de PDMS. ANOVA $p > 0.05$. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1

2.8.3. Proliferación

La proliferación celular fue evaluada a lo largo de los 4 días de crecimiento cada 4, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas. Los ensayos fueron realizados siguiendo las indicaciones del fabricante del kit WST-1, los resultados en porcentaje se muestran en la Tabla 2.12 y Fig. 2.21.

Tabla 2.12: Porcentaje de proliferación de la línea celular HeLa en superficie de PDMS y poliestireno por 96 horas

Horas	Poliestireno	PDMS
0	1.00 %	1.00 %
4	10.00 %	12.00 %
24	23.42 %	11.20 %
36	56.42 %	23.40 %
48	86.40 %	44.20 %
60	91.10 %	49.80 %
72	98.20 %	55.10 %
84	122.30 %	62.20 %
96	142.90 %	69.90 %

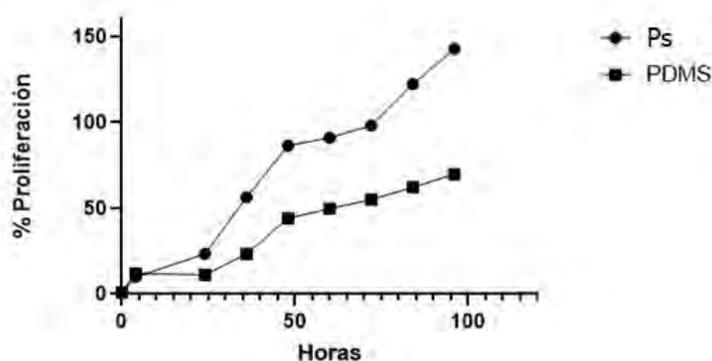


Figura 2.21: Ensayo WST-1. Crecimiento HeLa en PDMS. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1

La diferencia en la proliferación celular en superficies de PDMS y poliestireno, resultó notoria. Mientras que el sistema control superó el 100 % (equivalente a 10^6 *cel/ml*) pasadas las 72 horas; el cultivo en PDMS no logró llegar a confluencia ni al finalizar el periodo de 96 horas de incubación. [80] utilizó el ensayo de MTT para evaluar la proliferación en superficies de PDMS modificados, obteniendo valores de hasta 99 %, sin embargo, no reporta el crecimiento en la superficie no modificada.

Por otro lado, [56] cultivaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo por

10 días, al finalizar este periodo evaluaron la viabilidad del cultivo a través del ensayo MTT, encontrando una mayor viabilidad en la superficie de PDMS que en una plataforma control de poliestireno; este comportamiento de células primarias aisladas difiere de lo reportado por otros trabajos con líneas celulares inmortales, por lo que se podría asumir algún beneficio, aún por definir, hacia este tipo celular debido a las propiedades del material.

2.8.4. Optimización de diseño y proceso de fabricación

Los reactivos Triton X-100, Solución de Collagen I, Bovine Serum Albumin (BSA), Pluronic – 127, Slygard 184, fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Los instrumentos y equipos fueron cámara digital Canon EOS 1300, EF-S 18-55 IS II (Tokio, Japón), micropipeta de 10 μ l, software ImageJ, hemocitómetro convencional provista por la empresa Isolab (Wertheim, Alemania), microscopio invertido Zeiss A1, Axiocam ERC 5s, las imágenes analizadas con software (Jena, Alemania), lectora de microplacas DIAREader ELX800G (Dialab, Austria), incubadora para cultivo celular Heracell™ VIOS 160i CO2 (Nuevo Hampshire, Estados Unidos), autoclave VS-2/1-L de la empresa Steelco (Riese Pio, Italia), incubadora ECOCELL® de MMM Group (Munich, Alemania), sonicador JP Selecta™ 3000617.

Con el fin de mejorar el proceso de manufactura se reformuló el proceso de elaboración de la plataforma elástica de microtitulación tomando como base la guía de buenas prácticas de manufactura (BPM) de dispositivos médicos y medicamentos [60], las cuales indican los procedimientos requeridos para la elaboración de productos que reúnan la calidad de acuerdo a las especificaciones aprobadas en el Registro Sanitario (Digemid). Las BPM de dispositivos médicos y medicamentos cuentan con dos pilares de: no confusión y no contaminación; siendo este último el principio considerado como crítico para ensayos de cultivos celulares. Por lo tanto, el nuevo protocolo se ideó reforzando las condiciones de sanitación e higiene con el fin de evitar contaminación cruzada, ya sea de materia prima o residuos.

Tal como indica la guía, se verificó que las áreas dispuestas para el proceso de fabricación facilitarían la secuencia de operaciones; así como los requisitos de limpieza y esterilidad. Por otro

lado, se verificó que cada paso del protocolo sea necesario, es decir se eliminaron pasos adicionales no indispensables con el fin de minimizar la manipulación del producto y reducir, aún más, las posibilidades de contaminación. Asimismo, se aseguró una buena iluminación del área de manufactura, que permitiera la inspección visual del producto en fabricación.

Por último, se procuró que el área de manufactura cuente con sistemas de extracción adecuados para evitar una potencial contaminación cruzada, así como la acumulación de polvo.

Modificación de la superficie

Se realizó la modificación de las superficies de las plataformas de PDMS a través de dos métodos: recubrimiento proteico y mezcla con surfactantes (Fig. 2.22).

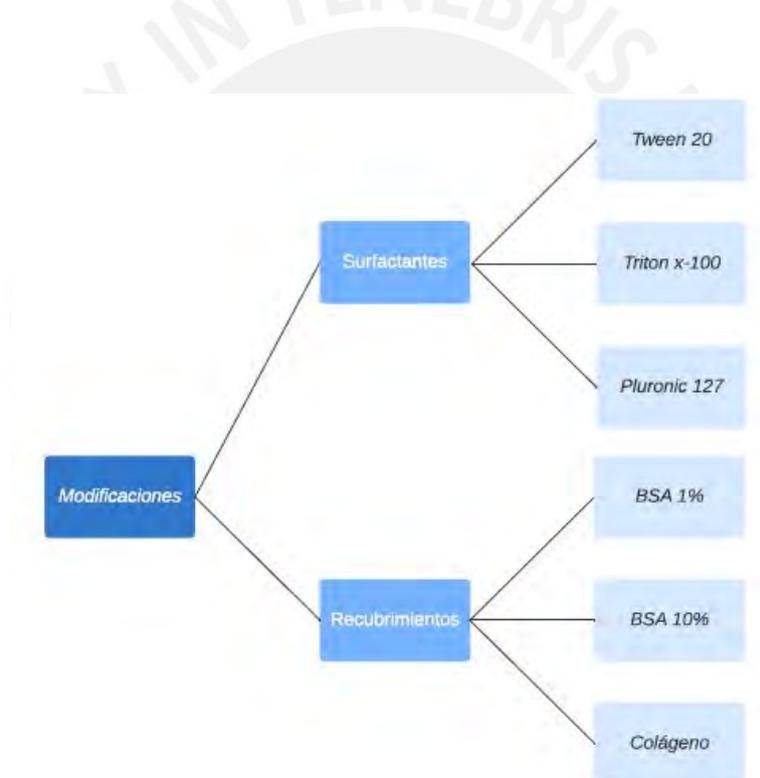


Figura 2.22: Métodos y reactivos utilizados para la modificación de la superficie de la plataforma de PDMS.

En el caso de los surfactantes se siguió la metodología descrita en investigaciones previas con modificaciones [56]. La mezcla con el surfactante se realizó antes del proceso de polimerización, las proporciones utilizadas se muestran en la Tabla 2.13.

Tabla 2.13: Concentraciones utilizadas para la mezcla de surfactantes con el pre-polímero de PDMS

Surfactante	Concentración	Código utilizado
Tween 20	1.000 %	Tw1
Pluronic 127	0.002 %	Pc2
Pluronic 127	0.006 %	Pc6
Pluronic 127	0.010 %	Pc10
Triton x - 100	1.000 %	Tx1
Triton x - 100	2.000 %	Tx2
Triton x - 100	3.000 %	Tx3

Por otro lado, el recubrimiento con proteínas se realizó siguiendo las instrucciones dadas por los fabricantes de recubrimientos comerciales. En este caso se tomaron las instrucciones ideadas para la solución de recubrimiento de colágeno [101], con modificaciones y descritas a continuación. Se colocó una capa delgada de solución de proteína en la superficie del pocillo a recubrir (200 μ l es suficiente para cubrir la superficie de cada uno de los pocillos); se dejó en reposo la solución por espacio de 2 horas a temperatura ambiente (Tabla 2.14).

Tabla 2.14: Concentraciones y códigos para recubrimientos con proteína de superficies de PDMS

Proteína	Concentración	Código utilizado
Colágeno tipo I	3 mg/ml	Co1
Albúmina de suero bovino (BSA)	1 %	BSA1
Albúmina de suero bovino (BSA)	10 %	BSA10

Finalizado este periodo, se procedió a remover el exceso de la solución y se dejó la plataforma abierta en la cabina de bioseguridad por al menos 1 hora, o hasta que la superficie esté completamente seca y se procedió a realizar la medición de los ángulos de contacto de cada una de las muestras, con la cámara Canon EOS 1300, EF-S 18-55 IS II y el software ImageJ.

2.8.5. Nuevo protocolo de manufactura y esterilización de la plataforma elástica de microtitulación

El nuevo protocolo ideado se diseñó en congruencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) de dispositivos médicos. Con el fin de procurar condiciones estériles y reducir las oportunidades de contaminación se determinaron los siguientes procesos como clave:

- Usar materiales limpios, libres de polvo y estériles.
- Procurar condiciones asépticas durante el proceso de elaboración.
- Eliminar el uso de la campana de extracción.
- Eliminar el lavado con IPA e hisopo (debido a las pelusas que libera y que no logran ser eliminadas tras el proceso de sonicación).
- Eliminar el proceso de sonicación con alcohol.
- Eliminar la base de acero.
- Cambiar el diseño de la base de polyclear para lograr compatibilidad con la lectora de microplacas.
- Eliminar el uso de formaldehído como agente desinfectante (debido a su alta toxicidad y la capacidad de absorción del PDMS).
- Cambiar los moldes para la base de la plataforma por tapas de placas de cultivo rescatadas (debido a las irregularidades en la superficie dejadas por los otros moldes).

La elaboración de la plataforma de PDMS se realizó a través de la unión de las instrucciones de [94] y la metodología de curado parcial. Los pasos para la elaboración de los moldes se describen a continuación:

En un recipiente limpio (libre de polvo y contaminantes), se mezcló de manera manual los dos componentes de Slygard 184 en proporción 20:1 (en peso) por 10 minutos; se colocaron al vacío a - 0.95 atm por espacio de 46 - 60 minutos (o hasta ya no observar burbujas). Finalizado este periodo se vació la mezcla en los moldes seleccionados (evitando la formación de burbujas).

Nuevamente se aplicó vacío, pero de manera gradual hasta llegar a 0.95 atm, por aproximadamente 20 minutos. Los moldes se incubaron a 65 °C por 2 horas y se procedió a desmoldar cuidadosamente el molde de la parte superior de la plataforma (en este punto, aún tiene maleabilidad, mientras que los moldes de las bases se encuentran curados) y se colocaron las piezas desmoldadas en las bases (aún adheridas a sus moldes), se aplicó presión y se finalizó el curado de las plataformas a 65 °C por 4 horas. El proceso se resume en la Fig. 2.23.

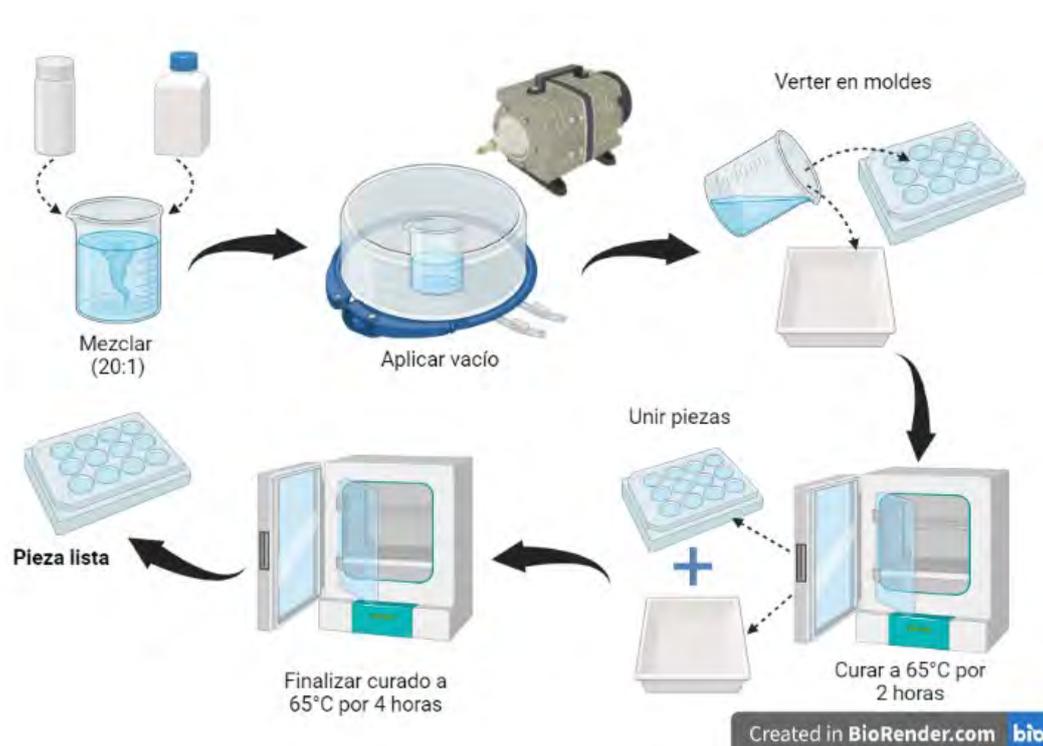


Figura 2.23: Metodología para la elaboración de la plataforma de PDMS. Creado en BioRender.com.

Por otro lado, el proceso de esterilización también se vio modificado. En este caso se idearon dos protocolos de esterilización para la nueva plataforma y fueron aplicados a la pieza de PDMS o a la base y tapa, la distribución se expone en la Tabla 2.15.

- Protocolo 1: Autoclave modo descontaminación (137 °C, 1.25 atm, 45 min)
- Protocolo 2: Alcohol 70 % (30 min) + UV 1h

Tabla 2.15: Protocolo de esterilización aplicado a cada pieza de la plataforma de microtitulación elástica

Pieza	Protocolo 1	Protocolo 2
PDMS	x	
Base		x
Tapa		x

Antes de usar, enjuagar 3 veces con PBS o Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)

Se procedió a repetir la evaluación realizada en el capítulo anterior de la compatibilidad de la plataforma con los equipos seleccionados: microscopio de inversión, incubadora y lectora de microplacas.

Microscopio de inversión

Al seguir las indicaciones de BPM, se evitaron en gran medida la presencia de contaminantes y la formación de burbujas que interfirieran en la visualización y distinción de las células. En la Fig. 2.24, se puede observar claras diferencias entre ambas plataformas; por ejemplo, la presencia de objetos extraños es mínima, y puede ser comparable a las interferencias observadas en las plataformas comerciales. Por lo que se puede afirmar que el nuevo proceso de fabricación garantiza una visualización celular efectiva (Tabla 2.16).

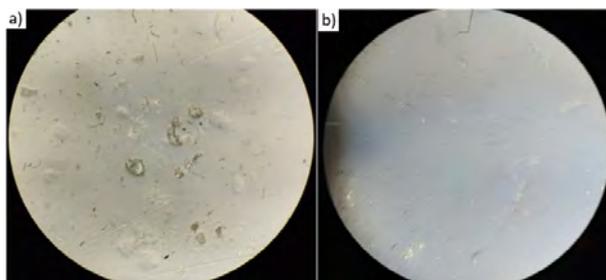


Figura 2.24: Vista de la plataforma d PDMS en microscopio invertido. (a) modelo inicial, (b) siguiendo las BPM. Aumento 10 X. Microscopio invertido (Zeiss, Alemania) cámara digital A1, Axiocam ERC 5s.

Tabla 2.16: Evaluación de la compatibilidad de la plataforma modificada con el microscopio invertido

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo	x		
Permite el paso de luz para la visualización	x		
Permite la observación del fondo de la plataforma	x		
Permite distinguir formas celulares de posibles contaminantes	x		

Las modificaciones realizadas en el proceso de fabricación demostraron reducir la contaminación cruzada, así como otras interferencias a niveles mínimos que no interfieren con el proceso de visualización

Incubadora

Las nuevas bases empleadas para la construcción de las plataformas permiten el ingreso de gases y mejor control de la humedad (Fig.2.25). Esto se logró gracias al nuevo diseño de base de la plataforma, que siguiendo el modelo de las plataformas comerciales no genera un cierre hermético entre la plataforma y su tapa, y fue comprobado en la lista en la verificación (Tabla 2.17).



Figura 2.25: Plataforma de PDMS en la incubadora para cultivos Heracell™ VIOS 160i CO2 (Nuevo Hampshire, Estados Unidos).

Tabla 2.17: Evaluación de la compatibilidad de la plataforma elástica modificada con la incubadora

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo	x		
Permite la difusión y equilibrio de CO ₂ y humedad	x		
Permite el cierre de la incubadora	x		

Lectora de microplacas

Asimismo, los nuevos cuidados durante el desarrollo de la plataforma de PDMS, dio como resultado una plataforma de considerable transparencia, comparable con una plataforma tradicional de poliestireno. Con la gentil colaboración de Suárez (ICOBA – PUCP) se logró acoplar una plataforma de 96 pocillos de PDMS para su evaluación en la lectora de microplacas. La nueva base se observa en la Fig. 2.26.

Tal como se muestra, el mejor método para alcanzar la compatibilidad del sistema fue con la adaptación de un marco (Fig. 2.26a) y la construcción de una pieza monolítica de PDMS (Fig. 2.26b). Se comprobó su compatibilidad con el equipo tal como se muestra en la Fig. 2.27.

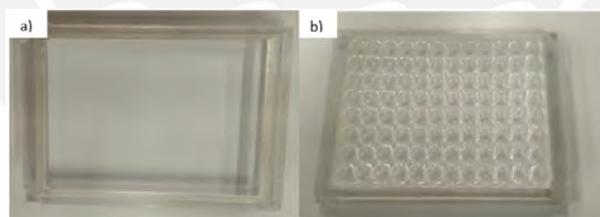


Figura 2.26: Plataforma de microtitulación de 96 pocillos de PDMS: (a) Soporte/marco de la plataforma, (b) plataforma armada. Los planos del diseño se pueden encontrar en Anexo 1.

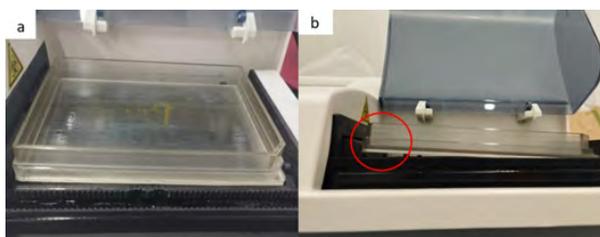


Figura 2.27: Compatibilidad de la plataforma con la lectora de microplacas. (a) Base inicial de la plataforma en la lectora de microplacas (se muestra incompatibilidad con la lectora), (b) nuevo diseño de base.

Por último, se realizaron lecturas cuantitativas, con el objetivo de confirmar dos aspectos, el correcto funcionamiento del equipo con la nueva plataforma, y la confiabilidad de los datos obtenidos, ya que se realizaron comparativas con una plataforma comercial. Los resultados se muestran en la Fig. 2.28.

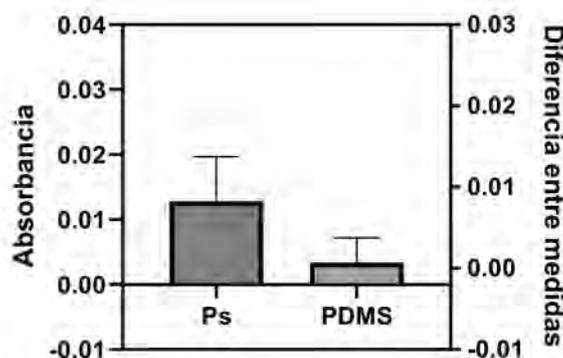


Figura 2.28: Valores de absorbancias obtenidos en la lectora de microplacas DIAREader ELX800G (Dialab, Austria). $p > 0.05$. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1

Los experimentos se repitieron tres veces independientes ($n = 3$) para evaluar la reproducibilidad de los datos. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 9.5.1. Todos los datos se representan como media \pm desviación estándar de la media. Se realizó un análisis de T de student para evaluar la significancia estadística entre las medias, donde se obtuvo un valor de ($p > 0.05$), por lo tanto, se puede asumir que no existe diferencia entre las medidas de absorción de ambos grupos. Las evaluaciones de compatibilidad realizadas para la lectora de microplacas se resumen en la Tabla 2.18.

Tabla 2.18: Evaluación de la compatibilidad de la plataforma elástica modificada con la lectora de microplacas

Característica	Cumple	No cumple	Observaciones
Permite posicionar la placa de cultivo en el equipo	x		
Permite el paso de luz para la visualización	x		
Permite registrar mediciones	x		

2.8.6. Modificación de la hidrofobicidad

El proceso de modificación de la hidrofobicidad de las superficies de las plataformas de PDMS, se desarrolló según descrito en la parte metodológica. Durante el proceso de elaboración de las plataformas con surfactantes (en concentraciones mínimas) se observó un cambio considerable en la transparencia de las mismas, llegando a un aspecto opaco tal como se muestra en la Fig. 2.29. Este fenómeno de opacidad del material también fue reportado anteriormente [35,

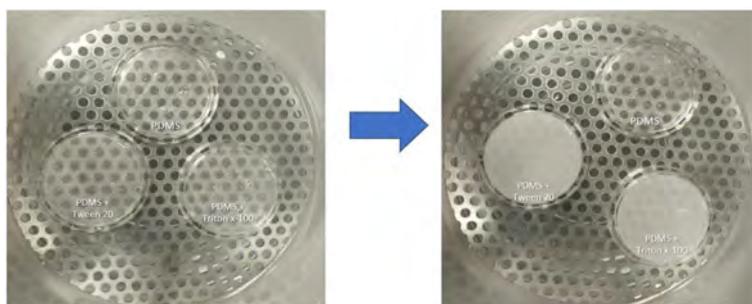


Figura 2.29: Muestras de PDMS con surfactantes. (a) Mezcla recién realizada previa a desgasificación, (b) El cambio en la coloración se observa pasado 30 minutos de la mezcla inicial y se mantiene hasta el final del proceso de elaboración.

84], donde los elastómeros curados no eran ópticamente transparentes, sino más bien turbios y opacos; este fenómeno fue explicado a través de la no compatibilidad de los componentes, donde la introducción de surfactantes en el PDMS sin curar finalmente conduce a su reacción con el prepolímero a través de enlaces covalentes en presencia de catalizador de Pt. Por otro lado, la modificación de las superficies, a través de recubrimientos con BSA y colágeno, no ocasionó cambios visuales en las plataformas.

Finalizado los procesos de modificación y recubrimientos se procedió a medir el ángulo de contacto de agua de cada superficie. Los resultados de las medidas de ángulos de contacto de cada una de las superficies se muestran en la Fig. 2.30.

Todos los experimentos se hicieron en tres réplicas independientes ($n = 3$) para evaluar la reproducibilidad de los datos. Para cada superficie se realizaron 7 medidas de ángulo de contacto. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 9.5.1 y el software ImageJ para medir el ángulo de contacto.

Todos los datos se representan como media \pm desviación estándar de la media. Se realizó ANO-

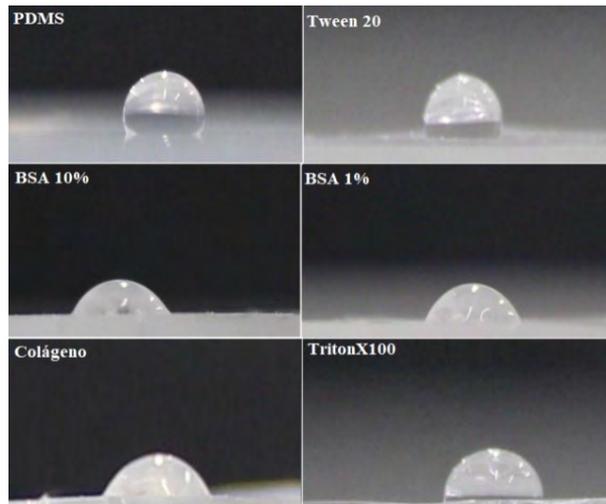


Figura 2.30: Fotografías tomadas para la evaluación del ángulo de contacto en las distintas superficies modificadas, Cámara digital Canon EOS 1300, EF-S 18-55 IS II.

VA unidireccional para evaluar la significancia estadística entre las medias, con pruebas post hoc de Tukey para la comparación entre las medias. Se consideró estadísticamente significativa una $p \leq 0.05$. Los resultados se muestran en la Tabla 2.19 y Figura 2.31. Los resultados se complementaron con una prueba de Tukey para conocer la diferencia entre grupos.

Tabla 2.19: Datos promedios de ángulos de contacto y desviaciones estándar.

Superficie	Media (°)	D.E.
Ps	54.14	2.24
PDMS	113.98	0.70
BSA1	56.08	0.74
BSA10	62.54	0.83
Co1	59.86	0.64
Tw1	92.74	0.72
Tx1	112.70	1.56
Tx2	91.30	1.09
Tx3	87.00	1.70
Pc2	114.20	1.68

Pc6	86.42	3.16
Pc10	108.22	3.68

El análisis del ángulo de contacto del agua muestra que se logró modificar la hidrofobicidad de manera significativa ($p < 0.05$). Para conocer entre qué muestras se obtuvo una diferencia significativa y qué muestras tienen una hidrofobicidad similar, se realizó una prueba de Tukey múltiple, los resultados se muestran en la Tabla 2.20.

Tabla 2.20: Prueba múltiple comparativa de Tukey con diferencias medias y valor P

Comparación	Diferencia media	Dif. CI 95.00 %	Valor P
Ps vs. PDMS	-59.84	-63.88 to -55.80	<0.0001
Ps vs. BSA1	-1.940	-5.979 to 2.099	0.8775
Ps vs. BSA10	-8.400	-12.44 to -4.361	<0.0001
Ps vs. Co1	-5.720	-9.759 to -1.681	0.0008
Ps vs. Tw1	-38.60	-42.64 to -34.56	<0.0001
Ps vs. Tx1	-58.56	-62.60 to -54.52	<0.0001
Ps vs. Tx2	-37.16	-41.20 to -33.12	<0.0001
Ps vs. Tx3	-32.86	-36.90 to -28.82	<0.0001
Ps vs. Pc2	-60.06	-64.10 to -56.02	<0.0001
Ps vs. Pc6	-32.28	-36.32 to -28.24	<0.0001
Ps vs. Pc10	-54.08	-58.12 to -50.04	<0.0001
PDMS vs. BSA1	57.90	53.86 to 61.94	<0.0001
PDMS vs. BSA10	51.44	47.40 to 55.48	<0.0001
PDMS vs. Co1	54.12	50.08 to 58.16	<0.0001
PDMS vs. Tw1	21.24	17.20 to 25.28	<0.0001
PDMS vs. Tx1	1.280	-2.759 to 5.319	0.9935
PDMS vs. Tx2	22.68	18.64 to 26.72	<0.0001
PDMS vs. Tx3	26.98	22.94 to 31.02	<0.0001

Tabla 2.20: Prueba múltiple comparativa de Tukey con diferencias medias y valor P

Comparación	Diferencia media	Dif. CI 95.00 %	Valor P
PDMS vs. Pc2	-0.2200	-4.259 to 3.819	>0.9999
PDMS vs. Pc6	27.56	23.52 to 31.60	<0.0001
PDMS vs. Pc10	5.760	1.721 to 9.799	0.0007
BSA1 vs. BSA10	-6.460	-10.50 to -2.421	0.0001
BSA1 vs. Co1	-3.780	-7.819 to 0.2590	0.0857
BSA1 vs. Tw1	-36.66	-40.70 to -32.62	<0.0001
BSA1 vs. Tx1	-56.62	-60.66 to -52.58	<0.0001
BSA1 vs. Tx2	-35.22	-39.26 to -31.18	<0.0001
BSA1 vs. Tx3	-30.92	-34.96 to -26.88	<0.0001
BSA1 vs. Pc2	-58.12	-62.16 to -54.08	<0.0001
BSA1 vs. Pc6	-30.34	-34.38 to -26.30	<0.0001
BSA1 vs. Pc10	-52.14	-56.18 to -48.10	<0.0001
BSA10 vs. Co1	2.680	-1.359 to 6.719	0.4992
BSA10 vs. Tw1	-30.20	-34.24 to -26.16	<0.0001
BSA10 vs. Tx1	-50.16	-54.20 to -46.12	<0.0001
BSA10 vs. Tx2	-28.76	-32.80 to -24.72	<0.0001
BSA10 vs. Tx3	-24.46	-28.50 to -20.42	<0.0001
BSA10 vs. Pc2	-51.66	-55.70 to -47.62	<0.0001
BSA10 vs. Pc6	-23.88	-27.92 to -19.84	<0.0001
BSA10 vs. Pc10	-45.68	-49.72 to -41.64	<0.0001
Co1 vs. Tw1	-32.88	-36.92 to -28.84	<0.0001
Co1 vs. Tx1	-52.84	-56.88 to -48.80	<0.0001
Co1 vs. Tx2	-31.44	-35.48 to -27.40	<0.0001
Co1 vs. Tx3	-27.14	-31.18 to -23.10	<0.0001
Co1 vs. Pc2	-54.34	-58.38 to -50.30	<0.0001
Co1 vs. Pc6	-26.56	-30.60 to -22.52	<0.0001

Tabla 2.20: Prueba múltiple comparativa de Tukey con diferencias medias y valor P

Comparación	Diferencia media	Dif. CI 95.00 %	Valor P
Co1 vs. Pc10	-48.36	-52.40 to -44.32	<0.0001
Tw1 vs. Tx1	-19.96	-24.00 to -15.92	<0.0001
Tw1 vs. Tx2	1.440	-2.599 to 5.479	0.9834
Tw1 vs. Tx3	5.740	1.701 to 9.779	0.0007
Tw1 vs. Pc2	-21.46	-25.50 to -17.42	<0.0001
Tw1 vs. Pc6	6.320	2.281 to 10.36	0.0001
Tw1 vs. Pc10	-15.48	-19.52 to -11.44	<0.0001
Tx1 vs. Tx2	21.40	17.36 to 25.44	<0.0001
Tx1 vs. Tx3	25.70	21.66 to 29.74	<0.0001
Tx1 vs. Pc2	-1.500	-5.539 to 2.539	0.9774
Tx1 vs. Pc6	26.28	22.24 to 30.32	<0.0001
Tx1 vs. Pc10	4.480	0.4410 to 8.519	0.0185
Tx2 vs. Tx3	4.300	0.2610 to 8.339	0.0280
Tx2 vs. Pc2	-22.90	-26.94 to -18.86	<0.0001
Tx2 vs. Pc6	4.880	0.8410 to 8.919	0.0070
Tx2 vs. Pc10	-16.92	-20.96 to -12.88	<0.0001
Tx3 vs. Pc2	-27.20	-31.24 to -23.16	<0.0001
Tx3 vs. Pc6	0.5800	-3.459 to 4.619	>0.9999
Tx3 vs. Pc10	-21.22	-25.26 to -17.18	<0.0001
Pc2 vs. Pc6	27.78	23.74 to 31.82	<0.0001
Pc2 vs. Pc10	5.980	1.941 to 10.02	0.0004
Pc6 vs. Pc10	-21.80	-25.84 to -17.76	<0.0001

Los resultados más destacados son: no se encontró diferencia significativa entre las superficies del control Ps y BSA1 (54.14°, 56.08°), es decir el recubrimiento con esta proteína logró igualar la hidrofiliidad de la superficie de una placa para cultivo disponible comercialmente. Se encontró también similitud entre los recubrimientos de Co1, BSA10 y BSA1 (59.86°, 62.54°

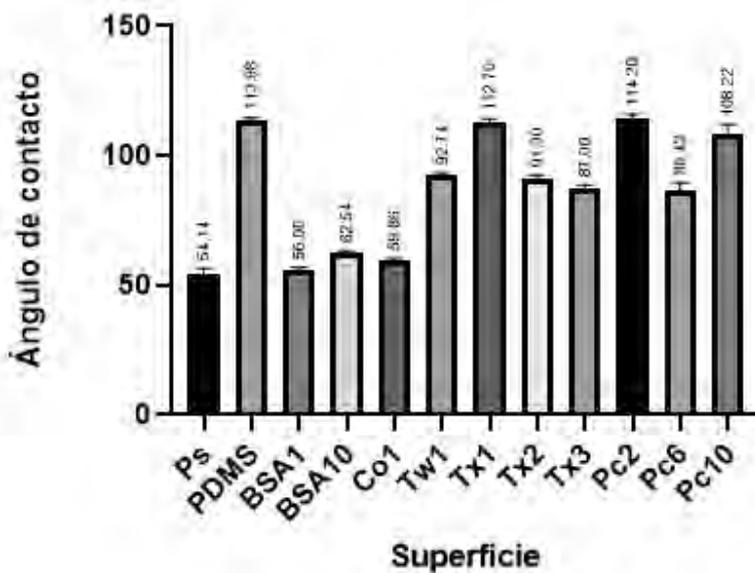


Figura 2.31: Gráfico de barras con ángulos de contacto con D.E. de las superficies modificadas. (a) Poliestireno (Ps), (b) PDMS, (c) PDMS + colágeno (Co1), (d) PDMS + BSA 1 % (BSA1), (e) PDMS + BSA 10 % (BSA10), (f) Triton x – 100 -1 % (Tx1), (g) Triton x – 100 -2 % (Tx2), (h) Triton x – 100 -3 % (Tx3), (i) Pluronic 127-2 μ l (Pc2), (j) Pluronic 127-6 μ l (Pc6).

y 56.08°). Por otro lado, las superficies de las mezclas con surfactantes no obtuvieron resultados alentadores, no se halló diferencia significativa entre el control de PDMS, Tx1, Tx2, Pc2 (113.98°, 92.74°, 112.7°, 114.2°); ni entre Tx3 y Pc6. En general, la evaluación inicial demostró que la mejor opción para un aumento significativo en la hidrofiliidad de las superficies fue a través del uso de recubrimientos proteicos.

Autores [30] han sugerido que la humectabilidad puede aumentar con una mayor concentración de surfactante (10%); sin embargo, aumentar la concentración conlleva a una mayor opacidad de la pieza, además eliminar las burbujas de aire atrapadas en PDMS modificado suele requerir mayor tiempo. Por último, los valores de temperatura y el tiempo de curado también se ven afectados, llegando a valores no recomendables para su producción.

En general, el uso de surfactantes se consideró de baja utilidad, ya que la mayoría de las muestras no mostraron diferencia significativa con el control de PDMS, además del ya demostrado cambio en la transparencia de la plataforma que afecta la visualización en microscopio; se considera descartar la mezcla con surfactantes para futuras evaluaciones, en este trabajo de investigación.

2.9. Evaluación del desarrollo de células adherentes (viabilidad, proliferación y morfología) en la plataforma optimizada

En el presente sección, se evaluará el desarrollo de la línea celular HeLa en la plataforma de microtitulación elástica con tres tipos de recubrimientos: colágeno, BSA 1 % y BSA 10 % que fueron los que dieron resultados más alentadores en el capítulo anterior A través de los años y a medida que se normalizaba el uso de líneas celulares para evaluaciones toxicológicas, los métodos de cultivo y su evaluación, también se fue estandarizando en el uso diario de los investigadores.

Es así como, el monitoreo de una línea celular puede incluir controles de morfología celular, identificación de marcadores para genes de interés y correlación de la expresión con el número de pases, además del establecimiento de criterios experimentales como tasas de crecimiento o niveles de expresión de proteínas. De los métodos mencionados, la observación de la morfología celular es el método más simple y directo utilizado para identificar la salud y la estabilidad de las células. La información que se obtiene a partir de observaciones comparativas, en tanto densidades altas como bajas, se encuentra condicionada a distintos factores y requiere del conocimiento del personal para su correcta clasificación. La morfología puede variar entre líneas según la salud de las células y, en algunos casos, el estado de diferenciación también puede verse afectada por la densidad de siembra, así como con diferentes combinaciones de medios y sueros [103].

Para lograr un óptimo control de la morfología celular, las observaciones deben realizarse de manera frecuente y breve. En caso de detectar una apariencia inusual en el cultivo, debe reportarse y explorarse, ya que es probable que haya un problema en el cultivo. Es importante mantener imágenes de la morfología celular para realizar comparaciones.

Por otro lado, las evaluaciones de las tasas de proliferación celular a partir de los datos de la curva de crecimiento pueden generar información valiosa sobre la respuesta de un cultivo a un estímulo. Realizar un análisis de la curva de crecimiento es un elemento crucial para monitorear la consistencia del cultivo y determinar una serie de otras características clave, como el mejor momento para el subcultivo, dilución óptima y eficiencia de siembra estimada en varias densi-

dades celulares. El análisis de la curva de crecimiento también puede ayudar a determinar los tiempos de duplicación de la población y debe realizarse de forma rutinaria, en especial cuando el análisis enzimático o funcional es inminente. Por regla general, se debe buscar el uso de líneas celulares con propiedades de crecimiento consistentes [100].

Otros métodos de evaluación del estado de un cultivo celular se pueden realizar considerando los siguientes factores:

- Cambios en la permeabilidad de la membrana: exclusión de colorante (azul de tripano), liberación de enzimas intracelulares como lactato deshidrogenasa; Cr precargado; liberación de nucleósidos; captación de uridina; o captación vital de colorante.
- Función mitocondrial reducida.
- Cambios en la replicación celular.
- Evaluación de la apoptosis: cambios en la morfología; reordenamientos de membranas; fragmentación del ADN; activación de caspasas; y liberación de citocromo c de mitocondrias.

Para este estudio, la línea celular HeLa fue gentilmente donada por Dr. Juan Lopez Smith del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, sección química de la PUCP. Las placas microtituladoras estériles par cultivo celular de 24 pocillos Corning® 24 Well TC-Treated Microplates fueron adquiridas de la empresa Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos), Phosphate buffered saline (PBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium: High glucose con L-glutamina y Sodium Pyruvate, Gibco™ Antibiotic Antimycotic Solution (100×), trypsin-EDTA 0.25 % y Fetal Bovine Serum (FBS) fue adquirido de Fisher Scientific (Pittsburg, PA). Bovine Serum Albumin (BSA), azul de tripano 0.4 fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Solución de colágeno (3 mg/ml) fue adquirido de STEMCELL Technologies (Vancouver, Canadá). La instrumentación utilizada en este análisis fue una cámara digital Canon EOS 1300, EF-S 18-55 IS II, micropipeta Eppendorf de 10 μ l, microscopio invertido Zeiss A1, Axiocam ERC 5s, software ImageJ software y cámara de Neubauer.

Se evaluó el crecimiento y desarrollo de la línea celular HeLa en las siguientes superficies: PDMS (control), PDMS con recubrimiento de colágeno (CO1), PDMS con recubrimiento de

BSA 1 % (BSA1) y PDMS con recubrimiento de BSA 10 % (BSA10); en medio DMEM high glucose con L-glutamina, bicarbonato de sodio, rojo fenol, piruvato de sodio y 1 X de antiantibiótico-animicótico, evaluada por 96 horas a 37°C, 5 % CO₂. todos los cultivos se realizaron por triplicado y fueron evaluados a través de tres criterios complementarios: morfología, viabilidad y proliferación, tal como se muestra en la Fig. 2.32. La morfología de las células cultivadas fue

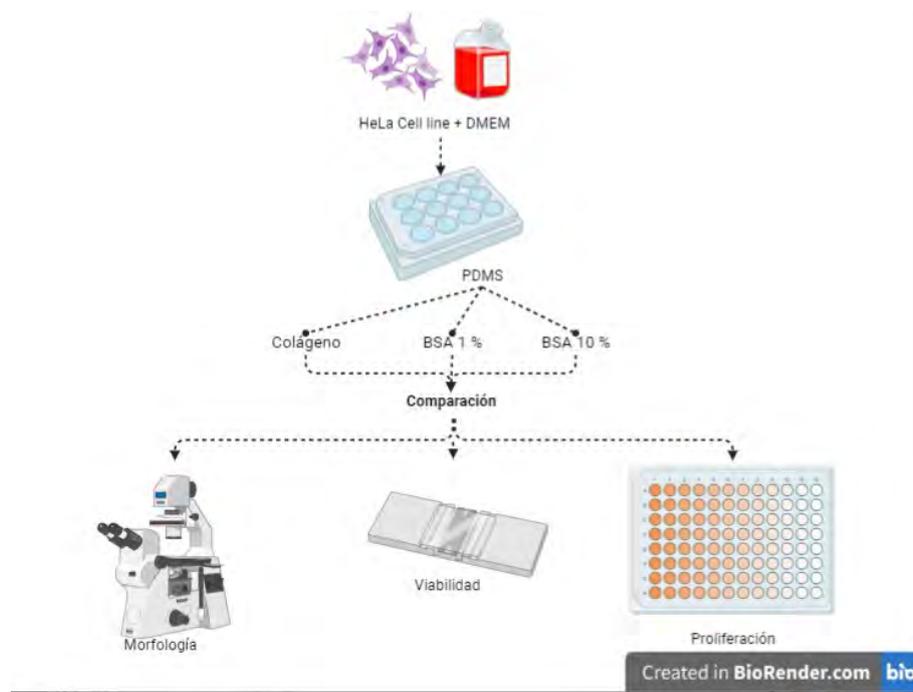


Figura 2.32: Procedimiento de evaluación de compatibilidad de la línea celular HeLa en distintas superficies de PDMS. Creado en BioRender.com

evaluada de manera visual por microscopía de inversión. Las células de tipo adherentes como HeLa tienen forma poligonal con dimensiones regulares y crecen en monocapa extendida en la superficie. A través de un microscopio de inversión se realiza el examen visual, donde se busca confirmar el estado saludable de las células y posibles signos de degradación y/o contaminación. Algunos de los signos de deterioro de las células incluyen granularidad alrededor del núcleo, desprendimiento de las células del sustrato y vacuolación citoplásmica, acumulación celular, grado de extensión de las células, entre otros [103]. Otros factores a evaluar a simple vista es el cambio en la coloración del medio; en caso se cuente con la presencia de contaminantes el medio se acidificará dando como resultado un tono naranja, en cambio, si se produce la muerte celular, el medio virará a un color violeta característico de un medio básico. Para estandarizar la evaluación del cultivo, se utilizó la Tabla. 2.8.

2.9.1. Evaluación visual: medio y morfología

La evolución de la morfología celular en las distintas superficies se muestra en la Secuencia Fotográfica (Fig. 2.33,2.34,2.35,2.36,2.37). Las fotografías fueron tomadas cada 12 horas, sin embargo, se muestran fotografías de cada 24 horas. A las 0 h de iniciado el cultivo se observa la forma ovalada de las células característica de las células recientemente desadheridas. También se lograron observar algunas irregularidades en las superficies de las plataformas, pero la distinción celular no se ve interrumpida.

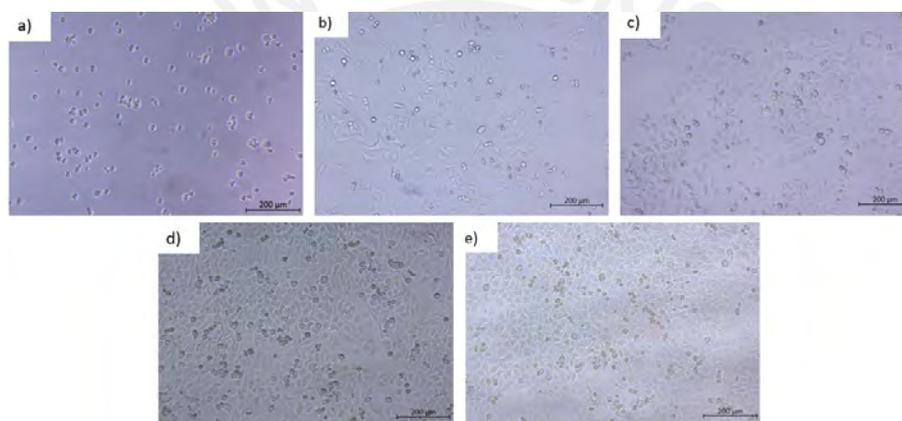


Figura 2.33: Crecimiento de la línea celular HeLa en poliestireno. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μm . Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.

Pasadas 24 horas, las células en poliestireno (Fig. 2.33b) empezaron a mostrar cierta extensión y crecimiento azocalado; en PDMS (Fig. 2.34b) presentan cierta extensión y a la vez el inicio de algunos cúmulos celulares; en PDMS + colágeno (Fig. 2.35c) se observa extensión celular, más no se logra deslumbrar un crecimiento en monocapa, en su lugar se observan bastoncillos; la superficie de PDMS + BSA 1 % (Fig. 2.36) presenta menor densidad celular y menor extensión, tampoco se visualiza el crecimiento en monocapa; mientras que PDMS + BSA 10 % (Fig. 2.37b) presenta mayor agrupamiento celular.

La evaluación 48 horas después mostró que el crecimiento en el control de poliestireno (Fig. 2.33c) tuvo mayor densidad de crecimiento y fue, hasta ese momento, la única superficie

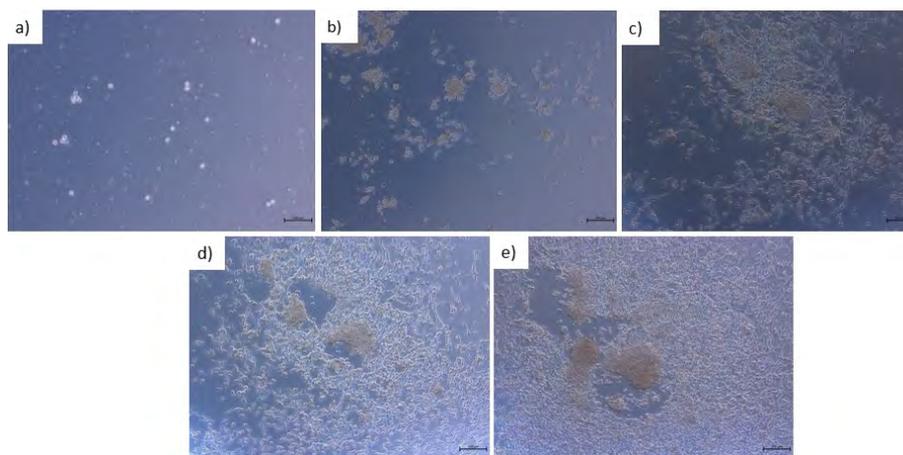


Figura 2.34: Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μm . Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.

en mostrar crecimiento en monocapa tipo mosaico. Por otro lado, el control con PDMS muestra menor densidad celular que todas las otras superficies y la superficie con colágeno (Fig. 2.34c) muestra mayor acumulación celular pero buena densidad de crecimiento. Por último, las superficies con colágeno y BSA (Fig. 2.35c y 2.36c) muestran comportamientos similares en acumulación celular y densidad.

Tras 72 horas de cultivo se observó la confluencia en la superficie de poliestireno (Fig. 2.33d) y a las 96 horas (Fig. 2.33e), se empezó a observar acumulación celular.

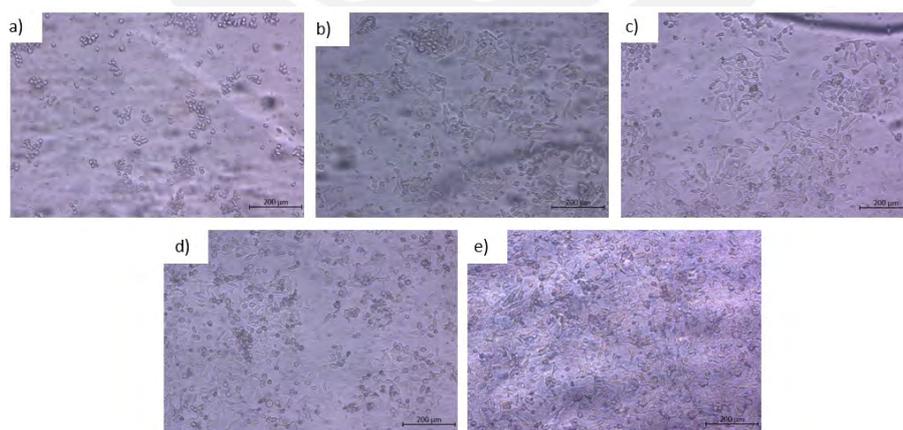


Figura 2.35: Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS + colágeno. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μm . Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.

En este periodo de tiempo, la superficie de PDMS (Fig. 2.34e) también mostró acumula-

ción celular y crecimiento continuo; todas las demás superficies mostraron acumulación celular y crecimiento en forma de racimos de uvas; sin embargo, sí se diferenciaron en la aparente densidad celular, siendo la superficie PDMS + BSA 10 % (Fig. 2.37e) la de mayor acumulación, seguida de PDMS + BSA 1 % (Fig. 2.36e) y por último la superficie PDMS + colágeno (Fig. 2.35e) presentó la menor densidad celular aparente.

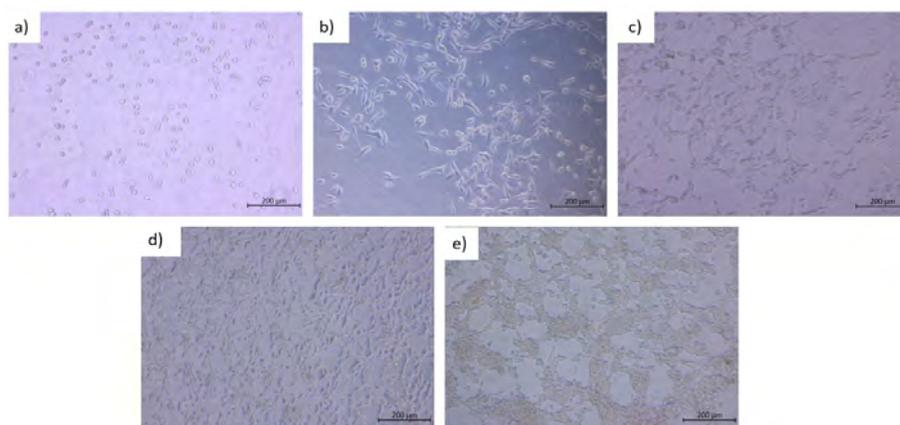


Figura 2.36: Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS + BSA 1 %. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas. Barra de escala: 200 μm . Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10X.

Ninguna de las superficies permitió a las células el desarrollo logrado en la superficie control de poliestireno, en términos de expresión de morfología ni aparente confluencia. Estos resultados difieren de lo reportado por [32], donde la línea celular SUM159 presentó una buena extensión en las superficies de PDMS recubiertas con colágeno y fibronectina, confirmando la necesidad de explorar el desarrollo de distintas líneas celulares en distintas superficies.

Por otro lado, [91] utilizaron BSA al 3 % como recubrimiento de las plataformas y cultivaron 6 líneas celulares: MDA-MB231, células de tejido conjuntivo del estroma que incluyen fibroblastos IRM-90 mCherry, sublínea derivada de células C4-2B derivadas de LNCaP de cáncer de próstata humano, línea celular de adenocarcinoma de pulmón no pequeño humano H1299, línea celular epitelial de carcinoma de pulmón humano A549 y línea celular de glioblastoma humano U251. MDA-MB231, IRM-90 y C4-2B, utilizadas para el cultivo de esferoides; donde el recubrimiento para cuatro de estas líneas celulares ofreció propiedades repelentes adecuadas

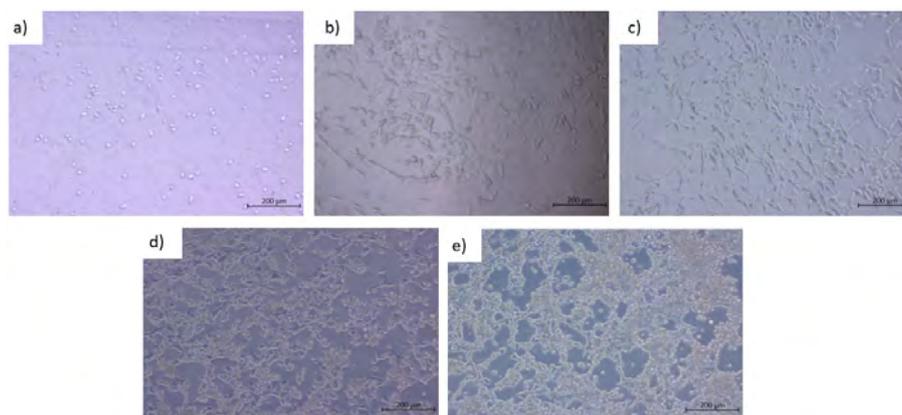


Figura 2.37: Crecimiento de la línea celular HeLa en PDMS + BSA 10 %. (a) 0 horas, (b) 24 horas, (c) 48 horas, (d) 72 horas, (e) 96 horas.). Barra de escala: 200 μm . Microscopio invertido AxioVert Bio (Zeiss, Alemania). Aumento 10x.

para la formación de esferoides. Resultados que contradicen investigaciones [19, 32]; en este caso, la presente investigación apunta que las células HeLas, requieren de otro enfoque de modificación de superficie para poder usarse de manera equivalente, en términos de evaluación morfológica, en plataformas de PDMS.

2.9.2. Viabilidad y densidad celular

La evaluación de la viabilidad celular se realizó mediante hemocitometría; a medida que las células en los pocillos de control alcanzaron la confluencia, después de aproximadamente 4 días de cultivo, fueron separadas de los sustratos utilizando tripsina/EDTA 0.25 % y se realizó el conteo del número total de células.

Los recuentos de células para estimar la viabilidad y la proliferación se realizaron por triplicado y se expresaron utilizando el promedio y la desviación estándar.

Se evaluó la viabilidad de cada superficie con el uso de un hemocitómetro y el reactivo azul de tripano. Se procedió tal cual se describió en sección metodológica y los resultados se describen en la Fig. 2.38. Donde el mayor porcentaje de viabilidad se reportó en el sistema control (Ps) con 98.98 % D.E. \pm 1.15, seguido de Co1, BSA10, BSA1 y PDMS, con 97.68 % D.E. \pm 1.42, 96.75 % D.E. \pm 5.25, 96.15 % D.E. \pm 3.52 y 91.55 % D.E. \pm 5.47, respectivamente.

Se realizó el análisis de varianza de los datos obtenidos de viabilidad en las distintas super-

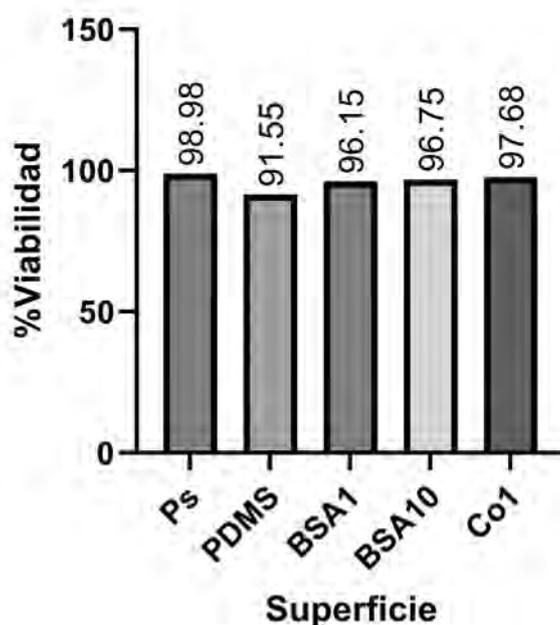


Figura 2.38: Gráfico de barras relación superficie vs % de viabilidad. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1

ficies, donde se cumplió $p < 0.05$, por lo tanto, se asume diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Para saber entre cuáles, se realiza una prueba de comparaciones múltiples de Tukey en el software GraphPad Prism. Los resultados se muestran en la Tabla 2.21.

Los resultados indicaron que sí existe diferencia estadísticamente significativa entre PDMS: Co1 y PDMS: Ps. Dado, que Ps es el control de poliestirenos, el resultado a resaltar es la diferencia significativa entre el PDMS y Co1, que sería el mejor recubrimiento en términos de viabilidad. Por otro lado, se realizó la evaluación de la densidad celular a través de los datos obtenidos con hemacitometría. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2.39.

Asimismo, se realizó una Prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre las distintas superficies en el software GraphPad Prism 9.5.1 (Tabla 2.22). Donde se demostró diferencia significativa en todas las superficies comparadas con el control de Ps; es decir, ninguna plataforma logró el desarrollo, en términos de densidad celular, al equivalente logrado en una plataforma estandarizada para el cultivo celular.

Tabla 2.21: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey con 95 % de dif CI.

Comparaciones	Dif. media	95.00 % CI Dif	Valor P
PDMS vs. BSA1	-4.593	-9.802 to 0.615	0.087
PDMS vs. BSA10	-5.200	-10.41 to 0.009	0.050
PDMS vs. Co1	-6.127	-11.34 to -0.9176	0.022
PDMS vs. Ps	-7.427	-12.64 to -2.218	0.007
BSA1 vs. BSA10	-0.606	-5.816 to 4.602	0.993
BSA1 vs. Co1	-1.533	-6.742 to 3.676	0.841
BSA1 vs. Ps	-2.833	-8.042 to 2.376	0.397
BSA10 vs. Co1	-0.926	-6.136 to 4.282	0.969
BSA10 vs. Ps	-2.227	-7.436 to 2.982	0.602
Co1 vs. Ps	-1.300	-6.509 to 3.909	0.903

Tabla 2.22: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey con 95 % de dif CI.

Comparaciones	Dif. media	95.00 % CI Dif	Valor P
PDMS vs. BSA1	-63333	-231305 to 104639	0.697
PDMS vs. BSA10	-68333	-236305 to 99639	0.641
PDMS vs. Co1	-48333	-216305 to 119639	0.851
PDMS vs. Ps	-273833	-441805 to -105861	0.003
BSA1 vs. BSA10	-5000	-172972 to 162972	0.999
BSA1 vs. Co1	15000	-152972 to 182972	0.997
BSA1 vs. Ps	-210500	-378472 to -42528	0.016
BSA10 vs. Co1	20000	-147972 to 187972	0.993
BSA10 vs. Ps	-205500	-373472 to -37528	0.018
Co1 vs. Ps	-225500	-393472 to -57528	0.011

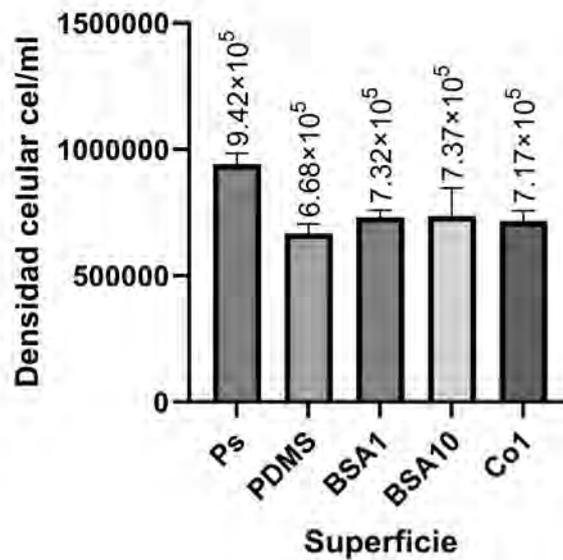


Figura 2.39: Gráfico de barras relación superficie vs. densidad celular. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1

Los resultados obtenidos en esta sección, muestran que no existe una clara relación entre la viabilidad y densidad celular; si bien se esperaba que la superficie de mayor viabilidad celular (sin tomar en cuenta el control) lograra también una mayor densidad no se observó esta relación. La superficie de mayor viabilidad fue la superficie con recubrimiento de colágeno, sin embargo, esta superficie no logró la mayor densidad celular, siendo superado por las superficies de recubrimiento con BSA1 y BSA10, esto indica que, si bien la superficie de colágeno permite a las células una adecuada supervivencia, no logra igualar la densidad que se obtendría en otras superficies, esto podría deberse a la pobre adhesión celular.

La mayoría de estudios encontrados no muestran datos de la densidad celular al final del periodo de crecimiento, ya que suelen limitar los datos al porcentaje de adherencia y supervivencia, por lo que la comparativa resulta complicada. A modo de complementar los datos obtenidos, se complementó con el ensayo de proliferación celular WST-1.

2.9.3. Proliferación celular

El ensayo de proliferación celular se realizó con el reactivo WST-1, siguiendo indicaciones del fabricante Sigma Aldrich (Misuri, Estados Unidos). La evaluación se realizó cada 12 horas hasta por 96 horas, en la lectora de microplacas DIAREader ELX800G (DIALAB,

Tabla 2.23: Proliferación celular en distintas superficies en 96 h.

Horas	Poliestireno	PDMS	Co1	BSA1	BSA10
00	1.00 %	1.00 %	1.00 %	1.00 %	1.00 %
44	10.10 %	13.00 %	12.00 %	15.00 %	11.00 %
24	31.80 %	26.10 %	24.30 %	31.10 %	32.60 %
36	45.90 %	33.20 %	39.90 %	49.90 %	51.10 %
48	63.40 %	48.10 %	57.20 %	61.30 %	67.40 %
60	79.90 %	54.20 %	68.40 %	70.10 %	74.30 %
72	90.20 %	61.10 %	72.00 %	75.10 %	78.90 %
84	114.40 %	77.10 %	81.20 %	83.70 %	86.50 %
96	132.10 %	85.30 %	89.70 %	93.20 %	98.80 %

Austria). Los resultados se muestran en términos de porcentaje en la Tabla 2.23.

El periodo de confluencia se consideró hasta las 72 horas, en este periodo se observó que la proliferación en el control de poliestireno representó un aumento de 80.1 %, seguida de la superficie de BSA10 con 67 %, BSA1 con 60.1 %, CO1 con 60 % y PDMS 48.1 % (Fig. 2.40).

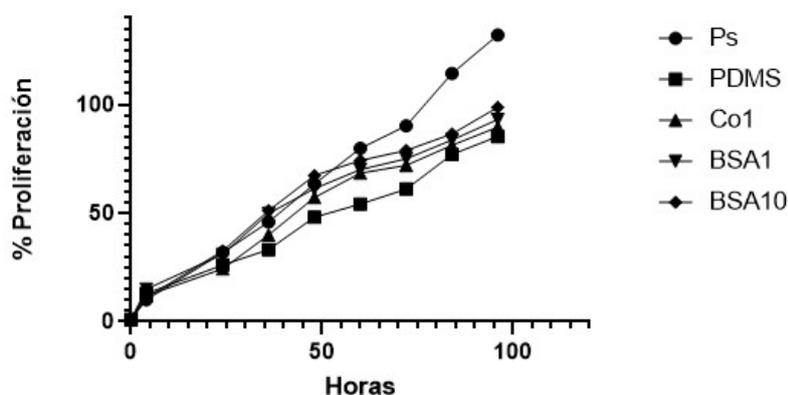


Figura 2.40: Ensayo de proliferación con WST-1 en plataformas elásticas de PDMS. Preparado en GraphPad Prism 9.5.1.

Si bien, todas las superficies mostraron comportamientos similares, no lograron igualar el comportamiento celular en el sistema control en el mismo periodo de tiempo. Sin embargo, se debe recalcar que, finalizado el periodo de evaluación los cultivos con recubrimiento de BSA se encontraban en el punto de confluencia.

Por lo tanto, podríamos suponer que la plataforma elástica con o sin recubrimiento, retrasa el crecimiento celular en la misma, más no resulta incompatible con la viabilidad y confluencia del cultivo.

El PDMS ha demostrado ser un material valioso para investigar el comportamiento celular, con o sin estimulación externa. Por otro lado, la mayoría de estudios con uso de recubrimientos suelen limitar la evaluación a la unión celular; sin embargo, los resultados de la presente investigación sugieren la necesidad de explorar la adherencia según el tipo de célula, así como otras características como viabilidad, proliferación y expresión de características del cultivo, solo así se podrá comprender la interacción célula – sustrato y recrear las condiciones adecuadas para su cultivo.



Capítulo III

Conclusiones

La plataforma elástica de PDMS desarrollada dentro del marco del proyecto N°52-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV “Plataforma avanzada para el estudio in vitro de parámetros toxicológicos de antibióticos de uso en pollos de engorde como alternativa humanitaria y de menor costo de los modelos in vivo” presenta aún oportunidades de mejora, sin embargo; ha demostrado compatibilidad con el crecimiento celular y gracias a su maleabilidad ofrece la posibilidad de nuevos diseño, tanto en su arquitectura, como en sus características físicas y químicas, que ayuden a mimetizar tejidos y órganos in vivo.

Por otro lado, la implementación de los principios de BPM, así como la eliminación de pasos no indispensables en el proceso de fabricación de las plataformas, permitió un producto final de óptima transparencia que facilitó la observación del cultivo celular, así como la evaluación de su morfología. Además, una alteración en el diseño de la base permitió su compatibilidad con los equipos básicos para crecimiento y evaluación de cultivos como el microscopio invertido, lectora de microplacas e incubadora.

Asimismo, la modificación de las superficies demostró que el uso de surfactantes no es recomendable como mezcla del pre-polímero, debido que generaba opacidad del material y no mejoraba significativamente la humectabilidad de la superficie. A diferencia de los recubrimientos proteicos que lograron un aumento de la hidrofiliidad inicial del PDMS desde $113.98^{\circ} \text{ D.E.} \pm 0.70^{\circ}$ a $56.08^{\circ} \text{ D.E.} \pm 0.74^{\circ}$, $62.54^{\circ} \text{ D.E.} \pm 0.83$ y $59.86^{\circ} \text{ D.E.} \pm 0.64$ para BSA 1 %, BSA10 % y colágeno, respectivamente, logrando igualar estadísticamente al control de poliestireno ($54.14^{\circ} \text{ D.E.} \pm 2.24^{\circ}$). Por último, la evaluación de la línea celular HeLa en los distintos recubrimientos proteicos, demostró que en el recubrimiento de colágeno permitió mayor viabilidad al cultivo,

llegando a 97.68 % y logrando igualar la viabilidad observada en el control de poliestireno. Sin embargo, en cuanto a la densidad celular, ninguno de los recubrimientos logró igualar al crecimiento en el control, esto tal vez por el rechazo de las células a las superficies, que no permitió el desarrollo de la usual monocapa observado en este grupo celular. Esta investigación es un vistazo inicial a la compleja dinámica entre la célula y su entorno, dejando claro que, para poder desarrollar nuevos materiales que permitan el cultivo exitoso de células eucariotas y tejidos se deben investigar cómo se ven afectados por las nuevas condiciones de los diversos materiales usados.

El siguiente paso que se recomienda explorar, sería la evaluación de los ángulos de contacto a través del tiempo y con diferentes medios de cultivo, esto debido a la adsorción de biomoléculas, y que no ha sido estudiado. Asimismo, la caracterización de las superficies a través de técnicas como FTIR, permitiría conocer con mayor certeza qué modificaciones se dan en la superficie y explorar su evolución a través del tiempo. Por último, complementar la modificación de las superficies con métodos como UV o plasma, podrían generar mayor estabilidad a los recubrimientos trabajados.

Bibliografía

- ¹I. Laursen, P. Briand y A. E. Lykkesfeldt, “Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7”, en, *Anticancer Res.* **10**, 343-351 (1990).
- ²H.-J. Hettlich, F. Otterbach, C. Mittermayer, R. Kaufmann y D. Klee, “Plasma-induced surface modifications on silicone intraocular lenses: chemical analysis and in vitro characterization”, en, *Biomaterials* **12**, 521-524 (1991).
- ³G. Laschinski, R. Vogel y H. Spielmann, “Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to in vitro teratogenesis screening”, en, *Reprod. Toxicol.* **5**, 57-64 (1991).
- ⁴M. J. Owen y P. J. Smith, “Plasma treatment of polydimethylsiloxane”, en, *J. Adhes. Sci. Technol.* **8**, 1063-1075 (1994).
- ⁵E. A. Clark y J. S. Brugge, “Integrins and Signal Transduction Pathways: the Road Taken”, *Science* **268**, 233-239 (1995).
- ⁶J. M. Watson y M. G. Baron, “The behaviour of water in poly(dimethylsiloxane)”, en, *J. Memb. Sci.* **110**, 47-57 (1996).
- ⁷S. M. Schoenwaelder y K. Burridge, “Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins”, *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 274-286 (1999).
- ⁸T. D. Brown, “Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review”, *Journal of Biomechanics* **33**, 3-14 (2000).
- ⁹M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer y S. R. Quake, “Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography”, en, *Science* **288**, 113-116 (2000).
- ¹⁰P. Chu, “Plasma-surface modification of biomaterials”, *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **36**, 143-206 (2002).
- ¹¹D. D. Allen, R. Caviedes, A. M. Cárdenas, T. Shimahara, J. Segura-Aguilar y P. A. Caviedes, “Cell Lines as In Vitro Models for Drug Screening and Toxicity Studies”, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **31**, 757-768 (2005).
- ¹²X. Q. Brown, K. Ookawa y J. Y. Wong, “Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response”, en, *Biomaterials* **26**, 3123-3129 (2005).
- ¹³A. Oláh, H. Hillborg y G. J. Vancso, “Hydrophobic recovery of UV/ozone treated poly(dimethylsiloxane): adhesion studies by contact mechanics and mechanism of surface modification”, en, *Appl. Surf. Sci.* **239**, 410-423 (2005).
- ¹⁴J. Seo y L. P. Lee, “Effects on wettability by surfactant accumulation/depletion in bulk polydimethylsiloxane (PDMS)”, en, *Sens. Actuators B Chem.* **119**, 192-198 (2006).
- ¹⁵Y. Arima y H. Iwata, “Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers”, en, *Biomaterials* **28**, 3074-3082 (2007).
- ¹⁶P. Hughes, D. Marshall, Y. Reid, H. Parkes y C. Gelber, “The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?”, *BioTechniques* **43**, 575-586 (2007).
- ¹⁷W. P. Daley, S. B. Peters y M. Larsen, “Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine”, *Journal of Cell Science* **121**, 255-264 (2008).
- ¹⁸A. Capes-Davis, G. Theodosopoulos, I. Atkin, H. G. Drexler, A. Kohara, R. A. MacLeod, J. R. Masters, Y. Nakamura, Y. A. Reid, R. R. Reddel y R. I. Freshney, “Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines”, *International Journal of Cancer* **127**, 1-8 (2010).
- ¹⁹G. L. Francis, “Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications”, en, *Cyto-technology* **62**, 1-16 (2010).
- ²⁰T. Ishizaki, N. Saito y O. Takai, “Correlation of cell adhesive behaviors on superhydrophobic, superhydrophilic, and micropatterned superhydrophobic/superhydrophilic surfaces to their surface chemistry”, en, *Langmuir* **26**, 8147-8154 (2010).

- ²¹S. Adler, D. Basketter, S. Creton, O. Pelkonen, J. van Benthem, V. Zuang, K. E. Andersen, A. Angers-Loustau, A. Aptula, A. Bal-Price, E. Benfenati, U. Bernauer, J. Bessems, F. Y. Bois, A. Boobis, E. Brandon, S. Bremer, T. Broschard, S. Casati, S. Coecke, R. Corvi, M. Cronin, G. Daston, W. Dekant, S. Felter, E. Grignard, U. Gundert-Remy, T. Heinonen, I. Kimber, J. Kleinjans, H. Komulainen, R. Kreiling, J. Kreysa, S. B. Leite, G. Loizou, G. Maxwell, P. Mazzatorta, S. Munn, S. Pfuhler, P. Phrakonkham, A. Piersma, A. Poth, P. Prieto, G. Repetto, V. Rogiers, G. Schoeters, M. Schwarz, R. Serafimova, H. Tähti, E. Testai, J. van Delft, H. van Loveren, M. Vinken, A. Worth y J.-M. Zaldivar, “Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010”, en, *Arch. Toxicol.* **85**, 367-485 (2011).
- ²²L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml y V. Svorcik, “Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants”, *Biotechnology Advances* **29**, 739-767 (2011).
- ²³J. S. Park, J. S. Chu, A. D. Tsou, R. Diop, Z. Tang, A. Wang y S. Li, “The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β ”, en, *Biomaterials* **32**, 3921-3930 (2011).
- ²⁴A. M. Wobus y P. Löser, “Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research”, en, *Arch. Toxicol.* **85**, 79-117 (2011).
- ²⁵A. Alrifaiy, O. A. Lindahl y K. Ramser, “Polymer-Based Microfluidic Devices for Pharmacy, Biology and Tissue Engineering”, *Polymers* **4**, 1349-1398 (2012).
- ²⁶S. K. Vashist, “Comparison of 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide based strategies to crosslink antibodies on Amine-functionalized platforms for immunodiagnostic applications”, en, *Diagnostics (Basel)* **2**, 23-33 (2012).
- ²⁷Z. Yang y H.-R. Xiong, “In vitro, Tissue-Based Models as a Replacement for Animal Models in Testing of Drugs at the Preclinical Stages”, en *Biomedical Tissue Culture* (InTech, oct. de 2012).
- ²⁸E. Callaway, “Deal done over HeLa cell line”, *Nature* **500**, 132-133 (2013).
- ²⁹N. Hallfors, A. Khan, M. D. Dickey y A. M. Taylor, “Integration of pre-aligned liquid metal electrodes for neural stimulation within a user-friendly microfluidic platform”, en, *Lab Chip* **13**, 522-526 (2013).
- ³⁰H. Madadi, M. Mohammadi, J. Casals-Terré y R. C. López, “A novel fabrication technique to minimize poly (dimethylsiloxane)-microchannels deformation under high-pressure operation”, en, *Electrophoresis* **34**, 3126-3132 (2013).
- ³¹V. R. Sastri, *Plastics in medical devices*, en, 2.^a ed., *Plastics Design Library* (William Andrew Publishing, Norwich, CT, nov. de 2013).
- ³²W. Zhang, D. S. Choi, Y. H. Nguyen, J. Chang y L. Qin, “Studying cancer stem cell dynamics on PDMS surfaces for microfluidics device design”, en, *Sci. Rep.* **3**, 2332 (2013).
- ³³N. D. Evans y E. Gentleman, “The role of material structure and mechanical properties in cell-matrix interactions”, en, *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* **2**, 2345-2356 (2014).
- ³⁴K. Jaquith, *The history of the microplate*, en, <https://www.wellplate.com/the-history-of-the-microplate/>, Accessed: 2023-11-19, ene. de 2014.
- ³⁵W. Qiu, X. Sun, C. Wu, K. Hjort y Z. Wu, “A contact angle study of the interaction between embedded amphiphilic molecules and the PDMS matrix in an aqueous environment”, *Micromachines (Basel)* **5**, 515-527 (2014).
- ³⁶M. M. Stanton, “Regulation of Cell Behavior at the Cell-Surface Interface”, 1-197 (2014).
- ³⁷J. H. Wen, L. G. Vincent, A. Fuhrmann, Y. S. Choi, K. C. Hribar, H. Taylor-Weiner, S. Chen y A. J. Engler, “Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation”, en, *Nat. Mater.* **13**, 979-987 (2014).
- ³⁸F. Araújo, C. Pereira, J. Costa, C. Barrias, P. L. Granja y B. Sarmento, “In vitro M-like cells genesis through a tissue-engineered triple-culture intestinal model”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **104**, 782-788 (2015).
- ³⁹Y. J. Chuah, Y. T. Koh, K. Lim, N. V. Menon, Y. Wu e Y. Kang, “Simple surface engineering of polydimethylsiloxane with polydopamine for stabilized mesenchymal stem cell adhesion and multipotency”, en, *Sci. Rep.* **5**, 18162 (2015).
- ⁴⁰Y. J. Chuah, S. Kuddannaya, M. H. A. Lee, Y. Zhang e Y. Kang, “The effects of poly(dimethylsiloxane) surface silanization on the mesenchymal stem cell fate”, *Biomater. Sci.* **3**, 383-390 (2015).
- ⁴¹E. Drioli y L. Giorno, eds., *Encyclopedia of Membranes* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015).
- ⁴²Yu-Han, “Development of Microfluidic Devices For in Situ investigation of Cells Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy”, Tesis doct. (University of Washington, 2015).
- ⁴³H. Zhang y M. Chiao, “Anti-fouling coatings of poly(dimethylsiloxane) devices for biological and biomedical applications”, en, *J. Med. Biol. Eng.* **35**, 143-155 (2015).

- ⁴⁴E. Gioffredi, M. Boffito, S. Calzone, S. M. Giannitelli, A. Rainer, M. Trombetta, P. Mozetic y V. Chiono, “Pluronic F127 hydrogel characterization and biofabrication in cellularized constructs for tissue engineering applications”, en, *Procedia CIRP* **49**, 125-132 (2016).
- ⁴⁵Kshitiz, J. Afzal, H. Chang, R. Goyal y A. Levchenko, “Mechanics of Microenvironment as Instructive Cues Guiding Stem Cell Behavior”, *Current Stem Cell Reports* **2**, 62-72 (2016).
- ⁴⁶C. H. Lee e Y. Lee, “Collagen-based formulations for wound healing applications”, en *Wound Healing Biomaterials* (Elsevier, 2016), págs. 135-149.
- ⁴⁷C. Pereira, J. Costa, B. Sarmiento y F. Araújo, “Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies”, en *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* (Elsevier, 2016), págs. 57-81.
- ⁴⁸K. Baumann, “Colonic organoids for drug testing and colorectal disease modelling”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 467-467 (2017).
- ⁴⁹A. Gokaltun, M. L. Yarmush, A. Asatekin y O. B. Usta, “Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology”, en, *Technology* **05**, 1-12 (2017).
- ⁵⁰R. S. Hebbar, A. M. Isloor y A. F. Ismail, “Membrane Characterization”, en *Contact Angle Measurements* (Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2017), págs. 219-255.
- ⁵¹M. Jedrzejczak-Silicka, “History of Cell Culture”, en *New Insights into Cell Culture Technology* (InTech, mayo de 2017).
- ⁵²T. Omaki, Y. Hirai, K.-I. Kamei, T. Tsuchiya y O. Tabata, “Microfabrication of embedding a flexible parylene-based microelectrode array within body-on-a-chip”, *Proc. (MPDI)* **1**, 302 (2017).
- ⁵³T. Trantidou, Y. Elani, E. Parsons y O. Ces, “Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition”, en, *Microsyst. Nanoeng.* **3**, 16091 (2017).
- ⁵⁴E. Jastrzebska, A. Zuchowska, S. Flis, P. Sokolowska, M. Bulka, A. Dybko y Z. Brzozka, “Biological characterization of the modified poly(dimethylsiloxane) surfaces based on cell attachment and toxicity assays”, *Biomicrofluidics* **12**, 10.1063/1.5035176 (2018).
- ⁵⁵Z. Qian, D. Ross, W. Jia, Q. Xing y F. Zhao, “Bioactive polydimethylsiloxane surface for optimal human mesenchymal stem cell sheet culture”, en, *Bioact. Mater.* **3**, 167-173 (2018).
- ⁵⁶M. Razavi y A. S. Thakor, “An oxygen plasma treated poly(dimethylsiloxane) bioscaffold coated with polydopamine for stem cell therapy”, en, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **29**, 54 (2018).
- ⁵⁷K. Ronaldson-Bouchard y G. Vunjak-Novakovic, “Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development”, *Cell Stem Cell* **22**, 310-324 (2018).
- ⁵⁸V. Silverio y S. Cardoso de Freitas, “Microfabrication Techniques for Microfluidic Devices”, en *Complex Fluid-Flows in Microfluidics* (Springer International Publishing, Cham, 2018), págs. 25-51.
- ⁵⁹M. Tanyeri y S. Tay, “Viable cell culture in PDMS-based microfluidic devices”, en *Methods in Cell Biology*, *Methods in cell biology* (Elsevier, 2018), págs. 3-33.
- ⁶⁰*DIGEMID, Guia tecnica: Guia de Inspeccion de Buenas Practicas de Manufactura de Productos Farmaceuticos* ().
- ⁶¹C. T. Ambrose, “An amended history of tissue culture: Concerning Harrison, Burrows, Mall, and Carrel”, en, *J. Med. Biogr.* **27**, 95-102 (2019).
- ⁶²J. R. Cantor, “The Rise of Physiologic Media”, *Trends in Cell Biology* **29**, 854-861 (2019).
- ⁶³J. Costa y A. Ahluwalia, “Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **7**, 1-14 (2019).
- ⁶⁴C. Hirsch y S. Schildknecht, “In Vitro Research Reproducibility: Keeping Up High Standards”, *Frontiers in Pharmacology* **10**, 10.3389/fphar.2019.01484 (2019).
- ⁶⁵J. H. Jee, D. H. Lee, J. Ko, S. Hahn, S. Y. Jeong, H. K. Kim, E. Park, S. Y. Choi, S. Jeong, J. W. Lee, H.-J. Cho, M.-S. Kwon y J. Yoo, “Development of collagen-based 3D matrix for gastrointestinal tract-derived organoid culture”, en, *Stem Cells Int.* **2019**, 8472712 (2019).
- ⁶⁶B. T. Mehl y R. S. Martin, “Integrating 3D cell culture of PC12 cells with microchip-based electrochemical detection”, en, *Anal. Methods* **11**, 1064-1072 (2019).
- ⁶⁷E. Mfoumou, M. Tango y P. Kin Wong, “Tuning Polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical applications”, en, *Adv. Mater. Lett.* **10**, 107-111 (2019).
- ⁶⁸Mirabelli, Coppola y Salvatore, “Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research”, *Cancers* **11**, 1098 (2019).

- ⁶⁹D. Sharma, W. Jia, F. Long, S. Pati, Q. Chen, Y. Qyang, B. Lee, C. K. Choi y F. Zhao, “Polydopamine and collagen coated micro-grated polydimethylsiloxane for human mesenchymal stem cell culture”, en, *Bioact. Mater.* **4**, 142-150 (2019).
- ⁷⁰L. Wang, S. Wu, G. Cao, Y. Fan, N. Dunne y X. Li, “Biomechanical studies on biomaterial degradation and co-cultured cells: mechanisms, potential applications, challenges and prospects”, *Journal of Materials Chemistry B* **7**, 7439-7459 (2019).
- ⁷¹F. Akther, S. B. Yakob, N.-T. Nguyen y H. T. Ta, “Surface Modification Techniques for Endothelial Cell Seeding in PDMS Microfluidic Devices”, *Biosensors* **10**, 182 (2020).
- ⁷²M. Antfolk y K. Jensen, “A bioengineering perspective on modelling the intestinal epithelial physiology in vitro”, *Nature Communications* **11**, 10.1038/s41467-020-20052-z (2020).
- ⁷³N. Azizpour, R. Avazpour, D. H. Rosenzweig, M. Sawan y A. Ajji, “Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip”, en, *Micromachines (Basel)* **11**, 599 (2020).
- ⁷⁴N. J. Darling, C. L. Mobbs, A. L. González-Hau, M. Freer y S. Przyborski, “Bioengineering Novel in vitro Co-culture Models That Represent the Human Intestinal Mucosa With Improved Caco-2 Structure and Barrier Function”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**, 10.3389/fbioe.2020.00992 (2020).
- ⁷⁵H. Hu, S. Li, C. Ying, R. Zhang, Y. Li, W. Qian, L. Zheng, X. Fu, Q. Liu, S. Hu y C. P. Wong, “Hydrophilic PDMS with a sandwich-like structure and no loss of mechanical properties and optical transparency”, en, *Appl. Surf. Sci.* **503**, 144126 (2020).
- ⁷⁶F. Jahangiri, T. Hakala y V. Jokinen, “Long-term hydrophilization of polydimethylsiloxane (PDMS) for capillary filling microfluidic chips”, en, *Microfluid. Nanofluidics* **24** (2020).
- ⁷⁷J. Liu, H. Zheng, X. Dai, P. S. P. Poh, H.-G. Machens y A. F. Schilling, “Transparent PDMS Bioreactors for the Fabrication and Analysis of Multi-Layer Pre-vascularized Hydrogels Under Continuous Perfusion”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**, 10.3389/fbioe.2020.568934 (2020).
- ⁷⁸P. Pranjal Mishra y M. S. Michael Greenwood, *The history of microplates*, en, <https://www.news-medical.net/life-sciences/The-History-of-Microplates.aspx>, Accessed: 2023-11-19, mar. de 2020.
- ⁷⁹W. Shin, Y. M. Ambrosini, Y. C. Shin, A. Wu, S. Min, D. Koh, S. Park, S. Kim, H. Koh y H. J. Kim, “Robust formation of an epithelial layer of human intestinal organoids in a polydimethylsiloxane-based gut-on-a-chip microdevice”, en, *Front. Med. Technol.* **2** (2020).
- ⁸⁰S. Sreekantan, M. Hassan, S. Sundera Murthe y A. Seeni, “Biocompatibility and cytotoxicity study of polydimethylsiloxane (PDMS) and palm oil fuel ash (POFA) sustainable super-hydrophobic coating for biomedical applications”, en, *Polymers (Basel)* **12**, 3034 (2020).
- ⁸¹J. Creff, L. Malaquin y A. Besson, “In vitro models of intestinal epithelium: Toward bioengineered systems”, *Journal of Tissue Engineering* **12**, 204173142098520 (2021).
- ⁸²M. Dabaghi, S. Shahriari, N. Saraei, K. Da, A. Chandiramohan, P. R. Selvaganapathy y J. A. Hirota, “Surface modification of PDMS-based microfluidic devices with collagen using polydopamine as a spacer to enhance primary human bronchial epithelial cell adhesion”, en, *Micromachines (Basel)* **12**, 132 (2021).
- ⁸³M.-K. Hayward, J. M. Muncie y V. M. Weaver, “Tissue mechanics in stem cell fate, development, and cancer”, *Developmental Cell* **56**, 1833-1847 (2021).
- ⁸⁴M. Litwinowicz, S. Rogers, A. Caruana, C. Kinane, J. Tellam y R. Thompson, “Tuning the bulk and surface properties of PDMS networks through cross-linker and surfactant concentration”, en, *Macromolecules* **54**, 9636-9648 (2021).
- ⁸⁵B. Majhy, P. Priyadarshini y A. K. Sen, “Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth - facile surface modification for enhanced cell culture”, en, *RSC Adv.* **11**, 15467-15476 (2021).
- ⁸⁶I. Miranda, A. Souza, P. Sousa, J. Ribeiro, E. M. S. Castanheira, R. Lima y G. Minas, “Properties and applications of PDMS for biomedical engineering: A review”, en, *J. Funct. Biomater.* **13**, 2 (2021).
- ⁸⁷M. Richter, O. Piwocka, M. Musielak, I. Piotrowski, W. M. Suchorska y T. Trzeciak, “From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, 10.3389/fcell.2021.711381 (2021).
- ⁸⁸S. Youhanna y V. M. Lauschke, “The past, present and future of intestinal in vitro cell systems for drug absorption studies”, en, *J. Pharm. Sci.* **110**, 50-65 (2021).
- ⁸⁹J. Zhang, M. Liu, G. Pearce, Y. Yu, Z. Sha, Y. Zhou, A. C. Y. Yuen, C. Tao, C. Boyer, F. Huang, M. Islam y C. H. Wang, “Strain stiffening and positive piezoconductive effect of liquid metal/elastomer soft composites”, en, *Compos. Sci. Technol.* **201**, 108497 (2021).
- ⁹⁰D. Aydemir, S. Dogru, B. E. Alaca y N. N. Ulusu, “Impact of the surface modifications and cell culture techniques on the biomechanical properties of PDMS in relation to cell growth behavior”, en, *Int. J. Polym. Mater.* **71**, 886-897 (2022).

- ⁹¹N. Azizipour, R. Avazpour, M. Sawan, A. Aji y D. H Rosenzweig, “Surface optimization and design adaptation toward spheroid formation on-chip”, en, *Sensors (Basel)* **22**, 3191 (2022).
- ⁹²M. Babaei, S. Bonakdar y B. Nasernejad, “Selective biofunctionalization of 3D cell-imprinted PDMS with collagen immobilization for targeted cell attachment”, *Scientific Reports* **12**, 10.1038/s41598-022-17252-6 (2022).
- ⁹³K. L. Elidóttir, L. Scott, R. Lewis e I. Jurewicz, “Biomimetic approach to articular cartilage tissue engineering using carbon nanotube-coated and textured polydimethylsiloxane scaffolds”, en, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1513**, 48-64 (2022).
- ⁹⁴S. E. I, “Diseño e Implementación de una Plataforma de Microtitulación Elástica que genera Esfuerzos Cortantes y Elongaciones Homogéneas para Cultivo de Células Bidimensionales”, Tesis doct. (Pontificia Universidad Católica del Perú”, mayo de 2022).
- ⁹⁵P. C. Wynn y P. A. Sheehy, “Milk proteins: Minor proteins, bovine serum albumin, and vitamin-binding proteins and their biological properties”, en *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Elsevier, 2022), págs. 942-947.
- ⁹⁶*WST-1 Assay Reagent - Cell Proliferation (ready to use) (ab155902)*, en, <https://abcam.com/products/assay-kits/wst-1-assay-reagent-cell-proliferation-ready-to-use-ab155902.html>, Accessed: 2023-11-29, nov. de 2023.
- ⁹⁷<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pluronic-F-127>., Accessed: 2023-11-29.
- ⁹⁸<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triton-X-100>., Accessed: 2023-11-29.
- ⁹⁹<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tween-20>., Accessed: 2023-11-29.
- ¹⁰⁰*ATCC Culture Guides*, <https://www.atcc.org/resources/culture-guides>, Accessed: 2023-12-8.
- ¹⁰¹*Counting cells with a hemocytometer*, en, <https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html>, Accessed: 2023-11-29.
- ¹⁰²I. y. D. (Dirección General de Medicamentos, *Buenas Prácticas de Manufactura. Resolución Ministerial N° 055-99.SA/DM (1999)*).
- ¹⁰³Invitrogen, “CELL CULTURE BASICS Handbook”,
- ¹⁰⁴M. J. R, “HeLa Cells 50 Years On: The Good, The Bad, and The Ugly in The Embryo Project Encyclopedia”, <https://embryo.asu.edu/pages/hela-cells-50-years-good-bad-and-ugly-2002-john-r-masters> (n.d.).

Anexo A

Imágenes de diseño de plataforma

