



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

FACULTAD DE CIENCIAS

**GENERACIÓN DE MICROPATRONES DE COLÁGENA TIPO I EN
PDMS MEDIANTE IMPRESIÓN POR MICROCONTACTO PARA
CONFINAMIENTO CELULAR EN PLATAFORMA BIOMIMÉTICA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

M. en C. LIDIA ESCUTIA GUADARRAMA

TUTOR PRINCIPAL

DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARINA MACÍAS SILVA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. FRANCISCO MANUEL SÁNCHEZ ARÉVALO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. ABRIL, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS	6
Dedicatoria	8
Agradecimientos	9
Resumen	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Señales del microambiente que tienen impacto en la función celular	15
1.2 Técnicas y materiales para microfabricación de plataformas de cultivo celular	18
1.2.1 Técnicas de microfabricación	18
1.2.1.1 Fotolitografía	19
1.2.1.2 Litografía suave	20
1.2.1.3 Ablación láser	23
1.2.3 Materiales de microfabricación para plataformas de cultivo celular	24
1.2.3.1. PDMS	24
1.2.3.2 Control de propiedades del PDMS	25
1.3 Modelos de cultivo <i>in vitro</i>	27
1.3.1. Modelos bidimensionales	27
1.3.2. Modelos de cultivo tridimensional	28
1.3.3 Tecnología organ on a chip	30
1.3.4 Ventajas y limitaciones de los modelos de cultivo celular	31
1.4 El hígado: fisiología, microarquitectura y cultivo de células hepáticas	32
1.4.1 Fisiología hepática	33
1.4.2 Microarquitectura hepática	33
1.4.3 Marcadores de fenotipo y funcionalidad de hepatocitos	36
1.4.4 Transición Epitelio - Mesénquima (TEM)	38
1.4.5 Avances y retos relacionados con el cultivo de hepatocitos	41
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS	43
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	44
2.1 Preparación de los sustratos de PDMS	44
2.2 Modificación química de superficie	45
2.3 Caracterización fisicoquímica de los sustratos	46
2.3.1 Medición de ángulo de contacto	46
2.3.2 Análisis de topografía por Microscopía de Fuerza Atómica	47

2.3.3 Caracterización superficial por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	47
2.4 Microfabricación de moldes para impresión por microcontacto	47
2.4.1 Microfabricación por fotolitografía	47
2.4.2 Microfabricación por ablación láser	48
2.5 Obtención de estampas elastoméricas por réplica-molde	48
2.6 Impresión por microcontacto	49
2.7 Aislamiento de hepatocitos y cultivo celular	51
2.8 Ensayos de viabilidad y proliferación	51
2.9 Ensayos de inmunofluorescencia	52
2.10 Análisis estadístico	54
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.1 Caracterización de los moldes	55
3.2 Caracterización de la superficie de los sustratos químicamente modificados	56
3.2.1 Caracterización del ángulo de contacto	58
3.2.2 Caracterización de la topografía	59
3.2.3 Caracterización por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X	60
3.3 Caracterización del microestampado con colágena tipo I	61
3.4 Viabilidad y proliferación celular	62
3.5 Organización del citoesqueleto de actina	63
3.6 Resultados iniciales de viabilidad, funcionalidad y fenotipo en hepatocitos de rata	65
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	69
APÉNDICE. PUBLICACIONES	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura número	Pie de figura	Página
1	Ejemplos de algunas señales del microambiente celular <i>in vivo</i> que definen el comportamiento de la célula.	16
2	Esquema del proceso de fotolitografía.	19
3	Proceso molde - réplica.	21
4	Proceso de fabricación de la estampa de PDMS y la impresión por microcontacto de proteína sobre un sustrato	22
5	Posibles distorsiones que pueden presentarse en las microestructuras de las estampas elastoméricas	23
6	Estructura química del polidimetilsiloxano	25
7	Esquema de la reacción de entrecruzamiento entre los oligómeros entrecruzantes y el prepolímero.	25
8	A. Esquema de la organización molecular del APTES formando una monocapa autoensamblada al silanizar el PDMS. B. La molécula de APTES se une de manera covalente al PDMS oxidado y posteriormente se activa con glutaraldehído, esto favorece la inmovilización de la proteína por unión covalente y por lo tanto una mejor interacción célula - sustrato	26
9	Diversos formatos para cultivo bidimensional en poliestireno	27
10	Técnicas de cultivo 3D. A: Estructuras porosas denominadas andamios que le dan soporte a las células para crecer y migrar en 3 dimensiones. B: Las técnicas libres de andamios están basadas en la formación de esferoides cultivados en suspensión o con una matriz como soporte.	29
11	Dispositivo <i>organ-on-a-chip</i>	30
12	Algunos diseños de dispositivos <i>organ-on-a-chip</i> desarrollados en el Wyss Institute	31
13	Esquema de la arquitectura hepática desde lo macro hasta lo micro	34
14	Localización de los diferentes tipos celulares hepáticos	35
15	Esquema comparativo entre la polarización simple y la polarización que se presenta en los hepatocitos. UE: uniones estrechas, CB: canalículo biliar	36
16	Cambios en las células durante la TEM. A: Células epiteliales con una polaridad definida, presencia de uniones célula-célula que mantienen la integridad estructural del tejido e interacciones integrina - MEC que las mantiene unidas a la membrana basal. B: Células mesenquimales sin polaridad, ausencia de uniones célula - célula, diferentes integrinas involucradas en la unión célula - MEC, producción de metaloproteinasas	40

	que remodelan la MEC, son fuente de proteínas de señalización como TGF β que actúan sobre las células epiteliales.	
17	Cambios morfológicos de las células durante la TEM	41
18	Distribución de los diferentes diseños sobre la oblea de Si/SU8. A: Diseño D-100, círculos de 100 μ m de diámetro, espaciamiento vertical y horizontal 300 μ m. B: Diseño D-200, círculos de 200 μ m de diámetro, espaciamiento vertical y horizontal 600 μ m. C: Diseño L-40, bandas de 40 μ m de ancho con espaciamiento de 80 μ m. D: Diseño T-100, Triángulos rectángulos con catetos de 100 μ m, espaciamiento vertical y horizontal 300 μ m.	48
19	Proceso de fabricación de plataformas con micropatrones de colágena tipo I generados por impresión por microcontacto.	50
20	Caracterización por perfilometría de los moldes de líneas obtenidos por A: fotolitografía y B: ablación láser	55
21	Fotomicrografías de las réplicas en PDMS 184 de los diferentes moldes, A: molde de acrílico, B, C y D: molde en oblea de silicio/SU-8.	56
22	Fotomicrografías de microscopía óptica de las grietas formadas sobre PDMS 527 después de ser tratado con APTES. Objetivos 4X y 10X respectivamente.	57
23	Fotomicrografía de Microscopía Electrónica de Barrido de las grietas formadas sobre PDMS 184 después de ser tratado con APTES	58
24	Ángulos de contacto de los diferentes sustratos tratados y muestras control reportados por el equipo DSA100.	59
25	Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica de las superficies de sustratos de PDMS 184 con diferentes tratamientos de funcionalización.	60
26	Análisis por Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X de sustratos de PDMS 184 con diferentes tratamientos de funcionalización.	61
27	Micropatrones de colágena I depositados sobre PDMS suave: objetivo 4X (izquierda), fotomicrografía de inmunofluorescencia con anti-colágena I. Barras de escala 200 μ m	61
28	Alta adhesión, viabilidad y proliferación de células HepG2 confinadas en sustratos de PDMS suave y rígido tratados con APTES/GA con patrones de líneas de Col I. A: Adhesión, viabilidad y proliferación en células HepG2, evaluadas con el ensayo de Calceína AM/PI (células vivas en verde, muertas en rojo), barra de escala = 200 μ m. B-C: Células vivas y muertas presentadas como porcentaje de número de células basado en el área ocupada de células teñidas con calceína (células vivas/barras verdes) y yoduro de propidio (células muertas/barras rojas). *p < 0.0318 (suave vs rígido, células vivas), *p < 0.0201 (suave vs vidrio, células vivas) y ns = no significativo (rígido vs vidrio y en todas las condiciones de células muertas). D: Imágenes de epifluorescencia en células HepG2 mostrando el marcador HNF4 con localización nuclear. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala = 50 μ m.	63
29	Localización de actina en células HepG2 confinadas en patrones de líneas de Col I sobre sustratos de PDMS rígido y suave con superficie	65

químicamente modificada. A: Tinción de los filamentos de actina mediante faloidina acoplada a Alexa 594. Las imágenes de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y microscopía confocal fueron tomadas a las 48 horas de cultivo. Barra de escala = 50 μm . B: Niveles relativos de F-actina medidos como contraste de fluorescencia (a.u. = unidades arbitrarias) y como ancho de anillo de actina (μm), * $p < 0.021$ (célula - célula, contraste) y ** $p < 0.008$ (célula- célula, ancho). C: Tinción de F-actina con faloidina acoplada a Alexa 594 (rojo) en células transfectadas con LifeAct-mTurquoise2 (cian). Barra de escala = 30 μm .

- | | | |
|----|--|----|
| 30 | <p>Confinamiento de hepatocitos primarios de rata cultivados sobre micropatrones de Colágena I obtenidos por impresión por microcontacto en sustratos de PDMS rígido y suave químicamente modificados con APTES/GA. A: Evaluación de la viabilidad de los hepatocitos con el método de Calceína AM/PI (células vivas en verde, muertas en rojo). Las imágenes de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y microscopía confocal fueron tomadas a las 24 horas de cultivo. Barra de escala = 100 μm. B: Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la expresión de albúmina (citósol) y HNF4-α como marcadores hepáticos específicos después de 24 horas de cultivo. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala = 20 μm. C: Imágenes de microscopía confocal de hepatocitos primarios de rata cultivados sobre PDMS suave y rígido tratado con APTES/GA y recubierto totalmente con Colágena I mostrando expresión de albúmina (citósol) y HNF4-α como marcadores hepáticos específicos después de 24 horas de cultivo. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala = 20 μm</p> | 66 |
| 31 | <p>Niveles de expresión de proteínas marcadoras de fenotipo y función en Hepatocitos y HepG2. Se analizaron extractos totales de Hepatocitos frescos, Hepatocitos cultivados por 24h y 7 días, así como células HepG2 cultivadas por 24 h sobre PDMS 527, 184 y vidrio. Se detectaron por Western Blot, vimentina, albúmina, citoqueratina 18, HNF4 (Factor nuclear de hepatocitos 4) y AFP (alfa- feto proteína). Se indican los pesos moleculares de cada proteína en KDa</p> | 67 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla número	Encabezado	Página
1	Cuadro comparativo entre los diferentes modelos de cultivo celular.	30
2	Marcadores de fenotipo hepático	35
3	Descripción de los diferentes métodos de funcionalización con APTES	43
4	Anticuerpos primarios para el ensayo de Western Blot	50

ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin (α -Actina de Músculo Liso)
AFM	Atomic Force Microscopy (Microscopía de Fuerza atómica)
APTES	3-(aminopropil)triétoxissilano
CB	Canalículo Biliar
CK	Citoqueratina
CNC	Computerized Numeric Control (Control Numérico Computarizado)
CO ₂	Dióxido de carbono
CPS	Carbomil Fosfato Sintasa
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DPP4	Dipeptidil peptidasa 4
EGF	Epidermic Growth Factor (Factor de Crecimiento Epidérmico)
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
GA	Glutaraldehído
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Factor de Crecimiento de Hepatocitos)

HNF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (Factor Nuclear 4 α de Hepatocitos)
μ CP	Microcontact printing (impresión por microcontacto)
μ m	Micrómetros
μ TM	Microtransfer Molding (Moldeo por Microtransferencia)
MEC	Matriz Extracelular
MIMIC	Micromolding in Capillaries (Micromoldeo Capilar)
MMPs	Metaloproteinasas
MRP2	Multidrug Resistance-Associated Protein 2
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEGMEA	Propilenglicol monoéter acetato
PMMA	Polimetilmetacrilato
SAMIM	Solvent-Assisted Micromolding (Micromoldeo Asistido por Solvente)
TEM	Transición Epitelio - Mesénquima
TGF \square	Transforming Growth Factor \square (Factor de Crecimiento Transformante \square)
UE	Uniones Estrechas
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy (Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X)
ZO-1	Zonula Occludens-1

Dedicatoria

A mi padre Jaime; aunque ya no estés conmigo, mucho de lo que hoy soy es gracias a tí. Imagino cuánta ilusión te habría hecho poder compartir este momento juntos, sé que hoy lo disfrutas en donde sea que te encuentres. Gracias por enseñarme a ir siempre para adelante.

A mi madre Paz Lidia; esta etapa la disfrutamos y la sufrimos juntas, gracias por apoyarme incondicionalmente siempre, por estar en los momentos de alegría y de tristeza, por tener un abrazo amoroso siempre que lo necesito. Eres un ejemplo para mí de que siempre es posible sobreponerse a las adversidades, que no hay que rendirse.

A mi familia; Sarita, Julia, Miguel Ángel, Arturo, Abril, Karina, Andrea, Miguel, María José y mis consentidos... Matías y Moisés. Gracias por su cariño y por acompañarme durante cada etapa de mi formación.

A mi querida Reyna Gómora; agradezco tu estar, siempre con palabras sensibles que me ayudaron a conocerme y entenderme mejor en este proceso y mostrarme otras herramientas para afrontar las dificultades. Sin duda dejas una huella importante en mi vida, recibe siempre gran admiración de este alebrije.

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Mathieu Hautefeuille, por su gran disposición siempre para apoyarme, por sus comentarios para enriquecer este trabajo y por todas las oportunidades brindadas durante mi estancia en el LaNSBioDyT.

A los miembros del comité tutor, la Dra. Marina Macías Silva y el Dr. Francisco Sánchez Arévalo por sus valiosas aportaciones para este proyecto.

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio por la asesoría brindada en las técnicas biológicas.

A los miembros del jurado por las observaciones y sugerencias realizadas para este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) y al Laboratorio 225 Norte del Instituto de Fisiología Celular por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio de Química de Radiaciones en Macromoléculas (ICN, UNAM) y la Dra. Alejandra Ortega Aramburu por permitirme el uso del equipo para medición de ángulo de contacto.

Al Dr. Fernando García Hernández, de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo brindado para el uso del microscopio de epifluorescencia y microscopio confocal.

Al Fís. Lázaro Huerta Arcos por los análisis de XPS.

Al Fís. Yasab Ruiz Hernández por su ayuda con las mediciones de AFM.

A Aarón Cruz Ramírez y al Ing. Raúl Sánchez Olvera por el apoyo técnico en la fabricación de los moldes mediante grabado láser.

A Diego Zamarrón Hernández por su apoyo en los ensayos de perfilometría.

A todos mis compañeros del laboratorio de micro y nanotecnología (uNTec) por tener siempre una sonrisa que compartir, por brindarme su amistad y por todo lo que juntos aprendimos. Especialmente quiero agradecer a la Fís. María José González Vázquez, al M. en C. Daniel Pérez Calixto y al Dr. Jehú López Aparicio por su apoyo y contención, teniendo siempre palabras de aliento para mí en los momentos difíciles, por estar siempre dispuestos a ayudarme en lo que fuera necesario, por escuchar,

por tener detalles para alegrarme el día, por ayudarme a encontrar soluciones cuando me costaba verlas, por estar con el corazón... ¡Gracias!

A mis queridos amigos con quienes he pasado excelentes momentos a lo largo de todos estos años, dentro y fuera de la universidad: Isidro Badillo, Verónica Gutiérrez, María Luisa del Prado, Rosaura Rivera, Chuy Álvarez, Ulises González, Ana Bobadilla, David Rocha, Leonardo Moreno, Anakaren Puentes, Alex Francisco, Zaira Medina, Marina Galicia, Lillian Garduño, Víctor Limón, Margarita González, Mónica Alva, Edgar Merino, Gerardo Ortega. Cada uno tiene un lugar especial para mí, ¡gracias por su amistad, su paciencia, sus porras, sus bromas, sus memes (sí, sobre todo sus memes jaja) y por ser parte importante de mi historia de vida. Los quiero.

A CONACYT por el financiamiento otorgado a través de los proyectos 246988, 280317 y la beca de doctorado No. 353349.

A la UNAM por darme la oportunidad de culminar mi formación profesional en esta maravillosa casa de estudios.

A todas las personas que no mencioné específicamente pero que en algún momento formaron parte de mi vida dejando un aprendizaje que me ayuda a crecer y ser mejor persona.

De corazón... ¡GRACIAS A TODOS!

*Nadie inventa nada, porque
todo está escrito en la naturaleza.
La originalidad consiste en
volver al origen.*

Antoni Gaudí

Resumen

En este trabajo se estudió la influencia sobre el comportamiento celular de parámetros como confinamiento y rigidez ya que estos parámetros promueven la funcionalidad celular. De manera específica se estudió la influencia de estas señales en células hepáticas. Se escogió la línea celular HepG2 proveniente de un hepatoma humano y hepatocitos primarios de rata por su propiedad de adhesión únicamente en presencia de proteínas de superficie, ya que existe un considerable interés en desarrollar estrategias que promuevan el mantenimiento de un fenotipo hepático estable y adecuada funcionalidad en cultivos a largo plazo, promoviendo así características esenciales de los hepatocitos como la polaridad (presentan una membrana celular asimétrica en la que cada dominio realiza funciones específicas), la cual está ausente en los cultivos tradicionales en dos dimensiones y que es de gran significancia para estudios de desarrollo de nuevos fármacos e investigación en el campo de la ingeniería de tejidos.

Así, se desarrolló una plataforma con características biomiméticas para cultivo de células hepáticas con polidimetilsiloxano (PDMS), un material polimérico biocompatible y de bajo costo, cuyas propiedades mecánicas son fácilmente modulables, ampliamente utilizado en el desarrollo de dispositivos microfluídicos. Su transparencia óptica permite la adquisición de imágenes o video en tiempo real de las células cultivadas en él, además de que su flexibilidad hace que se puedan aplicar estímulos mecánicos a las células mediante deformaciones locales del material, lo cual lo hace un material ideal para la fabricación de dispositivos tipo *organ-on-chip*. Además, la superficie del PDMS puede ser químicamente modificada para poder inmovilizar proteínas de matriz extracelular (MEC) como la colágena tipo I promoviendo así la adhesión celular, ya que algunos tipos de células como las HepG2 no se adhieren al sustrato sin la presencia de esta proteína. Para la inmovilización de la proteína de MEC en la superficie del PDMS de forma localizada y con una geometría específica se implementó un método de litografía suave llamado impresión por microcontacto (uCP por sus siglas en inglés), este método permite la generación de patrones de proteína de MEC en la superficie de sustratos de PDMS para tener un control sobre la geometría y el confinamiento de las células hepáticas sobre el sustrato. El control del microambiente celular permite estudiar los mecanismos celulares implicados en las interacciones célula-célula y célula-sustrato, esenciales en la investigación con aplicaciones médicas (cáncer, medicina regenerativa, búsqueda de nuevos fármacos, etc.)

Se sembraron de manera satisfactoria células HepG2 y hepatocitos de cultivo primario sobre los sustratos de PDMS de dos diferentes rigideces (suave: 12-13 kPa, rígido: 1-2 MPa) con los micropatrones de colágena I generados, se comprobó viabilidad con el ensayo de calceína AM/yoduro de propidio y adhesión, lo que no sucede en sustratos de PDMS sin tratamiento. También se evaluaron algunos marcadores de fenotipo y funcionalidad (HNF4- α , albúmina, alfa fetoproteína y vimentina) mediante Western Blot e inmunofluorescencia (HNF4- α y albúmina), así como la organización del

citoesqueleto de actina como validación de que las condiciones de fabricación de la plataforma (rigidez y confinamiento) favorecen la conservación del fenotipo celular en cultivo. Se observó que las células presentan una distribución cortical de actina al estar sobre los sustratos suaves, lo cual se espera en un fenotipo epitelial, mientras que en el sustrato rígido se forman más fibras de estrés, fenómeno generalmente asociado a un fenotipo mesenquimal. La proliferación es también menor en los sustratos suaves, comportamiento deseado para un hepatocito y que se busca en cultivo.

Los resultados anteriores indican que el método utilizado (uCP) para la transferencia superficial de proteínas de MEC con una geometría específica sobre un sustrato con rigidez modulable permiten crear microambientes celulares con características más biomiméticas lo que genera mejores modelos celulares de estudio. Cabe mencionar que el proceso es compatible con métodos de fabricación de dispositivos *lab on a chip* y órganos en un chip, que utilizan como material principal el PDMS, razón por la que fue elegido como material para la plataforma.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha hecho evidente que parámetros específicos del microambiente celular *in vivo* (estímulos mecánicos originados por la rigidez de la matriz extracelular, flujo, geometría del microambiente y factores solubles entre otros) tienen un impacto directo en el comportamiento y función celular [1].

Las técnicas tradicionales de cultivo celular carecen de elementos que puedan recrear la microarquitectura y el microambiente de los tejidos y órganos, lo que provoca una alteración en el fenotipo, comportamiento y función celular [2]. Por ello, se ha optado por crear plataformas de cultivo *in vitro* que permitan la modulación de este tipo de señales específicas logrando con el fin que las células cultivadas en estas plataformas más biomiméticas tengan un comportamiento que se aproxime más a las funciones que presentan *in vivo*.

En particular, cuando los hepatocitos (células que componen el hígado en su mayoría) son cultivados en monocapas sobre cajas de cultivo tradicionales, ya sea de poliestireno o vidrio, pierden su capacidad de organizarse de manera adecuada para poder restablecer funciones que los caracteriza dentro del órgano [3]. La pérdida de funciones hepáticas específicas y la alteración de su metabolismo aunado a un cambio de fenotipo cuestiona de manera importante el uso del cultivo tradicional bidimensional debido a que no ofrece resultados comparables a lo que sucede dentro del lobulillo hepático [4]. Además, los hepatocitos son las células responsables del metabolismo de sustancias ajenas al organismo, por lo que son considerados el estándar de oro como modelo *in vitro* para evaluar la posible toxicidad de moléculas que son estudiadas como posibles fármacos [5]. Por lo anterior, surge la necesidad de diseñar y fabricar una plataforma de cultivo celular que pueda integrar las condiciones geométricas, mecánicas y bioquímicas adecuadas para evitar o retrasar la pérdida de funcionalidad y fenotipo celular hepático. Este proyecto aspira a ofrecer una herramienta de integración de varios de estos parámetros en cultivo para estudio y mantenimiento de fenotipo de hepatocitos *in vitro*.

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

Los avances en distintos campos de la medicina y la biología se deben a nuestra habilidad para experimentar con los sistemas vivos. La investigación biomédica actual se realiza utilizando principalmente dos modelos experimentales: el cultivo celular y los animales de laboratorio. Sin embargo, aún cuando se han logrado avances extraordinarios en la medicina y la biología gracias a estos modelos, existen limitaciones para entender de manera más precisa la biología celular debido a que el microambiente dentro de una caja de cultivo de vidrio o poliestireno dista mucho de parecerse al microambiente *in vivo*, por lo que células no sólo cambian su comportamiento sino que pierden capacidad de reorganizarse entre ellas y remodelar su MEC con una microarquitectura que les permita llevar a cabo las funciones que realizan *in situ*, resultando en una disfuncionalidad en el cultivo celular tradicional en cajas y placas de poliestireno [6,7].

Así, por medio de la conjunción de la ciencia e ingeniería de materiales, la biología y las técnicas de microfabricación se han desarrollado nuevas plataformas de cultivo en un contexto más biomimético para poder hacer cada vez más estrecha la brecha existente entre el cultivo celular tradicional y la fisiología de cada órgano para conseguir un impacto de relevancia para la investigación básica y aplicada.

1.1 Señales del microambiente que tienen impacto en la función celular

In vivo, la microestructura de los tejidos define el entorno celular ya que determina las interacciones célula - célula y célula - MEC además de señales bioquímicas como factores de crecimiento y esfuerzos mecánicos [8]. Estas señales del microambiente actúan de manera cooperativa para regular el comportamiento celular, por lo cual resulta evidente que el cultivo en placas de poliestireno o cajas de vidrio genera un desajuste en la señalización celular, expresión de genes, fenotipo y funcionalidad [9].

El desafío actual es identificar los factores que son cruciales para ser incorporados en una plataforma biomimética para modelar de manera apropiada diferentes procesos *in vivo* en un cultivo celular de acuerdo al órgano de interés.

Se ha observado que señales del microambiente como la rigidez del sustrato, la geometría, el confinamiento y la composición de la MEC tienen una fuerte influencia sobre el comportamiento y función celular [7,8,10,11,12], por lo que se pueden estudiar los componentes del microambiente dividiéndolos en factores de adhesión, mecánicos, estructurales y químicos.

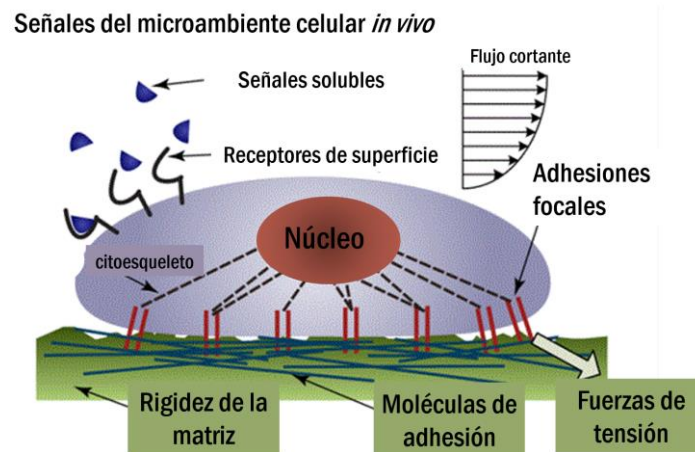


Figura 1. Ejemplos de algunas señales del microambiente celular *in vivo* que definen el comportamiento de la célula.

a) Adhesión

El estudio de la biología celular *in vitro* requiere inevitablemente el aislar a las células de su entorno nativo e interrumpir las interacciones célula - célula y célula - matriz, introduciéndolas en un entorno que con frecuencia dista mucho de tener características similares al entorno *in vivo*. Para las células dependientes de anclaje, las interacciones adhesivas con la MEC circundante y con las células vecinas definen la forma y organización celular [13]. Esta capacidad de unión entre células o célula y su MEC es llevada a cabo por una amplia colección de moléculas como integrinas y cadherinas, entre otras, que son utilizadas para percibir el entorno fisicoquímico del microambiente extracelular [14]. Por lo tanto, es importante conocer y, de ser posible, controlar la disponibilidad de proteínas de superficie para anclaje y estudiar su impacto sobre las células de interés.

b) Estímulos mecánicos

Son varios los mecanismos que transmiten los esfuerzos mecánicos externos como: microflujo, rigidez de la MEC y esfuerzos generados por el contacto entre células (fuerzas de tracción) al interior de la

célula donde son traducidos a señales bioquímicas en un proceso llamado mecanotransducción [15]. Un ejemplo de este proceso es el que llevan a cabo ciertos tipos de moléculas de adhesión (integrinas y cadherinas) unidas a moléculas mecanosensibles (vinculina, talina, α -catenina, β -catenina, entre otras) que a su vez están enlazadas al citoesqueleto (filamentos de actina y filamentos intermedios) lo que permite a la célula percibir la rigidez de la MEC y transmitir al núcleo esta señal [12,16]. Es importante tener un control sobre las propiedades mecánicas del sustrato sobre el cual se adhiere la célula, ya que dependiendo de la rigidez se pueden generar cambios en el fenotipo, diferenciación, proliferación, función, adhesión, migración y supervivencia [11,16,17,18,19].

c) Estructura, geometría y confinamiento

Una de las principales consecuencias de la adhesión celular es la formación de tejidos con una estructura bien definida, como consecuencia de ello las células son confinadas a un espacio geométrico específico lo que resulta de gran importancia en el comportamiento y funciones celulares ya que se ha comprobado que el confinamiento geométrico juega un papel relevante en la función, diferenciación, proliferación y apoptosis celular [10,20]. En los últimos años, el cultivo *in vitro* de diferentes tipos celulares utilizando micropatrones con geometrías específicas ha permitido revelar importantes pistas sobre cómo el confinamiento y la geometría del microambiente impacta a la fisiología celular, desde su organización intracelular hasta el estado de diferenciación [21,22]. La importancia de controlar la geometría de los micropatrones que forman los sitios de adhesión es que puede ser usada para limitar el esparcimiento (spreading) de la célula y mimetizar el confinamiento espacial fisiológico de un determinado tejido u órgano [23].

d) Composición química

Desde el punto de vista químico, la composición de la MEC juega un papel importante en el control del comportamiento celular [24] a través de vías de señalización mediadas por integrinas. Varias proteínas de la MEC se unen a integrinas a través de diversos mecanismos que tienen como resultado la puesta en marcha de múltiples vías de señalización y por lo tanto desencadenan un determinado comportamiento celular.

Algunas proteínas de MEC como la fibronectina contienen una secuencia particular de aminoácidos conocida como RGD, arginina - glicina - aspartato, que tiene efecto sobre las funciones celulares como la adhesión, ya que permite la unión entre las integrinas y la matriz extracelular [25]. Además de tener estos sitios de adhesión, la MEC también contiene diversas moléculas de señalización (factores de crecimiento, citocinas, etc.) con un mecanismo fuertemente regulado con relación a tiempos y sitios para la liberación de dichas moléculas, generando gradientes que son fundamentales en la regulación de procesos celulares como la migración [26]. Algunos de los mecanismos por los que pueden ser

liberadas estas moléculas son la regulación mediante componentes de la MEC como glucosaminoglucanos y proteoglucanos [27] o por acción mecánica de las células al ejercer fuerzas de tracción sobre las fibras [28], ilustrando que las señales químicas y mecánicas se encuentran estrechamente relacionadas

En la siguiente sección se describirán algunas de las técnicas y materiales que permiten la integración de características biomiméticas como las mencionadas en esta sección, al construir plataformas de cultivo celular.

1.2 Técnicas y materiales para microfabricación de plataformas de cultivo celular

Como se planteó en la sección anterior existe un gran desafío tecnológico para la producción de plataformas de cultivo que tengan la posibilidad de controlar los parámetros antes mencionados (adhesión, estímulos mecánicos, estructurales y componentes químicos) para permitir que los modelos celulares cultivados en estas plataformas se encuentren en un estado más parecido al que están en los sistemas vivos.

Para la producción de estas plataformas se han utilizado un conjunto de técnicas de fabricación que permiten manipular y estructurar materiales a escala micrométrica debido a que en esa magnitud se encuentran los procesos celulares, algunas de las características de los materiales a controlar son: rigidez, porosidad, solubilidad, estructura geométrica y curvatura [29].

1.2.1 Técnicas de microfabricación

Al conjunto de técnicas y procesos que permiten manipular materiales para la producción de dispositivos y estructuras a escala micrométrica se le llama microfabricación [30]. El auge de esta tecnología surge en 1947 con la invención del transistor y la fabricación de circuitos integrados, de aquí que la mayor parte de la maquinaria utilizada para microfabricación fue desarrollada inicialmente para aplicaciones relacionadas con la microelectrónica. Por lo anterior, estas técnicas no son específicas para aplicaciones médicas o biológicas; sin embargo han ofrecido un gran número de posibilidades para el estudio químico, biológico y físico de procesos a nivel celular y molecular [31].

El uso de la microfabricación brinda la posibilidad de explorar una gran variedad de diseños, geometrías y tamaños mediante los cuales es posible sembrar a las células en posiciones precisas para crear arreglos definidos. A continuación se describen algunas de las técnicas que se han utilizado extensamente para estos fines:

1.2.1.1 Fotolitografía

La fotolitografía es una de las técnicas de microfabricación más utilizadas para microestructurar patrones en un determinado material. Este proceso (figura 1) consiste en una serie de pasos en los cuales un patrón deseado es generado en la superficie de un sustrato, recubierto con una resina fotosensible depositada mediante spin coating, a través de la exposición de ciertas regiones del mismo a luz ultravioleta (UV), utilizando una máscara con regiones opacas. Dependiendo del tipo de resina fotosensible utilizada pueden presentarse dos posibles transformaciones después de haber sido expuesta a la radiación: cuando se ilumina una resina positiva, las regiones expuestas se solubilizan posteriormente con una solución de revelado y son retiradas del sustrato; por otro lado, una resina negativa es entrecruzada después de haber sido expuesta a la luz UV y en consecuencia sólo las partes no expuestas son removidas después del contacto con la solución de revelado [32]. Una de las resinas que se usan de manera más común es la SU-8, desarrollada originalmente por IBM. Esta resina epóxica negativa es entrecruzada por la exposición a luz UV en el rango de 350 a 400 nm y puede ser revelada con diversas sustancias como pueden ser propilenglicol monoeter acetato (PEGMEA), etil acetato o alcohol diacetona.

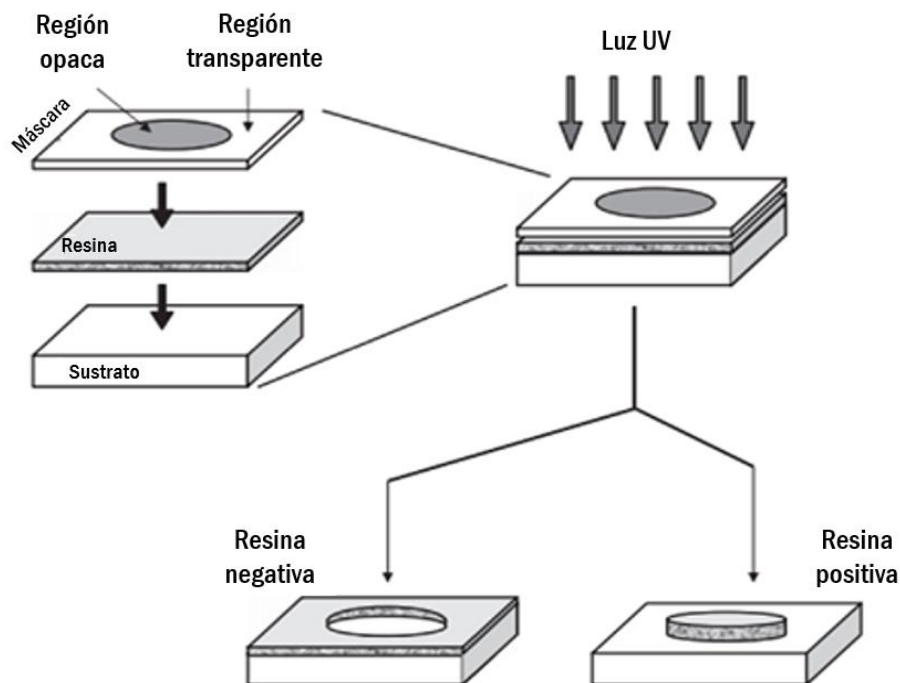


Figura 2. Esquema del proceso de fotolitografía.

Para fines relacionados con aplicaciones biológicas, esta técnica tiene varias limitaciones [33]:

- La fotolitografía es un proceso costoso ya que el equipo utilizado fue desarrollado para los procesos de alta precisión requeridos para la fabricación de dispositivos microelectrónicos. El capital

requerido para poder disponer de un cuarto limpio hace que la fotolitografía sea muy poco accesible para la mayoría de químicos y biólogos.

- Usualmente la fotolitografía se lleva a cabo colocando una máscara con un determinado patrón sobre una película de resina fotosensible. El tiempo y costo relacionados con la fabricación de estas máscaras presenta una barrera significativa para el uso de esta tecnología.
- Finalmente, la fotolitografía no ofrece control sobre la química de la superficie y no es aplicable a superficies curvas o no planas.

1.2.1.2 Litografía suave

La litografía suave representa un concepto diferente para el prototipado rápido de estructuras a escala micro y nanométrica en sustratos planos, curvos, flexibles y suaves. Es un conjunto de técnicas no fotolitográficas con las cuales se obtienen réplicas detallada de patrones en un material “suave” comparado a los materiales comunes de la microelectrónica. La ventaja principal de este proceso es su bajo costo [34], no requiere de equipos e instalaciones de laboratorio sofisticado para su realización como en el caso de la fotolitografía que se mencionó anteriormente.

La litografía suave engloba técnicas que han dado resultados satisfactorios para la fabricación de micro y nanoestructuras según las aplicaciones finales deseadas o las limitaciones tecnológicas del operador. Algunas técnicas de la litografía suave son: el proceso molde-réplica, impresión por microcontacto (*Microcontact Printing*, μ CP), micromoldeo asistido por solvente (*Solvent-Assisted Micromolding*, SAMIM), moldeo por microtransferencia (*Microtransfer Molding*, μ TM) y micromoldeo capilar (*Micromolding in capillaries*, MIMIC), entre otras. Este conjunto de técnicas fueron descritas por George Whitesides de manera muy detallada en [35] y [36]. En este trabajo se utilizaron dos procesos de litografía suave que se detallan a continuación.

- **Proceso molde-réplica**

El proceso molde-réplica (figura 3) permite duplicar la forma, tamaño y estructura geométrica de un molde maestro, así como generar patrones en un rango de materiales más amplio de los que son posibles con la fotolitografía. En contraste con la fotolitografía, esta técnica permite replicar estructuras tridimensionales en un sólo paso depositando un prepolímero sobre la superficie de un molde maestro que puede ser una oblea de silicio con patrones generados mediante fotolitografía. El prepolímero es entrecruzado y posteriormente desprendido obteniendo así la estructura en negativo del molde.

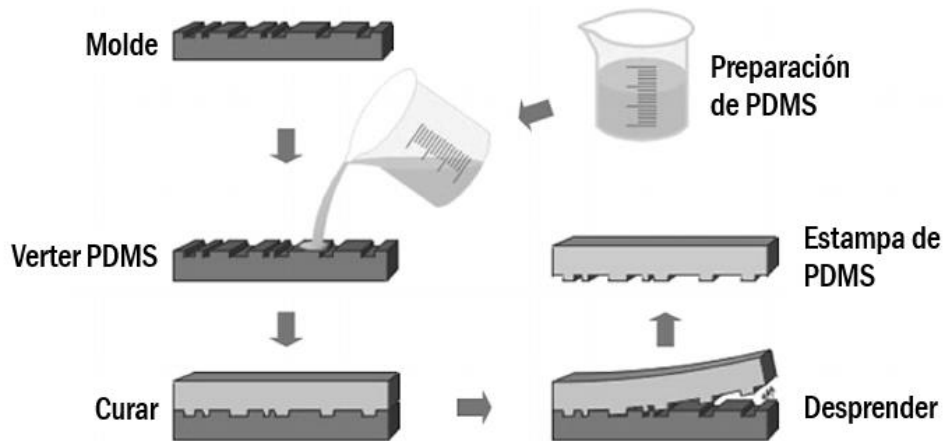


Figura 3. Proceso molde-réplica, tomada de [37]

- **Impresión por microcontacto**

La formación de micropatrones es una importante herramienta para el estudio del comportamiento celular en microambientes controlados. La técnica de impresión por microcontacto, descrita en esta sección, representa una forma de crear patrones en los que se puede controlar la distribución y composición de las proteínas unidas a la superficie, las cuales permiten la adhesión celular.

La impresión por microcontacto (μ CP) descrita por primera vez por el grupo de Whitesides, en 1993 [38], es un método en el cual se usa una estampa elastomérica con patrones en bajo relieve para transferir un material sobre una superficie como si fuera una “tinta”. El concepto general es tan simple como la manera en la que los niños utilizan sellos para imprimir figuras sobre papel.

Originalmente este método se usó para generar patrones de oro, pero rápidamente se volvió evidente que su uso podía ser generalizado a diferentes campos de investigación y las “tintas” utilizadas podían ser tan variadas como solventes orgánicos [39], polímeros [40], ADN [41], proteínas [42] y células [43].

El material más utilizado para fabricar las estampas es un elastómero transparente llamado polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184 que permite replicar los grabados de un molde maestro con alta fidelidad. La figura 4 esquematiza el proceso de impresión por microcontacto desde la obtención de la estampa de PDMS hasta la transferencia del compuesto o material deseado en un determinado patrón. Después de que el PDMS es entrecruzado, desprendido del molde maestro y cortado del tamaño adecuado para obtener los sellos, estos son “entintados” con el material que se busca imprimir. Para una estampa de 1 cm² de superficie, es suficiente colocar un volumen de 20 μ L de la solución que se desea transferir, como por ejemplo la proteína. Dado que la superficie de la estampa es hidrofóbica es necesario esparcir la gota, teniendo precaución de tocar los relieves lo menos posible y de manera suave.

Para que las moléculas se transfieran adecuadamente al sustrato, la unión a la nueva superficie debe ser más favorable que quedarse unidas a la estampa, por lo que la química de superficie tiene un papel importante en determinar la eficiencia de la transferencia.

Las estampas pueden ser almacenadas durante meses antes de ser usadas, de preferencia en una caja Petri sellada con parafilm. Sin embargo, es recomendable limpiar las estampas en un baño ultrasónico antes de ser usadas.

A pesar de que la alta compresibilidad de la estampa que es una de las características principales de la impresión por microcontacto, es también la causa de una importante desventaja. Al ser la estampa un material deformable, pueden presentarse diferentes situaciones en las que se existan fallas durante la transferencia debida justamente a alguna deformación durante la separación de la estampa del molde maestro o durante el contacto con el sustrato, lo que puede afectar la resolución y calidad del patrón obtenido, disminuyendo así la reproducibilidad de la técnica [45].

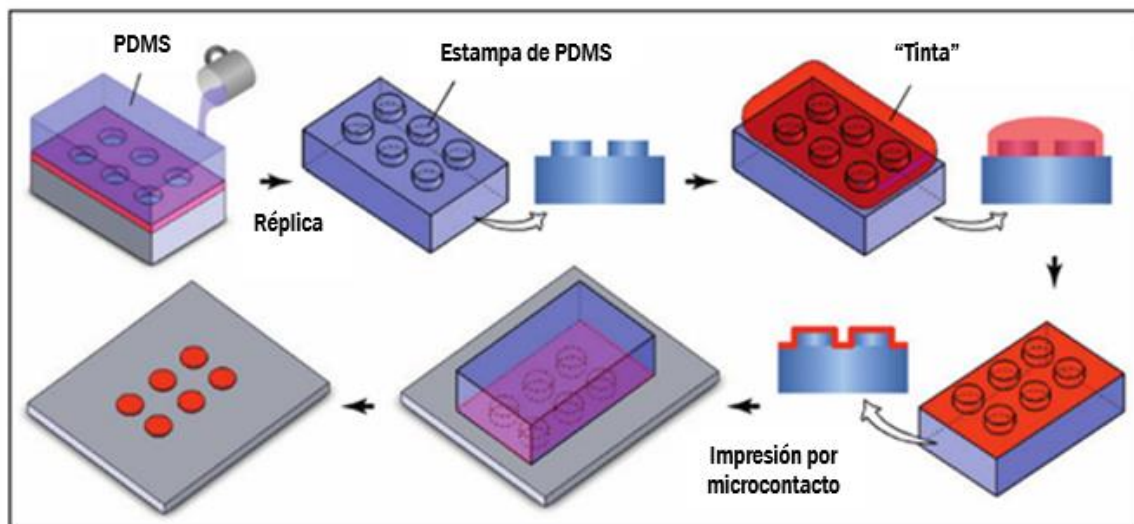


Figura 4. Proceso de fabricación de la estampa de PDMS y la impresión por microcontacto de proteína sobre un sustrato, imagen adaptada de [44].

La altura de los relieves dividido entre las dimensiones laterales del mismo, definen la relación de aspecto del patrón; cuando esta es alta, puede presentarse colapso lateral (figura 5.A) mientras que a valores bajos el colapso se presenta por la parte superior de la estampa (figura 5.B).

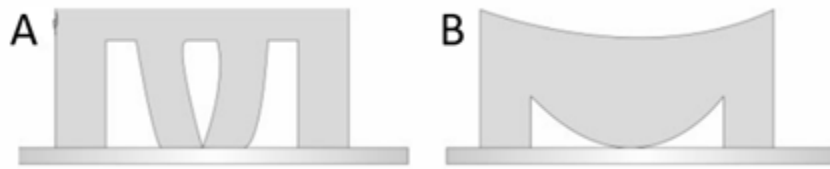


Figura 5. Posibles distorsiones que pueden presentarse en las microestructuras de las estampas elastoméricas imagen adaptada de [45].

1.2.1.3 Ablación láser

En muchas ocasiones, la utilidad de las técnicas de litografía suave se ve limitada por la disponibilidad de moldes apropiados. Usualmente estos son fabricados mediante técnicas costosas como la fotolitografía, que es uno de los métodos más convenientes para obtener moldes con microestructuras complejas, sin embargo, es un método de alto costo como ya se mencionó. Con la finalidad de reducir los costos de fabricación de los dispositivos para tener una tecnología más accesible, se han desarrollado otros métodos de fabricación de moldes de bajo costo alternativos a la fotolitografía, como la impresión del diseño en materiales de poliestireno termoplástico que al reducir su tamaño quedan estructuras de tamaño micrométrico [46].

Entre estas alternativas se encuentran las técnicas de microfabricación láser, que como su nombre lo indica, utilizan luz láser para poder generar estructuras tridimensionales en diferentes materiales. Es un método rápido ya que no requiere contacto mecánico ni etapas posteriores para obtener el producto final como en la fotolitografía que implica un paso adicional de revelado [47].

En particular, la ablación láser es un proceso en el que un haz enfocado proveniente de un láser elimina material de una superficie sólida, siempre y cuando la densidad de potencia del láser esté por encima de la energía mínima necesaria para que se produzca un cambio en la superficie del sustrato. Dado que los mecanismos de ablación dependen del tipo de material con el que se trabaje, en ocasiones se añade algún otro elemento o compuesto a la superficie del material que propicie la absorción de fotones y así, la ablación láser [48].

En el Laboratorio de Micro y Nanotecnología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se ha desarrollado una tecnología de ablación láser local o fotoablación, que consiste en remover o extraer localmente parte de un material sólido al irradiar la superficie con un láser [49]. Esta plataforma para prototipado rápido de bajo costo utiliza la unidad óptica de un lector de CD/DVD cuyo sistema de enfoque es de utilidad en la microfabricación láser. La ubicación del punto focal del haz láser es controlado mediante una plataforma con movimiento preciso en los ejes XYZ manejada mediante una

computadora, que a su vez cuenta con un software de control numérico computarizado (CNC) con el cual se pueden grabar los diseños digitalizados previamente [50].

1.2.3 Materiales de microfabricación para plataformas de cultivo celular

Las técnicas de microfabricación antes mencionadas tienen como fin estructurar materiales como el silicio y otros semiconductores por su papel en la industria electrónica pero por sus características mecánicas, superficiales y costo resultan poco efectivos para su uso en plataformas de cultivo [7, 51] por ello desde los años 60's se han utilizado y desarrollado una gran variedad de materiales para este fin.

El vidrio junto con placas, pozos y cajas de poliestireno tratadas superficialmente para promover la adhesión celular [52,53] han sido los materiales tradicionalmente utilizados para el cultivo celular pero, al igual que los semiconductores, su rigidez está muy por encima de los valores fisiológicos, además que sólo es posible el cultivo de monocapas estáticas en este tipo de sustratos. Debido a estas limitaciones, en los últimos años se han desarrollado diversos materiales poliméricos como elastómeros, geles e hidrogeles que permitan una modulación apropiada de la rigidez además de su estructuración para crear dispositivos microfluídicos que permiten el cultivo de sistemas dinámicos con flujo como estímulo mecánico [54,55,56]. Esto crea la capacidad de la fabricación de plataformas que imitan de mejor manera el ambiente celular in vivo.

Los hidrogeles son una excelente opción para mimetizar a la MEC debido a su estructura y su gran capacidad de incorporar agua; sin embargo, para fabricar una plataforma que le dé soporte a las células embebidas en el hidrogel, se requieren materiales con mayor capacidad de mantener una cierta estructura. Un material ampliamente utilizado para el desarrollo de plataformas biológicas o dispositivos de microfluídica para cultivo celular y/o ingeniería de tejidos (*organs-on-chip*) [44, 57] es el polidimetilsiloxano (PDMS). Sus características físicas, que se mencionan en la sección siguiente, lo hacen particularmente útil para dar soporte y estabilidad mecánica al dispositivo, permite el ensamblado de microválvulas, por su elasticidad y flexibilidad es posible aplicar estímulos mecánicos y se pueden realizar monitoreos de las células en el dispositivo en tiempo real.

1.2.3.1. PDMS

El PDMS es un polímero orgánico basado en cadenas de silicio y oxígeno (figura 6), este material elastomérico transparente pertenece al grupo de los materiales conocidos como siliconas. Es versátil, permeable a gases, de bajo costo, con un método de fabricación sencillo y propiedades mecánicas útiles en litografía suave.

Generalmente, el PDMS se produce a partir de un kit comercial como los que produce la compañía Dow Corning, el cual forma un material estable y transparente después de mezclar el componente base con el agente curante.

En este trabajo se utilizó el elastómero Sylgard 184 y el gel Sylgard 527. En ambos productos, el componente base es un prepolímero líquido a temperatura ambiente que al mezclarse con el agente curante y ser vertido sobre el molde se lleva a cabo una reacción organometálica de entrecruzamiento que puede ser acelerada mediante un tratamiento térmico. El agente curante contiene un catalizador basado en platino que facilita la formación de enlaces Si-CH₂-CH₂-Si permitiendo un entrecruzamiento tridimensional (figura 7). En esta reacción no se generan subproductos. Si se incrementa la proporción de agente curante con respecto a la base o prepolímero, se obtiene un elastómero más rígido como consecuencia de un mayor entrecruzamiento [58].

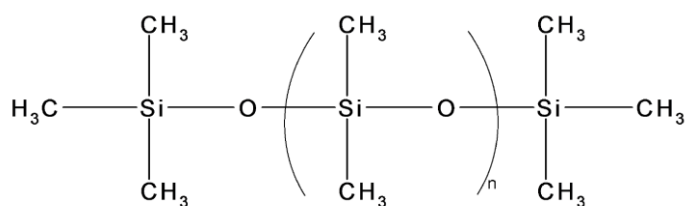


Figura 6. Estructura química del polidimetilsiloxano

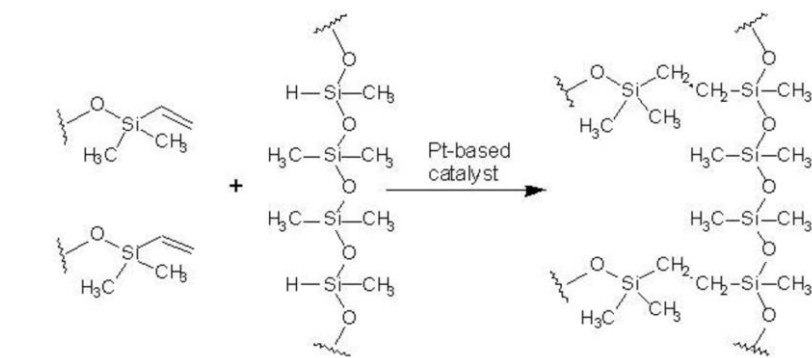


Figura 7. Esquema de la reacción de entrecruzamiento entre los oligómeros entrecruzantes y el prepolímero.

1.2.3.2 Control de propiedades del PDMS

No sólo la microestructuración juega un papel importante en los dispositivos de tipo *organ on a chip* o los biosensores basados en células. Factores como la química de la superficie y la rigidez del sustrato son de gran importancia para favorecer o no la interacción célula-sustrato lo cual se traduce en una buena adhesión celular.

A pesar de sus grandes ventajas, el PDMS es altamente hidrofóbico debido al empaquetamiento compacto de grupos metilo en la superficie del material. Dado que la mayoría de los ensayos biológicos se llevan a cabo en medio acuoso y la adhesión celular generalmente se inhibe en materiales hidrofóbicos, su aplicación como superficie para cultivo celular en dispositivos biológicos ha sido limitada. [59].

Aunque en varios trabajos [60, 61] se ha mejorado la mojabilidad de la superficie mediante tratamientos con plasma de oxígeno, radiación UV o adsorción de proteínas, estos efectos son generalmente transitorios y la hidrofobicidad se recupera con el tiempo [62]. De esto se deriva la necesidad de realizar modificaciones de superficie en el PDMS para mejorar su bioafinidad para lograr un cultivo celular estable. La modificación química de superficies mediante silanización tiene el potencial de promover una interacción célula sustrato más estable ya que los enlaces covalentes pueden incrementar la durabilidad de los recubrimientos de proteína o moléculas bioactivas.

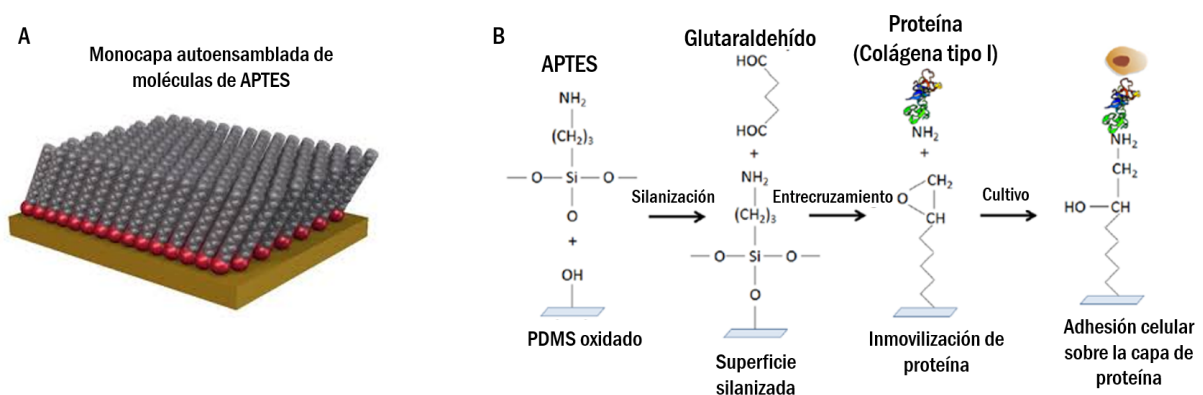


Figura 8. A. Esquema de la organización molecular del APTES formando una monocapa autoensamblada al silanizar el PDMS. B. La molécula de APTES se une de manera covalente al PDMS oxidado y posteriormente se activa con glutaraldehído, esto favorece la inmovilización de la proteína por unión covalente y por lo tanto una mejor interacción célula -sustrato (Modificado de [63]).

Kuddannaya y colaboradores en el 2013 [63] encontraron que la silanización del PDMS con la molécula (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) y glutaraldehído (GA) era una estrategia eficiente para inmovilizar proteínas de matriz extracelular (colágena tipo I) sobre la superficie y mejorar así su mojabilidad y por lo tanto la capacidad de interacción de células mesenquimales con la superficie. El esquema de esta modificación química se muestra en la figura 8.

Por otro lado, el PDMS es un material que ofrece la posibilidad de poder modificar su módulo elástico en función de la proporción en que se mezclen el componente base y el agente curante, lo cual lo vuelve interesante como biomaterial para estudios de mecanobiología. La mecánica es un componente importante de la regulación de la morfología celular, la proliferación, la migración y la diferenciación

en condiciones normales y patológicas [16]. Sin embargo, aún hay mucho por entender sobre cómo las células pueden percibir y responder a los estímulos mecánicos de su microambiente; por esta razón, el PDMS es frecuentemente usado en el desarrollo de dispositivos en los que se busca recrear el ambiente mecánico de las células para favorecer el biomimetismo.

1.3 Modelos de cultivo *in vitro*

El proceso de cultivo celular fue desarrollado en 1907 por Rose G. Harrison mientras investigaba el origen de los axones de las células nerviosas [64]. Su método permitía el crecimiento y diferenciación de células demostrando que diversas células de interés podían ser mantenidas fuera de su organismo de origen y ser observadas y estudiadas continuamente. Con el paso del tiempo, las técnicas de cultivo celular no sólo resultaron valiosas para estudios de biología celular sino que se introdujo su uso para realizar ensayos de toxicidad de diferentes compuestos químicos, siendo las más estudiadas aquellas moléculas con algún potencial para ser usadas como fármacos.

1.3.1. Modelos bidimensionales

El cultivo celular bidimensional, también conocido como cultivo celular tradicional, consiste en hacer crecer a las células en monocapa sobre una superficie plana como las de las cajas Petri, cajas de pozos o frascos de cultivo (figura 9) usualmente fabricada de vidrio o poliestireno. La monocapa consiste principalmente en células proliferativas ya que las células necróticas son removidas constantemente al cambiar el medio de cultivo.



Figura 9. Diversos formatos para cultivo bidimensional en poliestireno

Las células son mantenidas en condiciones controladas de temperatura (37 °C), humedad y en algunos casos en presencia de dióxido de carbono (CO₂), utilizando como fuente de nutrientes un medio de cultivo suplementado de acuerdo a las necesidades de cada tipo celular, usualmente con suero fetal bovino y L-glutamina para favorecer el crecimiento celular. Cuando las células alcanzan la confluencia (es decir, llenan la superficie de cultivo), son divididas y sub-cultivadas en nuevos frascos o cajas para evitar complicaciones por falta de nutrientes o inhibición de crecimiento por contacto.

Una gran cantidad de descubrimientos relacionados con el mejor entendimiento de la biología celular han sido posibles gracias a estos modelos. Sin embargo, uno de sus principales problemas es que su simplicidad no permite representar adecuadamente el microambiente *in vivo*, es decir las interacciones célula - célula y célula - MEC, la microarquitectura con la que se organizan las células en el tejido, el suministro de oxígeno y nutrientes y las características mecánicas de la MEC. Estas condiciones son factores clave para poder conservar el fenotipo de las células fuera del tejido [65]. Como resultado, en este tipo de cultivo las células presentan una morfología anormal que influye en varios procesos celulares entre los cuales están la proliferación, diferenciación, apoptosis y expresión de genes y proteínas [66]. De hecho, el cultivo celular 2D polariza a las células de tal manera que solo una parte de la membrana celular puede interactuar con el sustrato y las células vecinas, mientras que el resto de la membrana está expuesto al medio de cultivo; esta polarización “forzada” genera interacciones no naturales que afectan la señalización intracelular [67].

En el cultivo bidimensional, las células experimentan una concentración homogénea de nutrientes, factores de crecimiento, hormonas y citocinas en la sección de la membrana expuesta al medio de cultivo, lo cual es contrastante con el entorno *in vivo* en el cual todas esas moléculas que influyen en la respuesta celular poseen gradientes dinámicos [68]. En consecuencia, los datos obtenidos mediante cultivo 2D pueden ser engañosos, con poca relevancia fisiológica y con bajo poder predictivo de los resultados esperados *in vivo*.

Por esta razón, se ha continuado la búsqueda de modelos de cultivo con un mayor control del microambiente de las células, de manera que puedan desarrollarse de manera más similar a como lo hacen *in vivo*; sin embargo, el cultivo tradicional 2D sigue siendo el estándar de oro para los estudios *in vitro*.

1.3.2. Modelos de cultivo tridimensional

Diversas investigaciones respaldan que la morfología celular se vuelve más cercana a la que las células presentan normalmente *in vivo* cuando son cultivadas mediante técnicas de cultivo celular 3D [69,70]. Uno de los primeros modelos que buscaron recrear un entorno tridimensional es el conocido como sándwich de colágena [71]. Fue desarrollado en 1989 por James C.Y. Dunn y colaboradores particularmente para el cultivo de hepatocitos (células que conforman el parénquima del tejido hepático), ya que se conocía que los hepatocitos perdían rápidamente el fenotipo en las condiciones del cultivo tradicional. Para este modelo se utilizaron dos capas de gel de colágena aislado de cola de rata entre las cuales se sembraron hepatocitos aislados de hígado de rata, esto para poder mimetizar el entorno tridimensional de las células en el tejido e incrementar el tiempo de cultivo de los hepatocitos

manteniendo su fenotipo y funcionalidad. Dunn y Tompkins, en 1991 [72], observaron que los hepatocitos cultivados en sandwich mantuvieron la secreción de albúmina, fibrinógeno, ácidos biliares y urea por un período de 6 semanas, mientras que las células cultivadas sobre una sola capa de gel de colágena perdieron funcionalidad 1-2 semanas después del cultivo. También observaron que este sistema favorecía la organización de los filamentos de actina de manera cortical, similar a como se podría observar *in vivo*; en cambio, las células en una capa de colágena mostraron la formación de fibras de estrés que son anormales en la morfología de este tipo de células.

También se han desarrollado numerosas metodologías que consideran la organización espacial como una característica fundamental para crear un entorno más biomimético para las células. Estas técnicas pueden dividirse en dos tipos:

a) Técnicas que involucran andamios

Los andamios son biomateriales sintéticos, naturales o mezclas de ambos que han sido diseñados para que las células puedan interactuar y migrar a través de estructuras porosas con una cierta densidad y tamaño de poro, buscando mimetizar la matriz extracelular del tejido nativo [73].

b) Técnicas libres de andamios

Estos métodos son independientes del uso de andamios y están basados principalmente en la formación de esferoides [74]. Los esferoides son un modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia natural de muchos tipos celulares para formar aglomerados, creando masas multicelulares de forma esférica. En la práctica, este modelo puede ser utilizado en cualquier tipo de investigación biomédica, ya que si se dan las condiciones adecuadas, se pueden formar esferoides con cualquier tipo de célula.

La figura 10 presenta de manera esquematizada ambos tipos de técnicas para realizar cultivos tridimensionales.

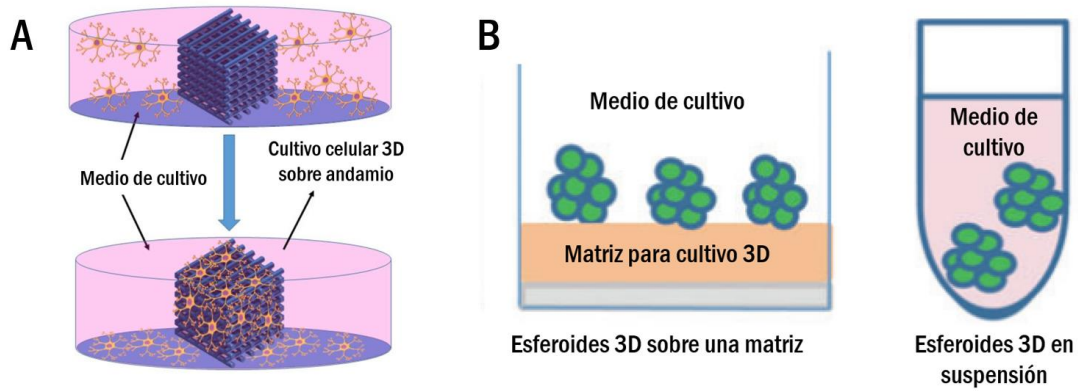


Figura 10. Técnicas de cultivo 3D. A: Estructuras porosas denominadas andamios que le dan soporte a las células para crecer y migrar en 3 dimensiones. B: Las técnicas libres de andamios están basadas en la formación de esferoides cultivados en suspensión o con una matriz como soporte.

1.3.3 Tecnología organ on a chip

Diversos grupos de investigación alrededor del mundo han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de sistemas de cultivo tridimensionales en diferentes configuraciones que involucren los factores mencionados en la sección 1.3.1 [75]. Uno de los institutos más reconocidos a nivel mundial y pionero en el desarrollo de sistemas de cultivo biomiméticos es el Instituto Wyss para Ingeniería de Inspiración Biológica dentro de la Universidad de Harvard, establecido en el 2009 en Boston, Massachusetts. Su actual director, Donald Ingber, fue el primero en fusionar la microelectrónica con la biología para el diseño de dispositivos que ofrecen una potencial alternativa a los cultivos tradicionales y a la experimentación en animales. Este tipo de dispositivos han recibido el nombre de órganos en un chip (*organs-on-a-chip*) y se les puede definir como sistemas biomiméticos microfabricados que están diseñados para modelar las funciones fisiológicas y estados patológicos de tejidos y órganos *in vitro*, estos sistemas contienen células y matriz extracelular en una cierta disposición que permita recapitular la microarquitectura y funcionalidad [76], logrando niveles de diferenciación y organización que no son posibles en sistemas bidimensionales convencionales.

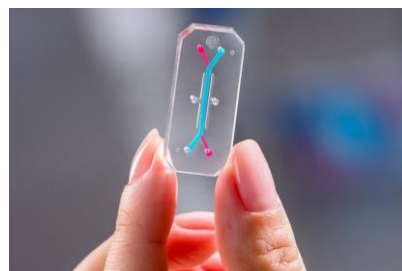


Figura 11. Dispositivo *organ-on-a-chip*

Son considerados una valiosa herramienta para múltiples aplicaciones que incluyen pruebas de efectos de fármacos sobre órganos humanos [77], ensayos de toxicidad, modelado de enfermedades como el cáncer para su estudio [78] e incluso se considera que podrían revolucionar el desarrollo de fármacos si son adoptados por la industria farmacéutica, consiguiendo un mejor entendimiento de las preguntas que hasta ahora no se han logrado resolver con modelos animales o cultivos de un sólo tejido u órgano. Más allá de lograr reducir el uso de animales de laboratorio, estos dispositivos podrían también mejorar la coordinación de ensayos en humanos, por ejemplo evaluando de manera preclínica candidatos a ensayos clínicos, de manera que sólo aquellos más aptos procedan a entrar a ensayos de Fase 1 reduciendo así las grandes inversiones de dinero y el tiempo necesario para el proceso de desarrollo y validación del fármaco que usualmente toma de 15 a 20 años para poder tenerlo disponible comercialmente para los pacientes que lo requieren. Por otra parte, en abril del año 2017, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) anunció que evaluará esta tecnología para identificar un modelo que mejore la manera en la que hasta la fecha se estudian los potenciales riesgos químicos y biológicos de sustancias encontradas en alimentos, cosméticos o suplementos alimenticios [79].

En la revisión hecha por Wei Sun y colaboradores en el año 2016 [81], se destaca el progreso en la investigación de dispositivos *organ-on-a-chip* para estudiar diferentes órganos (figura 12) entre los que se mencionan hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón e incluso se hace referencia a los avances en modelado de vasculatura y la integración de múltiples órganos en un mismo dispositivo que se conoce comúnmente como *human-on-a-chip* o *body-on-a-chip*.

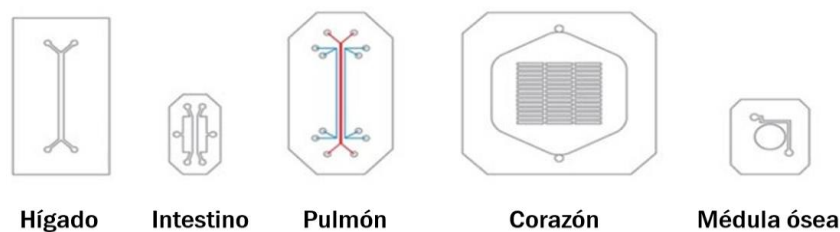


Figura 12. Algunos diseños de dispositivos *organ-on-a-chip* desarrollados en el Wyss Institute.

El desarrollo de los dispositivos *organ-on-a-chip* se basa en dos técnicas principales: la microfabricación que puede crear microestructuras que favorezcan la organización celular y controlar la topografía de la superficie, que modula la adhesión, proliferación, diferenciación y migración celular, y la microfluídica que permite administrar a las células nutrientes, factores biológicos y diversas moléculas en pequeñas cantidades a una determinada velocidad de flujo dentro de un microambiente controlado [82].

1.3.4 Ventajas y limitaciones de los modelos de cultivo celular

La siguiente tabla presenta un resumen de las ventajas y limitaciones de los modelos presentados:

Tabla 1. Cuadro comparativo entre los diferentes modelos de cultivo celular.

	CULTIVO 2D	CULTIVO 3D	ORGAN ON CHIP
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Metodologías bien caracterizadas y estandarizadas. • Accesible en cuanto al equipo requerido. • El relativo bajo costo facilita su uso para ensayos a gran escala. 	<ul style="list-style-type: none"> • La morfología, función celular y expresión de genes y proteínas en estos modelos se asemeja más al comportamiento observado <i>in vivo</i>. • Permite el uso de matrices que incorporan componentes de la MEC, mejorando la adhesión y comunicación celular. • En un biorreactor se puede establecer un microambiente dinámico (intercambio de gases y nutrientes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Incorporación de parámetros relevantes a nivel fisiológico como rigidez del sustrato, esfuerzos mecánicos, confinamiento, localización de sitios para adhesión, incorporación de proteínas de MEC. • Microestructuración del sustrato para poder mimetizar la organización de las células en el tejido. • Se pueden conectar varios chips para estudiar respuestas sistémica tiempo real. • Entorno dinámico.(microflujo y esfuerzos mecánicos dinámicos)
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones estáticas. • Sustratos con rigidez muy alta a comparación de la que perciben las células en los tejidos. • Bajo poder representativo de los procesos fisiológicos que se presentan <i>in vivo</i>. • Alto consumo de reactivos 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilidad biológica entre los diferentes lotes de MEC utilizada como soporte. • Costo mucho más alto que el cultivo 2D. • Algunos modelos carecen de vasculatura. • Alto consumo de reactivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • El desarrollo de estos modelos representa un alto costo. • Su diseño y fabricación es un proceso complejo. • La mayoría de estos modelos aún no pueden ser aplicados en estudios a gran escala. • El uso de volúmenes tan pequeños de reactivos y muestra puede limitar la capacidad de análisis de acuerdo al límite de detección de los instrumentos.

1.4 El hígado: fisiología, microarquitectura y cultivo de células hepáticas

Dado que el hígado es uno de los órganos más importantes en el metabolismo de xenobióticos, es de gran importancia el desarrollo de plataformas de cultivo en las que se pueda reproducir la fisiología hepática para poder estudiar el efecto de diversas moléculas ajenas al cuerpo humano y su posible

toxicidad. A continuación se describirá la funcionalidad e importancia de este órgano y en qué consiste la microarquitectura del hígado. Asimismo, se discutirán también algunos de los criterios moleculares y morfológicos que definen a una célula como hepatocito.

1.4.1 Fisiología hepática

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo humano y constituye aproximadamente del 2 al 5% del peso total de un adulto.

En el hígado se llevan a cabo un gran número de funciones de gran relevancia entre las que se encuentran el metabolismo de la glucosa, lípidos, vitaminas y carbohidratos, el almacenamiento y la síntesis de proteínas, la síntesis de bilis y la biotransformación de xenobióticos [83]. Estas funciones se ven reflejadas en la microarquitectura hepática ya que cada tipo celular desarrolla funciones específicas que dependen de su localización en el tejido, su interacción con los otros tipos celulares y con el flujo sanguíneo.

1.4.2 Microarquitectura hepática

Estructuralmente, el tejido hepático está constituido por la repetición de unidades funcionales que llevan el nombre de lobulillo hepático, el cual se constituye alrededor de una vena central o centrolobulillar y esquemáticamente se representa como un prisma hexagonal que tiene una tríada portal en cada uno de sus ángulos (figura 13). La tríada portal consiste en un conducto biliar, una rama de la arteria hepática y una rama de la vena porta, la sangre de estas ramas fluye de la periferia del lobulillo hacia los sinusoides que corren entre las filas de hepatocitos hacia la vena central. Los hepatocitos están arreglados entre los sinusoides en láminas de dos células de grosor, por lo que cada borde lateral está en contacto con una gran cantidad de sangre sinusoidal.

Las venas centrales de todos los lobulillos convergen en la vena hepática, que se lleva la sangre con los metabolitos que ya han sido procesados en el hígado. El delgado canal que porta la bilis que es secretada continuamente por los hepatocitos se llama canalículo biliar y corre entre las células dentro de la placa hepática, llevando la bilis hasta el conducto biliar que se encuentra en la triada portal.

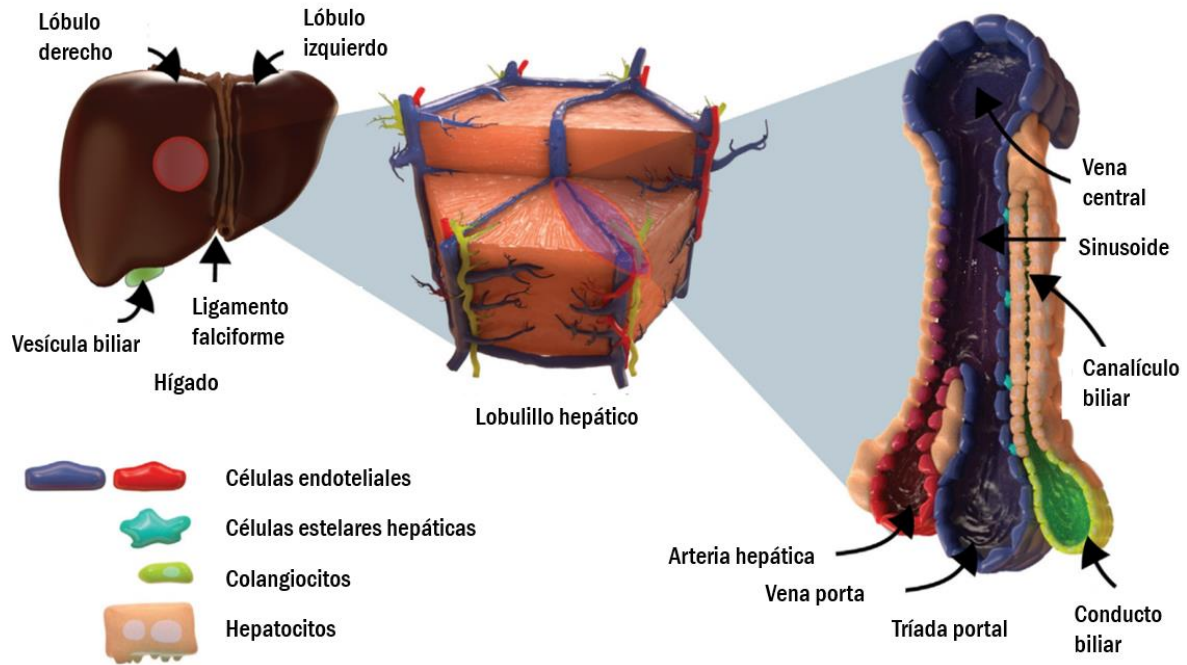


Figura 13. Esquema de la arquitectura hepática desde lo macro hasta lo micro. Modificado de [84].

Los hepatocitos son las células parenquimales del hígado y son responsables de llevar a cabo la mayoría de las funciones del hígado. En la microarquitectura hepática, estas células están orientadas en cordones separados por capilares conocidos como sinusoides, los cuales tienen aproximadamente 10 micras de ancho y reciben sangre de los intestinos, páncreas, bazo y vesícula biliar [85]. Los hepatocitos secretan bilis a través de la membrana apical hacia el canalículo biliar localizado entre ellos y están limitados por uniones estrechas [86].

En el hígado hay tres tipos principales de células no parenquimales que son las células endoteliales de los sinusoides, las células de Kupffer y las células estelares hepáticas (figura 14) [87]. Las células endoteliales limitan a los sinusoides y previenen el contacto directo entre la sangre y los hepatocitos; a diferencia de otros capilares, estos tienen una membrana basal discontinua y presentan grandes espacios entre ella (espacios de entre 100-150 nm) [88]. Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado y se localizan usualmente en el sinusoides. Durante un daño hepático las células de Kupffer se encargan de secretar citocinas anti y pro-inflamatorias y reclutan neutrófilos hacia el hígado [89]. Las células estelares hepáticas se localizan en el espacio de Disse y almacenan lípidos y vitamina A, además, cuando el hígado recibe alguna agresión estas células se activan y se transforman hacia un fenotipo miofibroblástico, secretando componentes de matriz extracelular de manera excesiva [90].

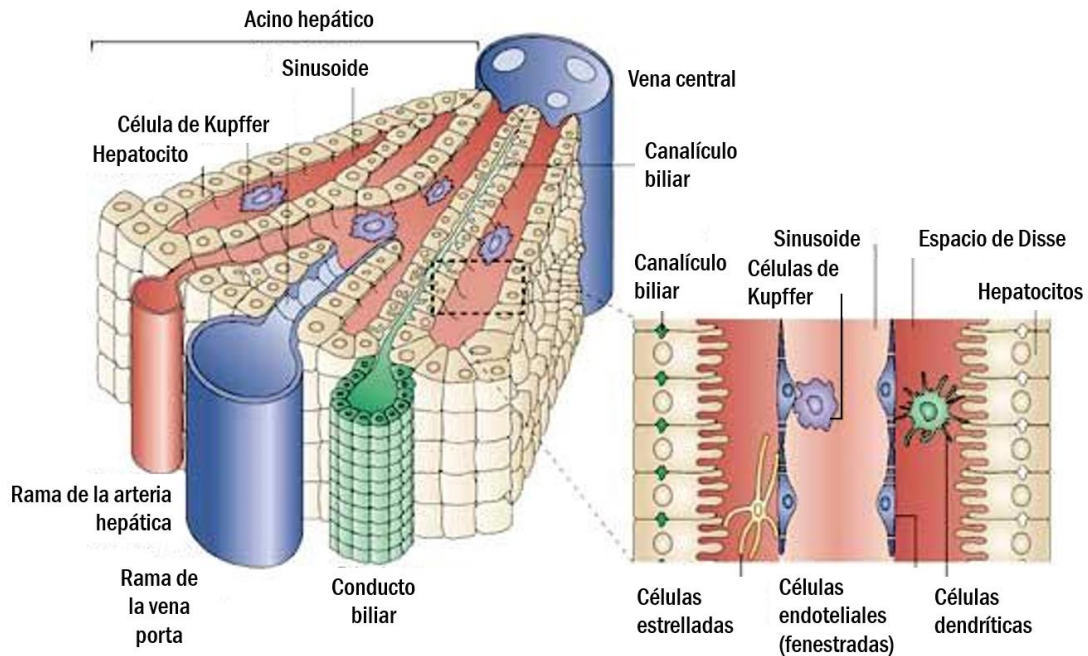


Figura 14. Localización de los diferentes tipos celulares hepáticos [96].

El espacio de Disse se encuentra entre los hepatocitos y las células endoteliales del sinusoide y actúa como una barrera física entre los hepatocitos y las células no parenquimales promoviendo la transferencia de nutrientes y oxígeno entre el sinusoide y los hepatocitos [91].

La MEC que forma el andamiaje en un hígado sano, se restringe a las zonas del tracto portal, las paredes del sinusoide y la periferia de las venas centrales [92], comprende alrededor del 3% del área relativa en una sección del hígado normal. Dado que la MEC es parte de la frontera entre el flujo sanguíneo y el parénquima hepático, una variación en cantidad o composición de la misma tiene consecuencias inmediatas en el funcionamiento del órgano.

Las proteínas más encontradas en el hígado son las colágenas, siendo las más abundantes la I, III, IV y V; cada una difiere en su localización y función. Mientras que los tipos I, III y V son los constituyentes mayoritarios de las colágenas fibrilares y están confinadas a las regiones del tracto portal y la vena central, la colágena tipo IV asociada a laminina, entactina y nidogeno participa en la formación de una membrana basal de baja densidad a lo largo de las paredes del sinusoide [93]

La baja densidad de la membrana basal es crítica para permitir la difusión de diversas moléculas del flujo sanguíneo a las células parenquimales o hepatocitos y para mantener el estado diferenciado de las células hepáticas [94].

Otros componentes mayoritarios de la MEC son glicoproteínas como laminina, fibronectina, tenascina y nidogeno; proteoglicanos como heparan sulfato, dermatan sulfato y condroitin sulfato, perlecan, ácido

hialurónico y decorina [95]. El microambiente celular impone condiciones específicas que tienen influencia no solo en la microarquitectura o en la mecánica celular sino en la polaridad de las células y su funcionamiento.

Los hepatocitos al ser células epiteliales tienen la característica de ser células polarizadas, esto implica una regionalización de la membrana celular con funciones específicas, es decir cada parte de la membrana tiene una orientación y cumple una función determinada [97].

La mayoría de las células epiteliales poseen una polaridad que puede ser denominada “simple”. La membrana plasmática en estas células tiene un dominio apical orientado hacia el lumen del órgano al que pertenecen, como por ejemplo el intestino; también tienen un dominio basolateral que comprende el resto de la membrana. Los hepatocitos en cambio, tienen varios dominios apicales y basolaterales: los polos apicales de los hepatocitos adyacentes forman una red continua de canalículos biliares a donde es secretada la bilis que estas células producen, mientras que los dominios basolaterales están en contacto con el espacio de Disse, el cual permite el intercambio de moléculas provenientes de sangre de los sinusoides [98]. El funcionamiento apropiado del hígado depende de mantener este fenotipo altamente polarizado.

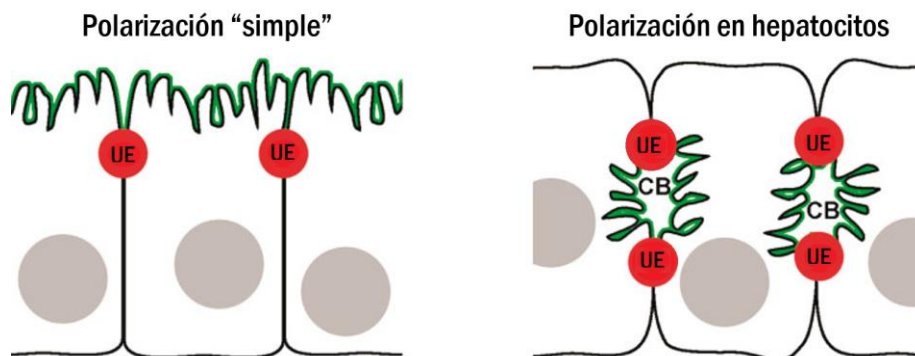


Figura 15. Esquema comparativo entre la polarización simple y la polarización que se presenta en los hepatocitos. UE: uniones estrechas, CB: canalículo biliar. Modificado de [98].

1.4.3 Marcadores de fenotipo y funcionalidad de hepatocitos

Como se mencionó al inicio de esta sección, uno de los principales retos que implica el fabricar una plataforma de cultivo para hepatocitos es justamente mantenerlos en un estado diferenciado y de la manera más parecida posible a como si estuvieran *in vivo*. Por lo tanto, es necesario caracterizar cómo afectan los parámetros de fabricación de una plataforma al fenotipo de las células.

Existen varios criterios que es necesario tomar en cuenta para caracterizar a una célula como hepatocito. Principalmente se estudian marcadores de polarización (una de las características de un hepatocito) y de funcionalidad, cuya expresión se analiza para saber si en un cultivo las células mantienen el fenotipo. Dado que la polarización en células epiteliales requiere adhesión célula-célula y una organización específica de proteínas en la superficie de las células, se considera a las proteínas de superficie E-cadherina y ZO-1 como marcadores de interés ya que son requeridas para la formación de uniones estrechas, necesarias para dar paso a la estructuración de los canalículos biliares, parte importante de la microarquitectura hepática [97]. Otra característica morfológica importante de un hepatocito con fenotipo adulto es la configuración de la actina de manera cortical; al presentarse la transición hacia un fenotipo mesenquimal, se identifica una reorganización de la actina formando fibras de estrés [99]. De igual manera, las citoqueratinas 8 y 18 (CK8/CK18) son estudiadas como marcadores específicos de hepatocitos adultos, estas proteínas se encuentran formando parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto y los conductos biliares [100].

El factor de transcripción HNF4 α es también un marcador específico de fenotipo hepático, su expresión ha sido relacionada con la regulación de múltiples vías metabólicas en el hígado y con la diferenciación de hepatocitos hacia fenotipo adulto [101]. Se ha reportado que se requiere de la expresión de HNF4 α para mantener una microarquitectura hepática apropiada así como la expresión de marcadores de fenotipo epitelial y que la disrupción de HNF4 α tiene como consecuencia que se inicie la transición epitelio-mesenquima que será descrita más adelante [102].

Tabla 2. Marcadores de fenotipo hepático.

Marcador	Función	Referencia
ZO-1	Proteína encontrada en uniones estrechas	[103]
E-Cadherina	Forma parte del complejo cadherina-catenina-actina, esencial para la unión célula-célula.	[104]
MRP2	Proteína presente en el polo apical del hepatocito, transportadora de ácidos biliares.	[105]
DPP4	Enzima característica del canalículo biliar	[106]
HNF4 α	Factor transcripcional esencial para la diferenciación morfológica y funcional de hepatocitos.	[107]
Albúmina	Mantiene la osmolaridad en la sangre, molécula transportadora de un gran número de metabolitos, ayuda a mantener la integridad del endotelio, limita la producción de especies reactivas de oxígeno (efecto antioxidante). Marcador de fenotipo adulto.	[108]
α -Fetoproteína	Glicoproteína producida durante la etapa fetal en la formación del hígado. Elevada durante procesos de	[109]

	regeneración y/o daño hepático como cirrosis o cáncer hepatocelular. Marcador de fenotipo fetal.	
CYP1A1	Enzimas relevantes para el metabolismo de xenobióticos (detoxificación)	[110]
CPS (Carbamoyl Phosphate Synthase)	Enzima específica del hígado involucrada en el ciclo de la urea	[111]
CK8/CK18	Proteínas componentes del citoesqueleto en hepatocitos	[100]

Aunque se han identificado moléculas que son características de un fenotipo hepático, no hay una definición exacta que permita decir que una célula es auténticamente un hepatocito. Sin embargo, se han desarrollado herramientas como CellNet [112,113] la cual es una plataforma computacional que permite realizar un estudio comparativo entre datos experimentales y bases de datos para determinar de manera más precisa el fenotipo de la célula que se analiza.

1.4.4 Transición Epitelio - Mesénquima (TEM)

Las células epiteliales y mesenquimales son dos tipos principales de células que están presentes en órganos y tejidos. Como se muestra en la figura 16, las células epiteliales tienen la característica de estar polarizadas y de mantenerse adheridas a una membrana basal; además presentan uniones intercelulares como uniones adherentes, uniones estrechas y desmosomas y al estar ancladas a la membrana basal carecen de movilidad con lo cual se mantiene la integridad estructural en el tejido [114]. En cambio, las células mesenquimales no se encuentran polarizadas y no tienen una organización rigurosa dentro de la matriz extracelular, lo que les da libertad de moverse individualmente a través de ella. Estas células tienen la capacidad de remodelar la MEC sintetizando nuevos componentes y reorganizándolos mediante la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs), que son enzimas que promueven la degradación de proteínas de la MEC. Además, las células mesenquimales son fuente de moléculas de señalización (factores de crecimiento) que actúan sobre las células epiteliales como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF β), siendo este último uno de los principales factores moleculares que desencadenan la TEM [115]

En resumen, la TEM involucra tres cambios importantes en el fenotipo:

- a) pérdida de polaridad apico-basal.
- b) disrupción de las uniones célula-célula y modificación en la expresión de proteínas del citoesqueleto.
- c) adquisición de propiedades de migración e invasión, las cuales son consideradas un sello característico de esta transición

Cuando las condiciones de cultivo celular no favorecen la recreación de la microarquitectura *in vivo* y carecen de la señalización físico-bioquímica propia de la matriz extracelular, las células perciben el cambio abrupto en el microambiente ya que la geometría, propiedades mecánicas como la rigidez y señales bioquímicas del sustrato cambian de manera radical. Cuando las células hepáticas son cultivadas en este tipo de condiciones, se inicia el proceso de TEM ocasionando que sufran un cambio en su morfología (figura 17) perdiendo su forma cuboidal y adoptando una forma aplanada y elongada, propia de un fenotipo mesenquimal [116].

A su vez, se presenta de manera progresiva un cambio dramático en la composición de los filamentos intermedios del citoesqueleto, ocasionando la pérdida de marcadores de fenotipo como E-Cadherina, ZO-1, Laminina-1 y Citoqueratina-18, además de la expresión de marcadores característicos de fenotipo mesenquimal como α -SMA y Vimentina [117], aunque de hecho en los periodos intermedios de la transición se encuentran mezclas de marcadores epiteliales y mesenquimales.

Los cambios fenotípicos relacionados con la TEM representan un importante reto en el diseño y desarrollo de nuevas plataformas para cultivo celular. Para que los ensayos *in vitro* que se llevan a cabo en investigación básica y aplicada puedan proporcionar resultados con mayor relevancia, los procesos que realice la célula en el cultivo deben ser lo más cercano posible a los procesos que lleva a cabo en el tejido. A continuación se presentan algunos de los puntos importantes a considerar para mejorar, de manera particular, el cultivo de hepatocitos.

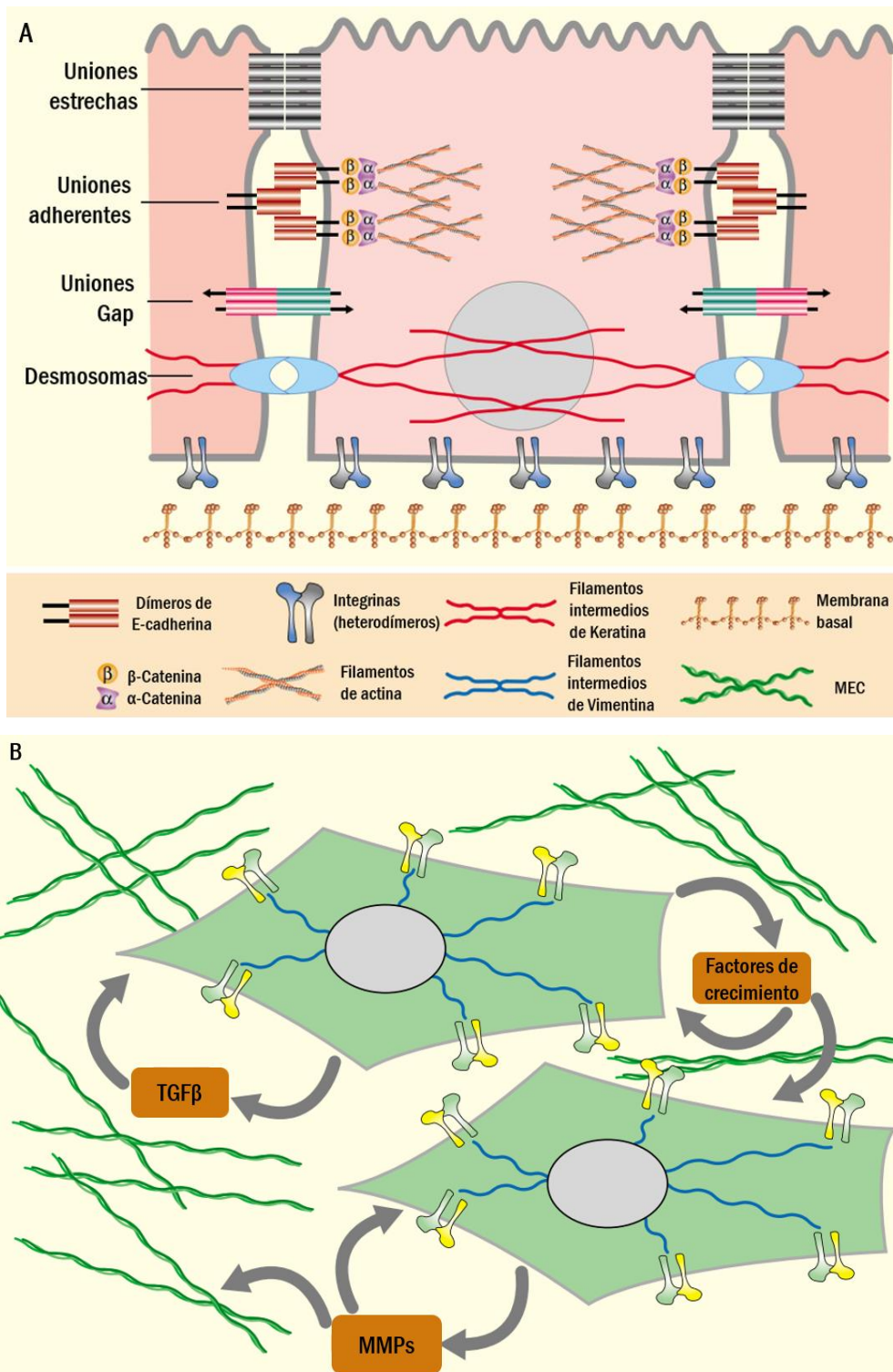


Figura 16. Cambios en las células durante la TEM. A: Células epiteliales con una polaridad definida, presencia de uniones célula-célula que mantienen la integridad estructural del tejido e interacciones integrina - MEC que las mantiene unidas a la membrana basal. B: Células mesenquimales sin polaridad, ausencia de uniones célula - célula, diferentes integrinas involucradas en la unión célula - MEC, producción de metaloproteinasas que remodelan la MEC, son fuente de proteínas de señalización como TGFβ que actúan sobre las células epiteliales.

Adaptado de [115].

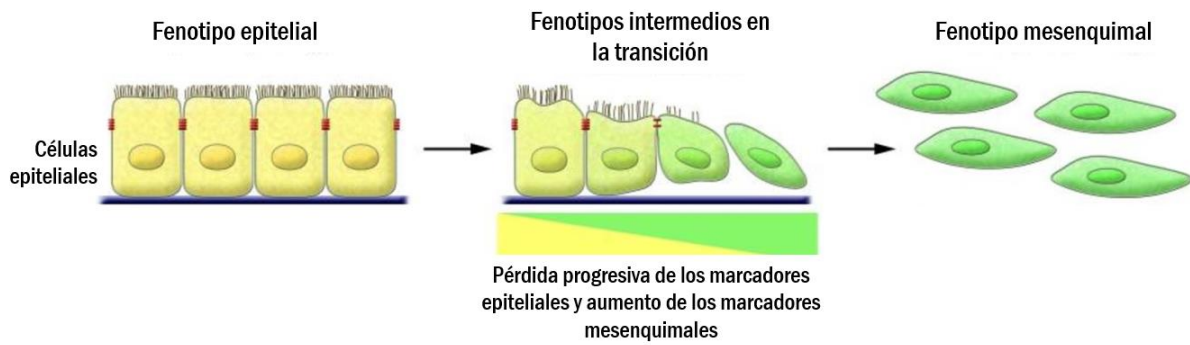


Figura 17. Cambios morfológicos de las células durante la TEM. Adaptado de [116]

1.4.5 Avances y retos relacionados con el cultivo de hepatocitos

La TEM, discutida en la sección anterior, se presenta en los cultivos primarios de hepatocitos en un tiempo de aproximadamente 48 horas [118]. Esto implica una importante limitación para el uso del cultivo de hepatocitos primarios como modelo en investigación, a pesar de ser considerados el estándar de oro en pruebas de toxicidad y metabolismo de fármacos [119].

Hablando en particular de los modelos para hígado, los principales avances y retos están relacionados con:

- Generar una apropiada interacción célula-célula y célula-matriz extracelular para contribuir a estabilizar el fenotipo de hepatocitos primarios y así evitar o al menos retrasar la transición epitelio-mesénquima [120].
- Modular la rigidez de los biomateriales utilizados en la fabricación de los chips para inducir la diferenciación de células hacia un fenotipo de hepatocito adulto [121].
- Replicar la zonación existente en el hígado mediante la formación de gradientes para representar la heterogeneidad existente entre los hepatocitos dependiendo de su ubicación en el lobulillo lo cual repercute en sus funciones metabólicas [122].
- Mimetizar microestructuras como los conductos biliares [123], lobulillo hepático [124] y sinusoide hepático [125].
- Incluir en el sistema la interacción de las células parenquimales del hígado (hepatocitos) con las células no parenquimales (células de Kupffer, células estelares y células del sinusoide hepático) bajo esfuerzos mecánicos originados por el flujo constante [126].

Las tecnologías presentadas en este capítulo y empleadas en esta investigación, representan un esfuerzo interdisciplinario entre la ciencia de materiales, la biología y la microtecnología para lograr realizar un aporte significativo al diseño y fabricación de plataformas de cultivo más biomiméticas que las

disponibles actualmente, esto con la finalidad de retrasar o en el mejor de los casos evitar los procesos de transdiferenciación (como es la transición epitelio - mesénquima) y tener células con una morfología y función más cercanos a los que presentan *in vivo*.

Tomando este contexto se presentan a continuación la hipótesis y los objetivos.

HIPÓTESIS

Si es posible controlar las condiciones mecánicas de rigidez y geometría similares a las reportadas en el tejido hepático, entonces el hepatocito adquirirá una morfología y función similares a los observados in vivo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Controlar las condiciones mecánicas de rigidez de una plataforma de cultivo celular, así como la geometría y confinamiento de las células en micropatrones de colágena I sobre dicha plataforma, para mejorar el fenotipo de los hepatocitos.

Objetivos particulares

- Producir sustratos de PDMS Sylgard 184 y 527 sobre cubreobjetos de vidrio.
- Funcionalizar las superficies mediante una reacción de silanización con APTES, seguido de un tratamiento con glutaraldehído.
- Fabricar estampas de PDMS mediante la técnica de réplica-molde, utilizando moldes microfabricados mediante fotolitografía y ablación láser.
- Generar micropatrones de colágena tipo I sobre los sustratos de PDMS químicamente modificados, utilizando la técnica de impresión por microcontacto.
- Cultivar hepatocitos primarios de rata y hepatocitos humanos de la línea celular HepG2 sobre los micropatrones de colágena I y evaluar la sobrevivencia con un ensayo de calceína AM/PI y su funcionamiento a través de algunos marcadores de fenotipo (albúmina, localización de actina, HNF4-a, AFP, vimentina, citoqueratina 18).
- Controlar el pegado de los hepatocitos por impresión por microcontacto.

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

Con el fin de fabricar una plataforma de cultivo donde se controle la rigidez y la localización superficial de proteína con un patrón geométrico específico se estableció la metodología descrita en este capítulo, primero se describe cómo se obtuvieron sustratos de PDMS con dos rigideces (suave 12-13 kPa y rígido 1-2 MPa), después cómo se modificó químicamente su superficie y también cómo se caracterizaron fisicoquímicamente. Enseguida se da una descripción de cómo se implementó la técnica de impresión por microcontacto (uCP) descrita en el capítulo anterior para crear patrones geométricos de proteína (Colágena tipo I) sobre la superficie de los sustratos de PDMS químicamente modificados. Finalmente, se menciona la metodología seguida para el aislamiento de hepatocitos de rata, del cultivo la línea celular HepG2 y de los protocolos usados para realizar la caracterización biológica por medio de ensayo de viabilidad con Calceína/Yoduro de propidio, evaluación de algunos marcadores de fenotipo y funcionalidad (HNF4- α , albúmina, alfa fetoproteína y vimentina) mediante Western Blot e inmunofluorescencia (HNF4- α y albúmina), así como el marcaje del citoesqueleto de actina como validación de las condiciones de fabricación de la plataforma (rigidez y confinamiento).

2.1 Preparación de los sustratos de PDMS

Como se ha mencionado anteriormente se eligió el PDMS como material para la fabricación de los sustratos deseados, para su polimerización y fácil manejo se utilizó como soporte cubreobjetos de vidrio redondos de 18 mm de diámetro los cuales se limpiaron previamente en baño de ultrasonido. Los kits de PDMS Sylgard 184 y 527 fueron adquiridos de Dow Corning (N. lote. 0008032894 y 00082621711 respectivamente). Los precursores del PDMS fueron combinados en proporción en masa 10:1 para el PDMS 184 y 1:1 para el PDMS 527. En ambos casos, el prepolímero y el curante fueron mezclados durante 5 minutos utilizando un Dremel a aproximadamente 1,000 rpm con el fin de lograr homogeneidad en la mezcla y posteriormente desgasificados mediante vacío durante 20 minutos.

El método para recubrir los cubreobjetos con PDMS fue diferente para cada kit, considerando que cada material presenta rigideces diferentes.

- PDMS 184 (rígido)

Se recubrieron portaobjetos de vidrio con papel aluminio y sobre éstos se colocaron 3 cubreobjetos separados una distancia aproximada de 1 cm. El PDMS 184 se colocó en una jeringa y se distribuyó en una línea en la parte central del cubreobjetos. Se colocó una segunda línea en los bordes exteriores del cubreobjetos. Se dejó extender la capa de PDMS durante 10 minutos y se metieron al horno de convección a 60°C durante 2 días.

- PDMS 527 (suave)

Se cortaron rectángulos de 25 cm x 15 cm de tapete de silicón para hornear y se colocaron sobre papel aluminio doblado en los bordes para contener el PDMS y evitar que se derramara. Se distribuyeron 20 cubreobjetos en la superficie del rectángulo y se virtió de manera homogénea el PDMS. Se curó de igual manera a 60 °C durante 2 días.

Ambos tipos de sustratos se cortaron con un bisturí y se levantaron con pinzas. En el caso de los sustratos de PDMS 184, es necesario despegar el PDMS que queda en la parte inferior del cubreobjetos con unas pinzas

2.2 Modificación química de superficie

Debido a que el PDMS tiene una naturaleza hidrofóbica que no es apta para el cultivo de células, se probaron diferentes métodos de modificación química de superficie utilizando el organosilano 3-(aminopropil)triétoxosilano (APTES) (Sigma Aldrich, No catalogo 440140).

Antes de exponer los sustratos a las diferentes soluciones del organosilano que se muestran en la tabla siguiente, se trataron durante 15 minutos en el equipo UV/Ozone ProCleaner (BioForce Nanosciences) para favorecer la oxidación de los grupos metilo (-CH₃) de la superficie del PDMS a grupos hidroxilo (-OH) de manera que pueda haber una reacción entre la superficie del PDMS y el APTES.

Tabla 3. Descripción de los diferentes métodos de funcionalización con APTES

Método	Referencia	Descripción del método
1	[127]	Solución: APTES al 0.09% en metanol. Inmersión durante 2 horas a temperatura ambiente. Lavado con metanol. Secar. Tratamiento térmico a 110 °C durante 30 minutos.
2	[128]	Solución: APTES al 5% en agua desionizada, activación por calentamiento a 85 °C. Inmersión durante 1 minuto sin calentar. Lavado con agua desionizada. Secar.
3	[129]	Solución: APTES sin diluir (99%). Inmersión por 5 minutos a temperatura ambiente. Lavado con agua desionizada. Secar.

Posterior a la silanización, se realizó un tratamiento con glutaraldehído (GA) (Sigma Aldrich, No catalogo G7651) al 2.5%. El glutaraldehído funciona como una molécula de unión entre el grupo amino del APTES y la colágena. Los sustratos se sumergieron durante 1 hora en la solución acuosa de GA y se lavaron tres veces con agua destilada. Se secaron con aire comprimido y se almacenaron protegidos del polvo hasta su uso en impresión por microcontacto y/o cultivo celular.

2.3 Caracterización fisicoquímica de los sustratos

2.3.1 Medición de ángulo de contacto

La medición del ángulo de contacto sobre las diferentes superficies se realizó en un equipo *Drop Shape Analyzer DSA100* (KRUSS) colocando los sustratos sobre la plataforma del equipo y dejando caer una gota de agua dispensada a través de la aguja de una jeringa. La medición fue realizada inmediatamente después de que la gota de agua hizo contacto con la superficie y 30 segundos después. Las mediciones se repitieron dos veces en diferentes puntos de la superficie. Como control se utilizaron sustratos de PDMS sin tratamiento.

La técnica permite estimar cambios en la hidrofobicidad o hidrofiliidad de los sustratos, ya que siendo menor el ángulo de contacto, la gota estará más esparcida en la superficie, indicando una mayor interacción con el sustrato (el sustrato será más hidrofílico)

2.3.2 Análisis de topografía por Microscopía de Fuerza Atómica

Para realizar esta caracterización se utilizó el equipo Nanosurf NaioAFM en modo de contacto, midiendo una superficie de de 50 μm x 50 μm . Se empleó una punta Budget Sensors ContAl-G con una constante de fuerza de 0.2 N/m.

Cabe resaltar que por cuestiones técnicas sólo fue posible hacer el estudio de las muestras de PDMS 184 ya que la punta se adhería en el PDMS 527 y podía resultar dañada. El tratamiento de datos se realizó mediante el software libre Gwyddion.

2.3.3 Caracterización superficial por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Para el análisis de espectroscopía de fotoelectrones por rayos X, XPS (por sus siglas en inglés, X-Ray Photoelectron Spectroscopy). Se utilizó un sistema de ultra alto vacío (UHV) de Physical Electronics, Scanning XPS microprobe PHI 5000 VersaProbe II, con un detector analizador de 16 chaneltrones. Se utilizó una fuente de rayos X monocromática de Al K_{α} ($h\nu = 1486.6\text{eV}$) a 25 W de 200 μm de diámetro. El espectro XPS se obtuvo a 45° respecto de la normal a la superficie con un paso de energía constante (CAE) $E_0 = 117.40\text{ eV}$ para espectro de barrido completo y $E_0 = 11.75\text{ eV}$ para espectros de alta resolución.

La presión se mantuvo, durante la medición, en $7 \times 10^{-8}\text{ Pa}$. La posición en energía se calibró con el orbital de Ag $3d_{5/2}$ en la posición de 368.20 eV con una resolución (FWHM) de 0.56 eV, Au $4f_{7/2}$ en 84.00 eV y C 1s en 285.00 eV.

2.4 Microfabricación de moldes para impresión por microcontacto

Se utilizaron dos moldes maestros para la fabricación de los sellos, cada uno con diferente topografía (rugosidad) debido a que provienen de distintos métodos de microfabricación.

2.4.1 Microfabricación por fotolitografía

El primer molde se obtuvo mediante la técnica de fotolitografía utilizando una oblea de silicio de 50 μm de espesor, recubierta con la resina fotosensible SU-8 que al ser expuesta a radiación UV a través de una máscara, es polimerizada para formar estructuras tridimensionales (estos moldes fueron fabricados por Kayum Jiménez, estudiante de doctorado en el LAAS-CNRS, en Toulouse, Francia).

En la oblea de silicio se tienen 4 diseños diferentes que se muestran en la figura 18, los cuales fueron hechos en el software CleWin5.

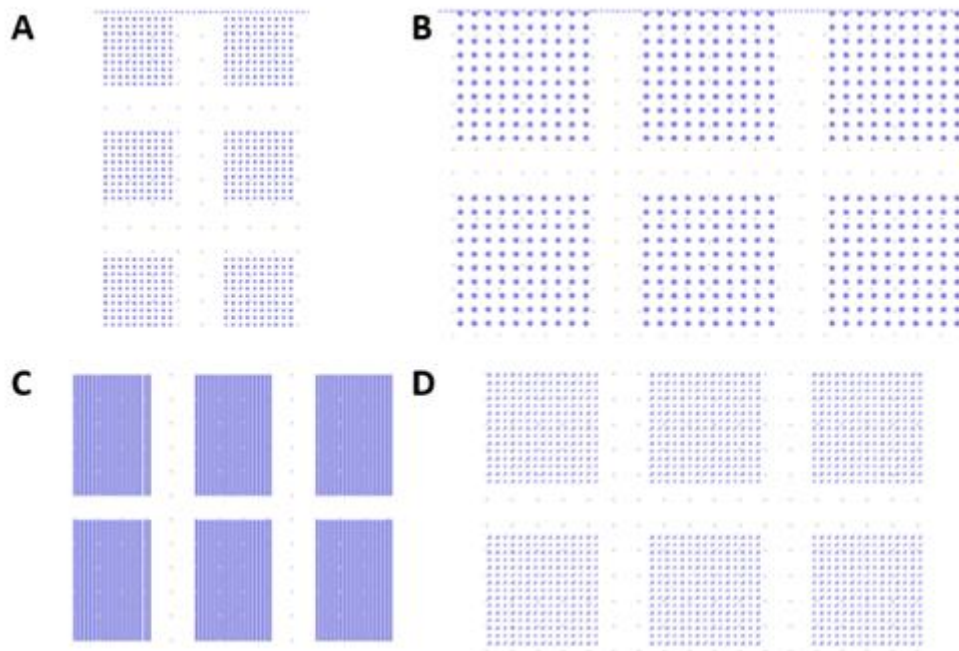


Figura 18. Distribución de los diferentes diseños sobre la oblea de Si/SU8. A: Diseño D-100, círculos de 100 um de diámetro, espaciamiento vertical y horizontal 300 um. B: Diseño D-200, círculos de 200 um de diámetro, espaciamiento vertical y horizontal 600 um. C: Diseño L-40, bandas de 40 um de ancho con espaciamiento de 80 um. D: Diseño T-100, Triángulos rectángulos con catetos de 100 um, espaciamiento vertical y horizontal 300 um.

2.4.2 Microfabricación por ablación láser

El segundo molde se obtuvo sobre un portaobjetos de polimetilmetacrilato (PMMA), el cual fue grabado mediante la técnica de microfabricación láser (previamente desarrollada dentro del Laboratorio de Micro y Nanotecnología, Facultad de Ciencias, UNAM) que está basada en el uso de la OPU (Optical Pick-up Unit) de un sistema comercial de reproducción y grabación de CD/DVD; la cual se encuentra sobre una plataforma que controla el movimiento en XYZ y por lo tanto la posición del punto focal del haz láser. Cabe resaltar que es una técnica mucho más barata de microfabricación en comparación con la fotolitografía.

Para los moldes fabricados en PMMA, sólo se grabaron los diseños que corresponden a los paneles B y C de la figura 18. La caracterización de los moldes se realizó mediante análisis por perfilometría con un equipo KLA Tencor D600 para verificar la integridad estructural y geometría de las microestructuras antes de replicarlas en PDMS.

2.5 Obtención de estampas elastoméricas por réplica-molde

Para la obtención de las estampas se utilizó el proceso molde-réplica previamente descrito (capítulo 1.2.1.2), antes de obtener las réplicas de las microestructuras fabricadas por fotolitografía, se requirió

silanizar la oblea recubierta con la resina SU8. Este procedimiento es necesario porque previene que el PDMS se quede adherido a la oblea y se destruya el molde al momento de despegarlo. La silanización se llevó a cabo mediante deposición química de vapor del organosilano, la oblea se colocó en un recipiente hermético junto con un vaso de precipitados pequeño con 1 mL del reactivo diclorodimetilsilano (Sigma-Aldrich, No catálogo 440272-100 mL) durante 2 horas.

Es importante trabajar este reactivo siempre en una campana de extracción y tomando todas las precauciones de seguridad ya que es altamente corrosivo y dañino a la salud.

Las estampas fueron fabricadas utilizando PDMS Sylgard 184 en proporción 10:1 del elastómero y el agente curante respectivamente, el procedimiento de preparación fue el mismo que se indicó en la sección 3.1. Una vez desgasificado, el PDMS fue vertido sobre el molde que se coloca en papel aluminio para evitar que el PDMS se desbordara.

El PDMS se curó en el horno a 60 °C durante 48 horas. Una vez curado, la estampa se desprendió del molde y se cortó con un bisturí para eliminar el excedente del polímero.

2.6 Impresión por microcontacto

Para realizar esta técnica de litografía suave descrita en el capítulo 1.2.1.2 (figura 4), las estampas de PDMS se limpiaron sonicándolas sumergidas en etanol durante 15 minutos en un baño ultrasónico y se secaron con aire comprimido.

Con una micropipeta se colocaron 60 uL de colágena tipo I proveniente de cola de rata (BD Biosciences) sobre el relieve de la estampa y se extendió la gota con la punta de la micropipeta. Se utilizaron dos concentraciones de colágena dependiendo de las células que serían cultivadas sobre cada sustrato: 0.1 mg/mL para línea celular y 1 mg/mL para células primarias, la dilución del stock de colágena se realizó utilizando ácido acético 20 mM. La proteína se incubó durante 15 minutos, después del tiempo de incubación se aspiró con la micropipeta y finalmente se secó cuidadosamente con aire comprimido.

El procedimiento de impresión por microcontacto se realizó sobre 3 tipos de sustratos funcionalizados: vidrio, PDMS 184 y PDMS 527 (el vidrio fue utilizado como un control de rigidez del orden de GPa).

La estampa se colocó sobre el sustrato correspondiente y con unas pinzas se hizo presión sobre la zona del relieve para garantizar un contacto homogéneo. Se colocó una pesa de 20 g sobre el sello, teniendo un tiempo total de contacto de 5 minutos. Posteriormente la estampa se retiró con las pinzas empezando de uno de los extremos y se revisó el sello en el microscopio (Nikon, Eclipse Ci-L) en modalidad campo oscuro.

Los sustratos en los que se obtuvieron sellos de buena calidad fueron lavados con PBS y esterilizados con luz ultravioleta durante 30 minutos para sembrar sobre ellos las células (HepG2 o hepatocitos primarios de rata).

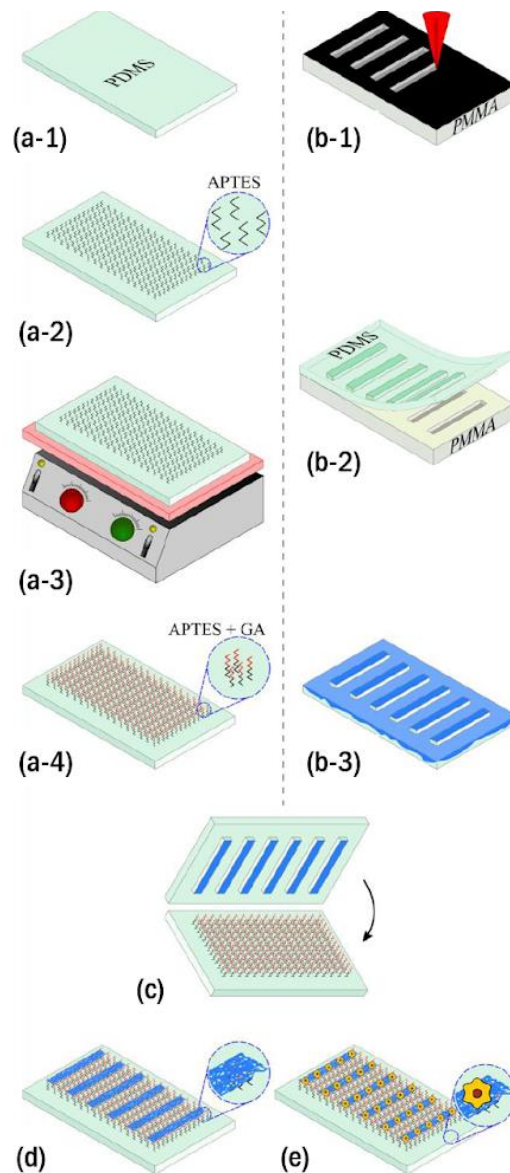


Figura 19. Proceso de fabricación de plataformas con micropatrones de colágena tipo I generados por impresión por microcontacto.

A manera de resumen, la figura 19 muestra el proceso de obtención de los sustratos con micropatrones de colágena tipo I para sembrar hepatocitos. Se utilizaron sustratos de PDMS suave y rígido (figura 19 a-1), se sometieron a una modificación química de superficie por silanización con APTES (figura 19 a-2), en una parrilla de calentamiento, se dio tratamiento térmico a los sustratos a 110 °C (figura 19 a-3), finalmente los sustratos se trataron con GA para favorecer el entrecruzamiento con la proteína (figura 19 a-4).

Por otro lado, los moldes se fabricaron utilizando portaobjetos de acrílico recubiertos con nanocarbono en polvo, grabando las estructuras deseadas con la máquina de ablación láser (figura 19 b-1); mediante la técnica de réplica molde (ver figura 3), se obtuvieron las estampas de PDMS rígido (figura 19 b-2), estas estampas se incubaron con la solución de colágena tipo I (figura 19 b-3). La estampa con la proteína se puso en contacto con la superficie de los sustratos como se describió en la sección 2.6 (figura

19 c) y se obtuvieron los micropatrones de colágena sobre los sustratos (figura 19 d). Estos fueron esterilizados mediante radiación UV para realizar el cultivo de hepatocitos (figura 19 e) como se indica en la siguiente sección.

2.7 Aislamiento de hepatocitos y cultivo celular

Para este trabajo, se utilizaron hepatocitos primarios de rata y células de la línea HepG2 (hepatocarcinoma humano).

La línea HepG2 fue mantenida en medio MEM (Minimal Essential Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de piruvato de sodio y 1% de penicilina/estreptomicina.

Los hepatocitos primarios fueron aislados de hígados de ratas de la cepa Wistar, machos de aproximadamente 200 a 250 g de peso proporcionados por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Los animales fueron mantenidos con una dieta *ad libitum* y manipulados de acuerdo a los lineamientos institucionales internos y acuerdos de ética del IFC para experimentación en animales.

Las ratas fueron anestesiadas con cloroformo, se realizó una laparotomía y se conectó una cánula en la vena porta para perfundir el hígado con solución amortiguadora Krebs-Ringer-NaHCO₃ (KRB) sin calcio (CaCl₂). Esta solución se hizo pasar durante 5 minutos para lavar la sangre del hígado y posteriormente se cambió a una solución de la enzima colagenasa tipo IV (Worthington) en KRB con calcio para digerir la matriz extracelular del hígado recirculándola durante 20 minutos.

Una vez digerido, el hígado se colocó en una caja Petri y se agregaron 10 mL de KRB con calcio, el hígado se disgregó con la punta de una pipeta y posteriormente las células se filtraron con una tela de tul para verterlas en un tubo cónico de 50 mL. Los hepatocitos se separaron por centrifugación a 400 rpm durante 2 minutos, éstos quedan en un botón al fondo del tubo el cual se lavó 3 veces con KRB con calcio. Finalmente, las células se resuspendieron en KRB con calcio y se verificó la viabilidad mediante tinción con azul de tripano (dilución 1:1).

Los hepatocitos se sembraron en los sustratos correspondientes durante 4 horas utilizando medio de *attachment*, después de ese tiempo se retiraron las células que no se adhirieron al sustrato y se cambió el medio al de *feeding* que es libre de suero a diferencia del de *attachment*.

2.8 Ensayos de viabilidad y proliferación

Las células HepG2 y los hepatocitos primarios fueron sembrados a baja densidad (25×10^3 células/cm²) en los sustratos descritos en el apartado 2.6 dentro de cajas de cultivo de 12 pozos. Las células HepG2 se cultivaron durante 4 y 48 horas mientras que los hepatocitos primarios fueron analizados después de 24 horas de cultivo.

Después del tiempo de cultivo, las células fueron incubadas con calceína AM (Molecular Probes, ThermoFisher) 1 μ M y yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich) 5 μ M durante 30 minutos en medio fresco a 37 °C.

Las células vivas y muertas fueron visualizadas mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 y se obtuvieron micrografías de las mismas. El análisis y procesamiento de las imágenes se realizó con el software libre ImageJ.

2.9 Ensayos de inmunofluorescencia

- Validación del método para la creación de patrones de colágena sobre PDMS

Para verificar la adecuada transferencia de colágena I mediante impresión por microcontacto en los diferentes sustratos, se realizó una inmunofluorescencia incubando los sustratos con anticuerpo primario Anti-collagen type 1 (Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:100 en suero de caballo al 10%, durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente las muestras se incubaron con anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a Alexa 594 (Jackson immunoresearch) diluido 1:500 en suero de caballo al 10%, durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Estudio de los marcadores Albúmina y HNF4- α

Ambos tipos celulares fueron sembrados en cubreobjetos redondos estériles de vidrio o recubiertos con PDMS suave o rígido y cultivados durante 4 y 48 horas para la línea HepG2 y 24 horas para los hepatocitos primarios.

La evaluación de los marcadores albúmina y HNF4- α (Factor Nuclear de Hepatocitos 4 α) fue exclusiva de los hepatocitos primarios sembrados sobre patrones de colágena I 1 mg/mL obtenidos mediante microcontact printing como se describe anteriormente. Todos los anticuerpos primarios fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology.

Las células se fijaron incubándolas durante 15 minutos con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS a 37 °C. La permeabilización se realizó con Tritón X-100 al 0.1% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Se incubó con la solución de bloqueo (10% de suero de caballo en PBS 1X) por 1 hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios se trabajaron diluyendo con solución de bloqueo 1:100 para albúmina y HNF4- α (ambos hechos en cabra).

Se realizó la incubación durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces por 5 minutos en PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti goat acoplado a Alexa Fluor 594 (Jackson Immunoresearch) diluido 1:500 en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente

en agitación. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces por 5 minutos en PBS 1X y se dió un lavado con 1 mL de agua destilada antes de realizar el montaje para microscopía.

- Marcaje del citoesqueleto de actina con faloidina y life act.

Para las muestras en las que se buscaba estudiar el citoesqueleto de actina como respuesta a los cambios de rigidez, esta se tiñó utilizando faloidina acoplada a Alexa 594 (Molecular Probes, ThermoFisher) en una dilución 1:40 en metanol.

Adicionalmente, se estudió la dinámica del citoesqueleto de actina mediante células HepG2 transfectadas con Life Act acoplado a la proteína fluorescente mTurquoise2. La transfección se realizó con 5 µg del plásmido pLifeAct-mTurquoise2 y 5 µg de lipofectamina® 2000 (Invitrogen); el plásmido No. 36201 fue obtenido de Addagene. La selección de células estables se realizó a las 48 horas postransfección utilizando el antibiótico Geneticin® de GIBCO (900 ug/mL).

- Montaje de las muestras y microscopía de fluorescencia

Las imágenes para la validación del método para la creación de patrones de colágena sobre PDMS fueron adquiridas utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. No se realizó ningún montaje.

Las muestras correspondientes al estudio de los marcadores albúmina y HNF4- α , se montaron en portaobjetos de vidrio de 24x50 mm ya sea utilizando 10 µL de medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) con DAPI o realizando la tinción de los núcleos con DAPI (Invitrogen) utilizando una dilución 1:200 en PBS por 10 minutos y posteriormente montando las muestras con 50 µL de Mowiol (Calbiochem) a temperatura ambiente.

Para la adquisición de las imágenes se emplearon microscopios confocales Zeiss LSM 800 Airyscan (Albúmina y HNF4- α) y Leica TCS SP8 (LifeAct y Actina). El análisis y procesamiento de las imágenes se realizó con el software libre ImageJ.

- Western Blot

Para analizar los niveles de expresión de proteínas marcadoras de fenotipo y función en hepatocitos y HepG2, se obtuvieron lisados de hepatocitos frescos y de cultivo por 24 horas y 7 días y lisados de células HepG2 cultivadas por 24 horas, incubando durante una hora a 4 °C con solución RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet.P40, 0.5% deoxicolato de sodio y 0.1% SDS) junto con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se cuantificó la concentración de proteínas de ambos grupos de lisados mediante el método de Bradford (Bio-Rad) y normalizada. Se prepararon geles de poli(acrilamida):bis-acrilamida al 7.5% y se cargaron 50 y 100 µg de proteína de cada uno de los

lisados para realizar la electroforesis. Las proteínas analizadas fueron transferidas a una membrana de PVDF, se incubó en solución de bloqueo (leche en polvo sin grasa al 5% en TBST (20 mM de Tris-HCl pH 7.6, 137 mM de NaCl más Tween-20 al 1%)) durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados para el Western Blot fueron:

Tabla 4. Anticuerpos primarios para el ensayo de Western Blot

Anticuerpo	No. catalogo	Dilución utilizada
Monoclonal Anti-Vimentin Anti-mouse	V-6630, Sigma	1 a 1,000
Albumina (P-20) Anti-goat	Sc-46293, Santa Cruz Biotechnology	1 a 1,000
Citoqueratina 18 Anti-mouse	Sc-6259, Santa Cruz Biotechnology	1 a 1,000
HNF-4- α Anti-goat	Sc-6556, Santa Cruz Biotechnology	1 a 1,000
Alfa-fetoproteína (AFP) Anti-goat	Sc-8108, Santa Cruz Biotechnology	1 a 1,000

Se realizó la incubación durante toda la noche con los anticuerpos primarios arriba mencionados en agitación suave a 4 °C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo y se realizaron 3 lavados de la membrana con buffer TBST por 5 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó a una dilución de 1:20,000 preparada en una solución de TBST - leche sin grasas al 5%. La membrana se lavó 3 veces con TBST por 5 minutos. La reacción de quimioluminiscencia se realizó con los reactivos de Immobilon (Millipore). La detección de la señal se realizó en películas fotosensibles al azul (Kodak).

2.10 Análisis estadístico

Se realizó la prueba estadística tipo *t* de Student para calcular la significancia estadística. El valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describen los resultados obtenidos de la metodología antes mencionados y cada resultado se discute de forma inmediata.

3.1 Caracterización de los moldes

A continuación, se muestran los resultados de la perfilometría (figura 20) obtenida para los moldes fabricados mediante fotolitografía en una oblea de silicio y mediante ablación láser en portaobjetos de acrílico. En ambos casos corresponden al diseño de líneas llamado L-40 (figura 18 c) ya que son los únicos en los que se pudo realizar un barrido completo con el perfilómetro.

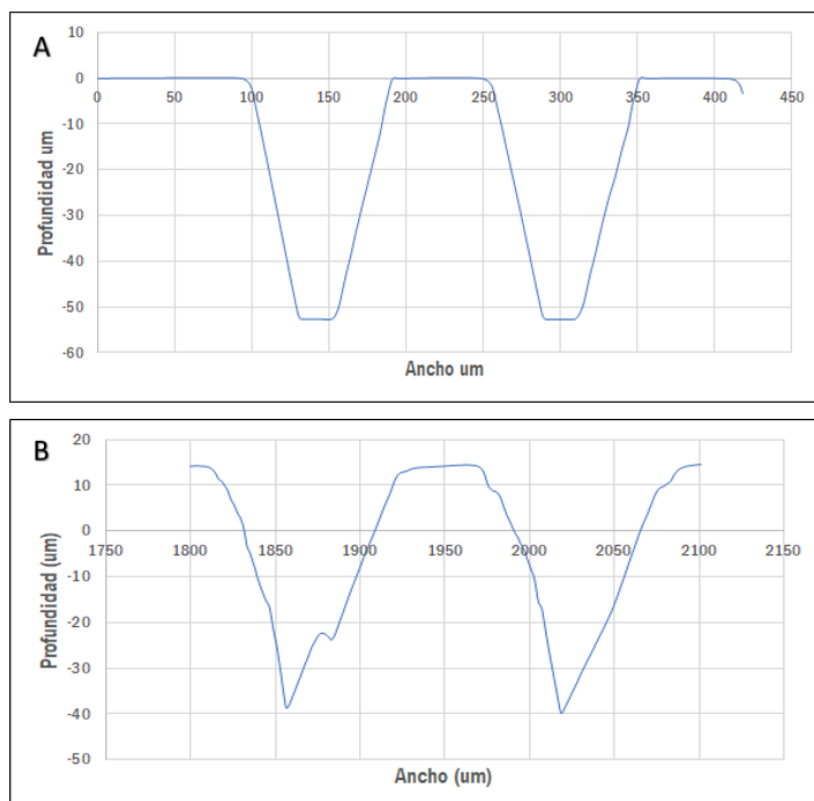


Figura 20. Caracterización por perfilometría de algunas líneas de los moldes de líneas obtenidos por A: fotolitografía y B: ablación láser

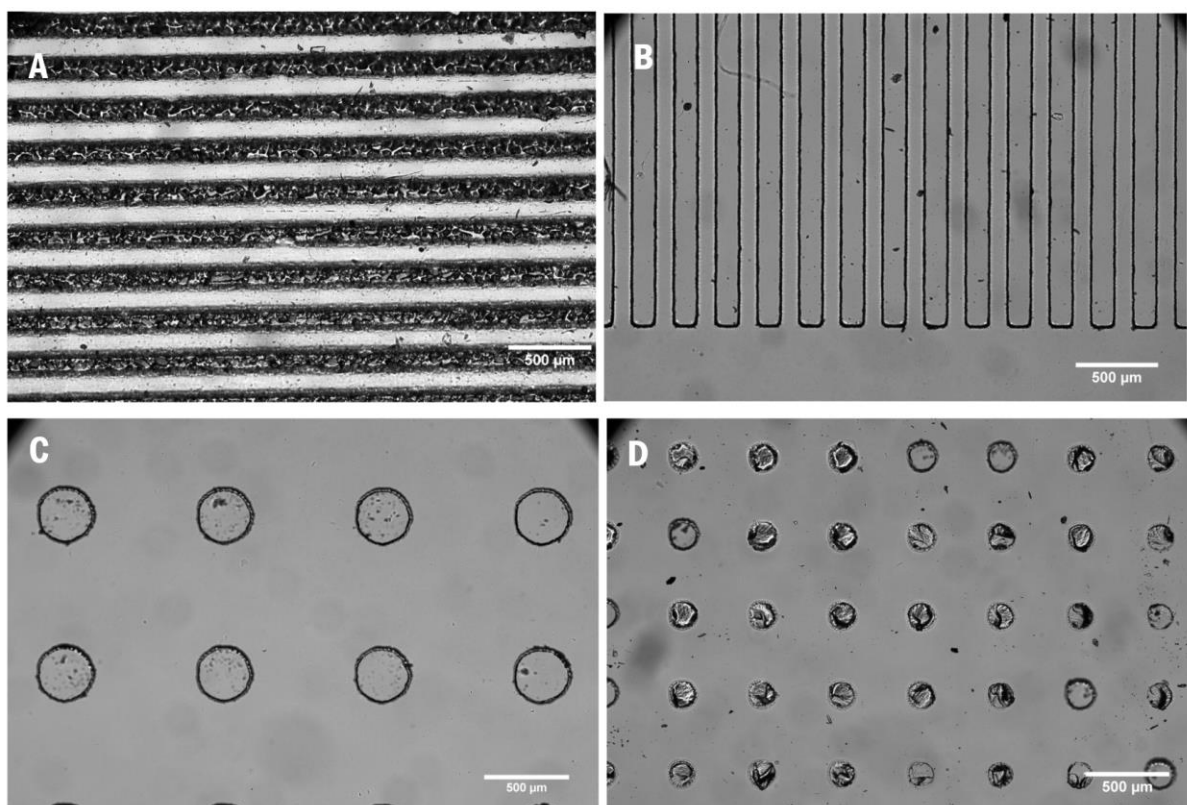


Figura 21. Fotomicrografías de las réplicas en PDMS 184 de los diferentes moldes, A: molde de acrílico, B, C y D: molde en oblea de silicio/SU-8.

Realizando el análisis por microscopía óptica de las réplicas en PDMS de los diferentes moldes, se observa que la réplica obtenida del molde de acrílico (figura 21-A) tiene una superficie más rugosa que en las réplicas del molde de silicio (figuras 21 B-D). Las estructuras pequeñas de círculos de 100 μm de diámetro y los triángulos no pudieron replicarse correctamente ya que en la mayor parte de la réplica las estructuras se arrancaron al desprenderla del molde.

Pensando en favorecer el biomimetismo de la microarquitectura hepática, la estructura elegida para realizar el microcontact printing fueron las líneas ya que realizando el cultivo sobre estas líneas con proteína se podría imitar los cordones que forman los hepatocitos *in vivo*. Sin embargo, con la versatilidad de la técnica molde-réplica es posible realizar una gran diversidad de diseños geométricos con mayor complejidad para buscar mimetizar otro tipo de microarquitectura relevante en el estudio de otros órganos, los cuales pueden ser grabados en acrílico con el equipo de ablación láser que se tiene en el LaNSBioDyT.

3.2 Caracterización de la superficie de los sustratos químicamente modificados

En los sustratos de PDMS suave se observó un fenómeno interesante debido a los diferentes tratamientos de superficie. Después de incubarlos con APTES e inspeccionarlos mediante microscopía

óptica, se pudo ver que se forman grietas en la superficie del material como las que se muestran en la figura 22 que son grietas pertenecientes a sustratos de PDMS sylgard 527, sin embargo, cuando el PDMS rígido (sylgard 184) se analiza por microscopía óptica las grietas son prácticamente imperceptibles, y sólo fueron visualizadas cuando se obtuvieron micrografías mediante Microscopía Electrónica de Barrido (JCM-6000 Plus, JEOL) utilizando electrones secundarios. La figura 23 muestra que también sobre en el PDMS rígido se observa el fenómeno de la formación de grietas en la superficie después del tratamiento de modificación química de superficie.

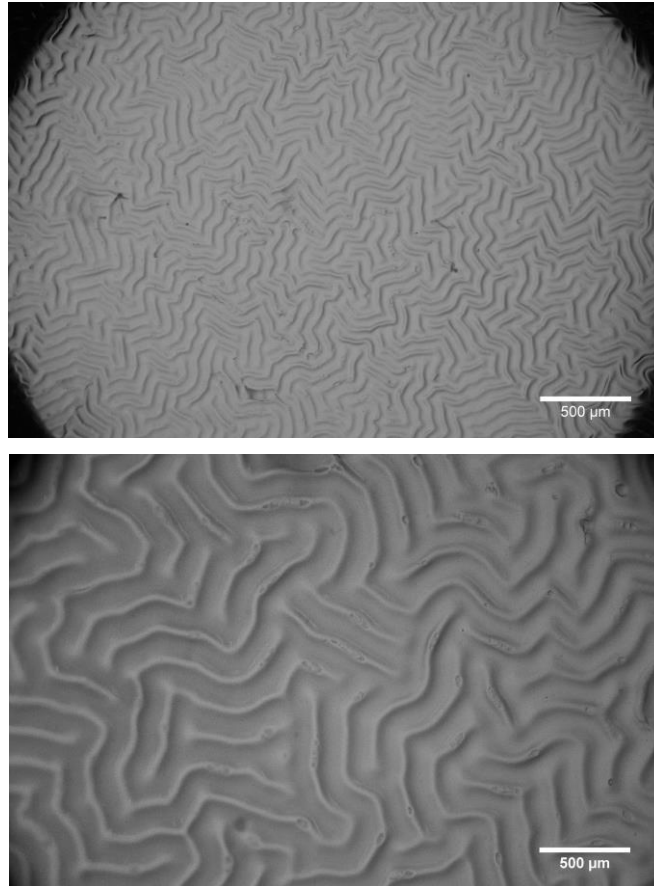


Figura 22. Fotomicrografías de microscopía óptica de las grietas formadas sobre PDMS 527 después de ser tratado con APTES. Objetivos 4X y 10X respectivamente.

Es importante notar en la figura 22 que las grietas tienen una organización geométrica sin un patrón aparentemente “ordenado”.

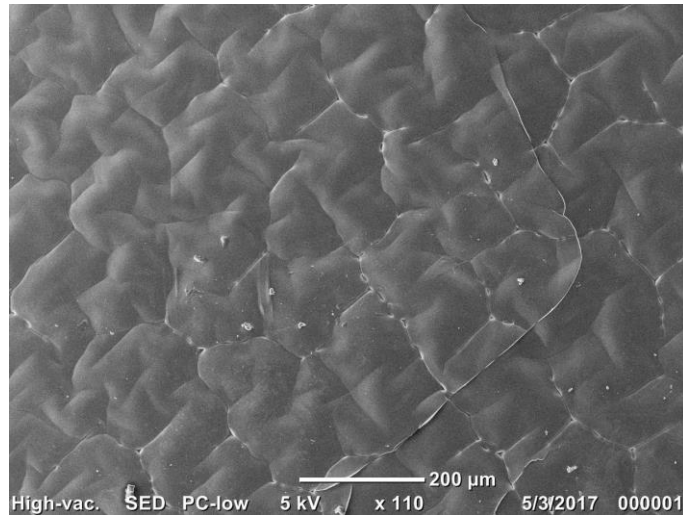


Figura 23. Fotomicrografía de Microscopía Electrónica de Barrido, grietas formadas sobre PDMS 184 después de ser tratado con APTES

La modificación de la topografía de los polímeros a escala micrométrica y submicrométrica tiene una implicación directa en diferentes áreas científicas y tecnológicas. Por ejemplo, en ingeniería de tejidos es posible controlar ciertos aspectos del comportamiento celular mediante la alteración de la topografía de la superficie [130]. Otras aplicaciones potenciales incluyen rejillas de difracción óptica, biosensores y dispositivos para aplicaciones biológicas. Yesildag y colaboradores [131] publicaron en mayo de 2017 un método para realizar una técnica similar a la impresión por microcontacto para estampar nanopartículas de oro con resolución nanométrica a partir de estampas de PDMS con nano-arrugas. En trabajos posteriores será interesante explorar a profundidad los posibles beneficios que pueden obtenerse de esta microestructuración así como estandarizar algún método para controlar su formación.

3.2.1 Caracterización del ángulo de contacto

A continuación se muestran las imágenes de gotas de agua sobre las diferentes superficies y los valores de los ángulos medidos en el equipo DSA 100 (figura 24).

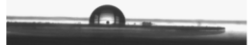



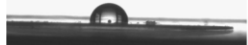











	APTÉS 0.09% EN METANOL	APTÉS 5% EN H ₂ O	APTÉS 99%	CONTROL
PDMS 184	98.0°± 1.1 0 SEG 	95.8°± 1.0 0 SEG 	99.3°± 2.6 0 SEG 	97.5°± 2.1 0 SEG 
	96.1°± 1.1 30 SEG 	93.3°± 1.5 30 SEG 	98.3°± 1.3 30 SEG 	96.1°± 1.4 30 SEG 
PDMS 527	89.7°± 1.5 0 SEG 	94.4°± 0.1 0 SEG 	102.9°± 2.0 0 SEG 	87.4°± 1.0 0 SEG 
	86.7°± 1.2 30 SEG 	94.1°± 0.5 30 SEG 	99.7°± 2.4 30 SEG 	85.8°± 2.1 30 SEG 

Figura 24. Ángulos de contacto de los diferentes sustratos tratados y muestras control reportados por el equipo DSA100.

Las mediciones obtenidas para los sustratos de PDMS 184 indican que una concentración baja de silano tiene un efecto de reducir ligeramente el ángulo de contacto, sin embargo, al aumentarlo predominan las arrugas formadas en el polímero lo que modifica el área de contacto de la gota con la superficie y vuelve a incrementar el ángulo de contacto.

En el caso del PDMS 527 la tendencia a la formación de arrugas se observa desde concentraciones bajas, lo que predomina sobre el efecto que se esperaba del tratamiento con el silano que disminuiría progresivamente los ángulos de contacto al aumentar la concentración.

3.2.2 Caracterización de la topografía

El análisis por Microscopía de Fuerza Atómica permitió realizar la caracterización de la topografía de la superficie dependiendo de los diferentes tratamientos de modificación química de superficie.

La figura 25 muestra los resultados de mediciones realizadas solamente en sustratos de PDMS 184 (rígido). Por cuestiones técnicas no es posible reportar la topografía de los sustratos de PDMS 527 (suave) ya que este polímero es un gel y la punta del microscopio se queda adherida al material.

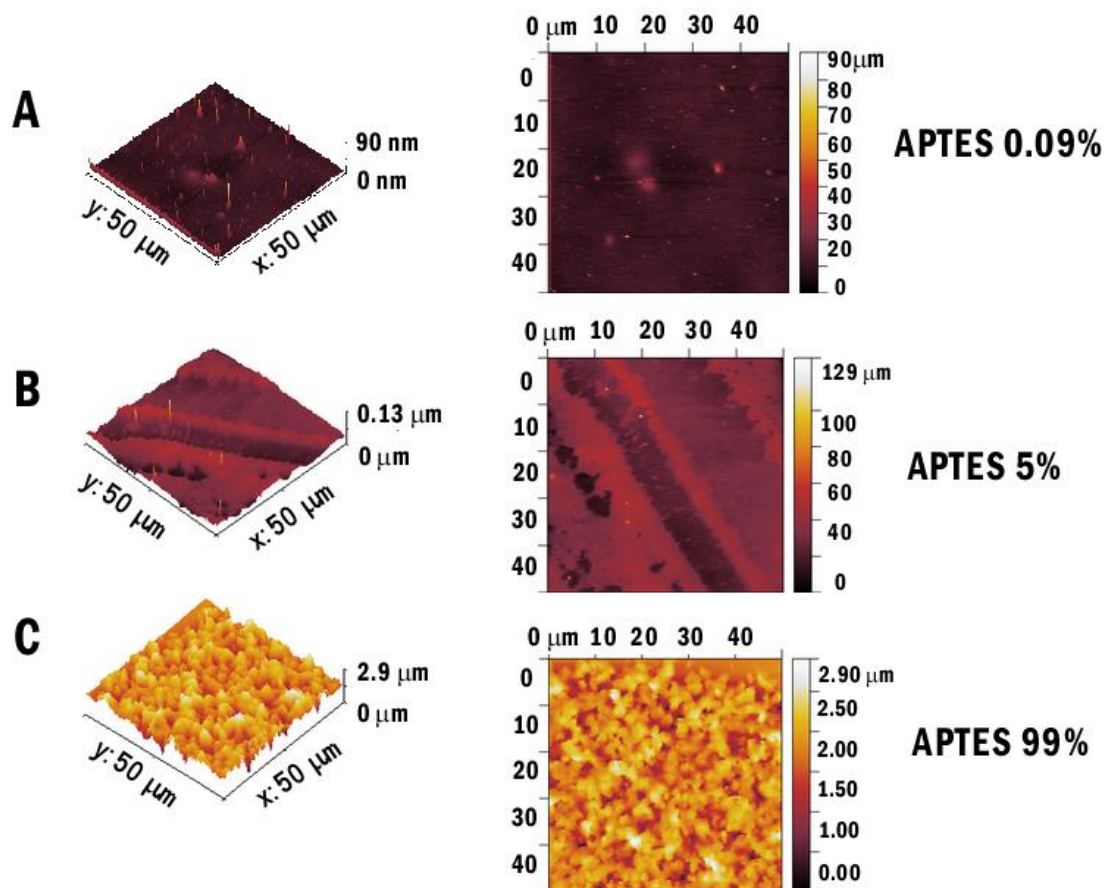


Figura 25. Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica de las superficies de sustratos de PDMS 184 con diferentes tratamientos de funcionalización.

El análisis muestra que el incremento en la concentración de silano modifica la topografía de la superficie haciéndola más rugosa. Junto con las arrugas que fueron observadas en el material, estos cambios en la superficie pueden ser considerados como explicación de la tendencia observada en las mediciones de ángulos de contacto, los cuales incrementan al aumentar la concentración de silano indicando un aumento en la hidrofobicidad. Sin embargo, como se verá más adelante esto no fue un impedimento para lograr la adhesión de las células ya que el tratamiento de superficie permite retener la proteína.

3.2.3 Caracterización por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

Se realizó la caracterización de los sustratos por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X con la finalidad de analizar el tipo de átomos presentes en la superficie de los diferentes sustratos. Los espectros obtenidos son los siguientes:

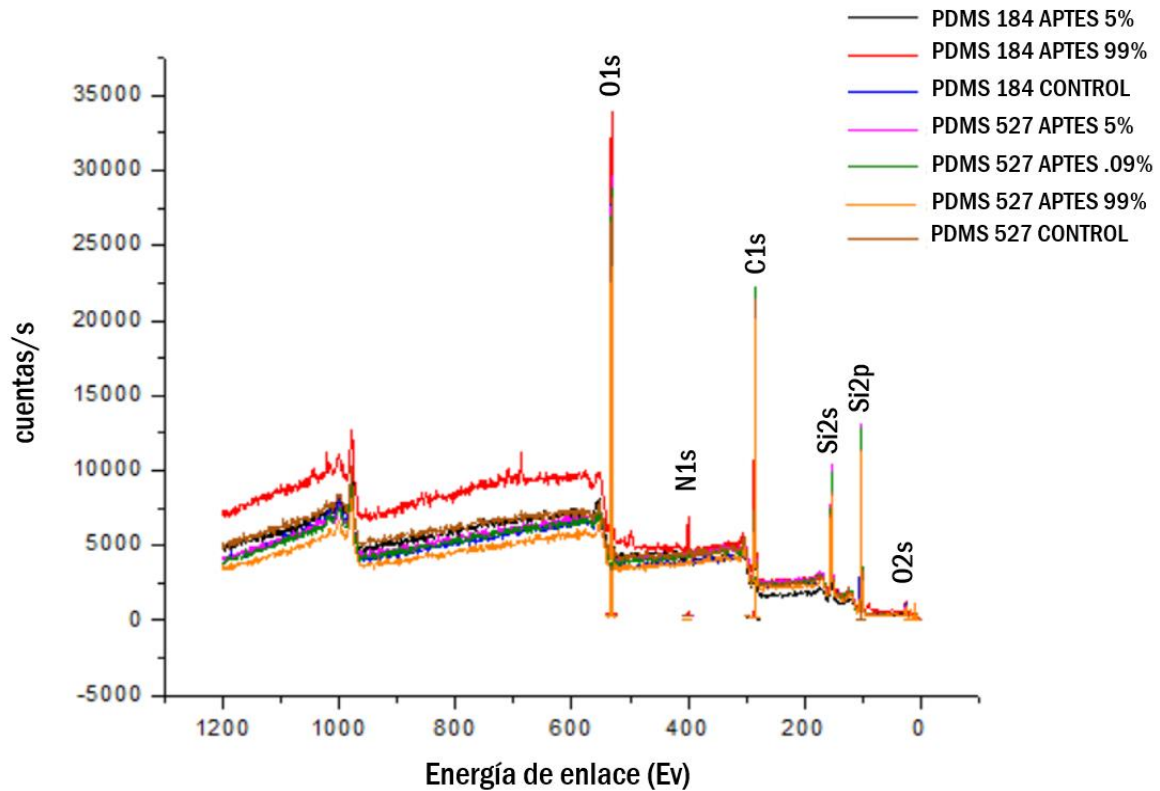


Figura 26. Análisis por Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X de sustratos de PDMS 184 y 527 con diferentes tratamientos de funcionalización.

El ensayo mostró que sólo en los sustratos tratados con APTES al 99% es posible detectar la señal correspondiente al orbital 1s del nitrógeno, debido a la presencia del grupo funcional amino ($-NH_2$).

3.3 Caracterización del microestampado con colágena tipo I

Para poder comprobar la transferencia de patrones de colágena sobre la superficie del PDMS se realizó una inmunofluorescencia como se mencionó en la sección 2.9 de la metodología. La figura 27 muestra que el anticuerpo se encuentra justo en las líneas observadas en la micrografía de microscopía óptica (izquierda) de un sello de proteína depositado sobre un sustrato de PDMS 527.

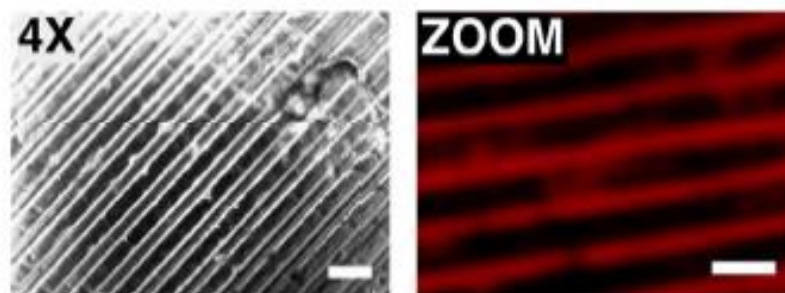


Figura 27. Micropatrones de Colágena I depositados sobre PDMS suave: objetivo 4X (izquierda), Micrografía de inmunofluorescencia con anti-Colágena I Barras de escala 200 μm

3.4 Viabilidad y proliferación celular

Después de haber sido cultivadas en micropatrones de colágena I por 4 y 48 horas, se observó que las células HepG2 mantuvieron una buena adhesión celular al sustrato sólo en las regiones en las que se encontraba la proteína. Las células quedaron confinadas en estas líneas como se puede observar en la figura 28.A. Esto resulta de interés ya que se ha reportado que las células HepG2 sembradas a alta densidad pueden mejorar sus funciones metabólicas en comparación con el cultivo a baja confluencia [132].

El ensayo de viabilidad y muerte con calceína AM y yoduro de propidio mostró que las células sembradas con los sustratos de PDMS modificados químicamente se mantuvieron en su mayoría vivas como se puede observar en las gráficas de la figura 28 paneles B y C.

Realizando la comparación estadística mediante la prueba de *t* de Student entre los diferentes grupos de sustratos (vidrio, PDMS suave y PDMS rígido) se observaron diferencias significativas en la proliferación celular entre los sustratos vidrio y PDMS rígido en relación al PDMS suave, habiendo una menor proliferación en este último. Esto correlaciona con que el PDMS suave tiene una rigidez más cercana al tejido hepático que en los otros dos grupos de sustratos y en condiciones *in vivo* las células parenquimales hepáticas no son células proliferativas, por lo que se puede considerar al sustrato de PDMS suave como el más cercano a las características biomiméticas que se buscan para la plataforma en cuestión mecánica.

Como prueba para estudiar el fenotipo en cada uno de los sustratos probados, se estudió la expresión de HNF4 α . Este factor transcripcional es considerado un marcador asociado a un fenotipo epitelial como el de los hepatocitos. En la línea celular HepG2 se espera que se encuentre expresado cuando éstas poseen un fenotipo adulto, lo cual se confirma en las micrografías que se presentan en la figura 28. D en todos los sustratos utilizados, por lo que ni la rigidez del material ni el proceso químico de modificación de superficie tienen un efecto negativo en esta característica particular del fenotipo.

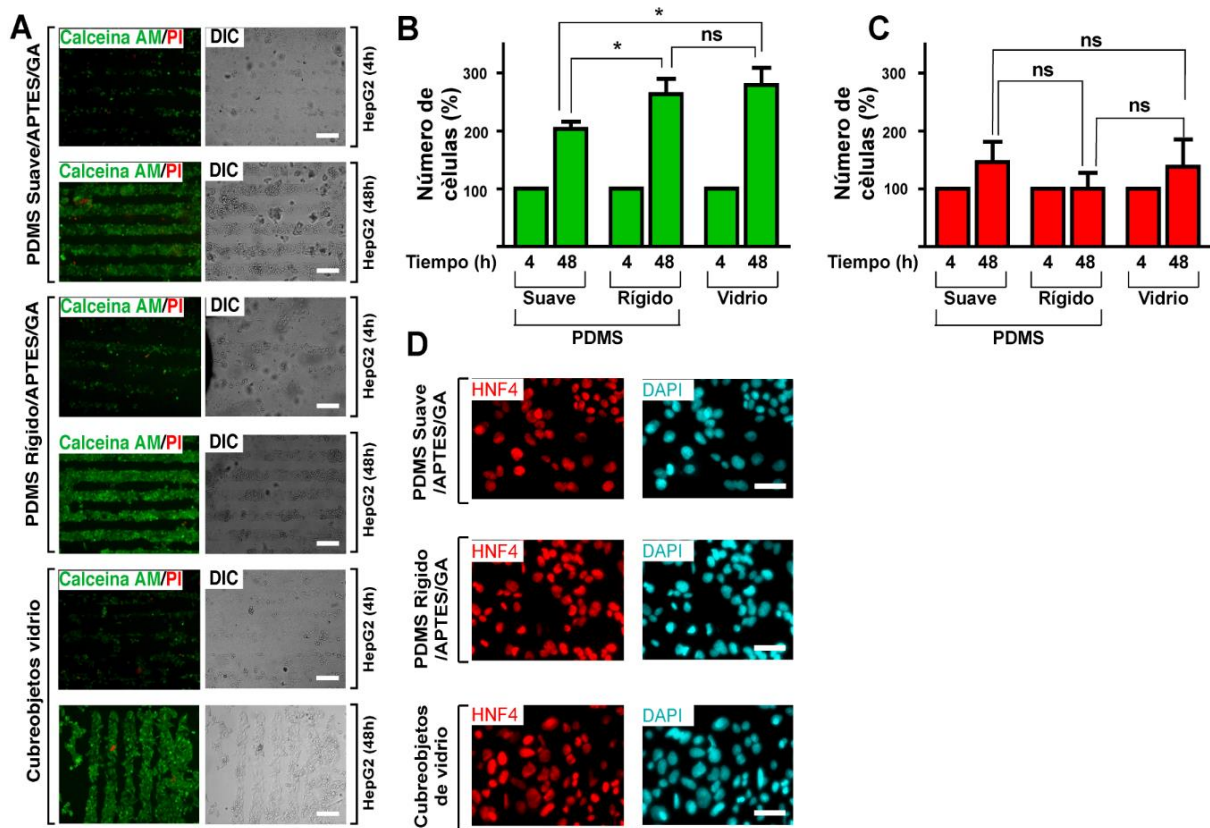


Figura 28. Alta adhesión, viabilidad y proliferación de células HepG2 confinadas en sustratos de PDMS suave y rígido tratados con APTES/GA con patrones de líneas de Col I. A: Adhesión, viabilidad y proliferación en células HepG2, evaluadas con el ensayo de Calceína AM/PI (células vivas en verde, muertas en rojo), barra de escala = 200 μm . B-C: Células vivas y muertas presentadas como porcentaje de número de células basado en el área ocupada de células teñidas con calceína (células vivas/barras verdes) y yoduro de propidio (células muertas/barras rojas). * $p < 0.0318$ (suave vs rígido, células vivas), * $p < 0.0201$ (suave vs vidrio, células vivas) y ns = no significativo (rígido vs vidrio y en todas las condiciones de células muertas). D: Imágenes de epifluorescencia en células HepG2 mostrando el marcador HNF4 con localización nuclear. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala = 50 μm .

3.5 Organización del citoesqueleto de actina

Se conoce que el citoesqueleto de actina presenta una reorganización que es dependiente de la rigidez del sustrato en el cual se encuentra adherida la célula y de las interacciones existentes con células vecinas. La organización del citoesqueleto en células HepG2 fue estudiada mediante dos aproximaciones: la primera fue mediante la transfección de las células con LifeAct que permite realizar un seguimiento in vivo mediante fluorescencia de la dinámica del citoesqueleto, marcando las estructuras de F-actina. El segundo fue mediante el marcaje con faloidina, la cual es una micotoxina que tiene una alta afinidad por los filamentos de actina y que al estar acoplada con un fluorocromo como es Alexa Fluor 488, permite identificar la organización de estos filamentos mediante microscopía confocal.

La figura 29 A muestra de manera cualitativa la comparación de la marca del citoesqueleto de actina en células HepG2 sembradas en sustratos de PDMS suave y rígido químicamente modificados, en ambos casos las células fueron confinadas en los patrones de líneas de colágena I. Como se observa, los filamentos de actina se organizan de manera cortical en las células sembradas en el sustrato suave, mientras que en el sustrato rígido se observa una mayor localización hacia el centro de la célula. Algunos autores como Ong y colaboradores [133] reportan que la localización cortical de la actina es indicativo de una morfología que corresponde a la que se encontraría en un arreglo 3D de células, por lo que esta respuesta es parte de lo que se busca al querer fabricar una plataforma biomimética.

Para confirmar lo anterior de manera cuantitativa, se analizaron las imágenes mediante Matlab para poder determinar el contraste de fluorescencia y el ancho del anillo de actina de las células en sustratos de PDMS rígido y suave en zonas donde había contactos célula - célula y en zonas donde las células estaban aisladas. El resultado se muestra en la figura 29 B, se realizó una comparación estadística mediante la prueba t de Student de dos colas con un nivel de significancia del 95% mediante la cual se puede ver que los resultados de las mediciones en zonas con contacto célula-célula son estadísticamente diferentes entre sí, siendo mayores el ancho del anillo de actina y el contraste de fluorescencia cuando el sustrato es PDMS suave.

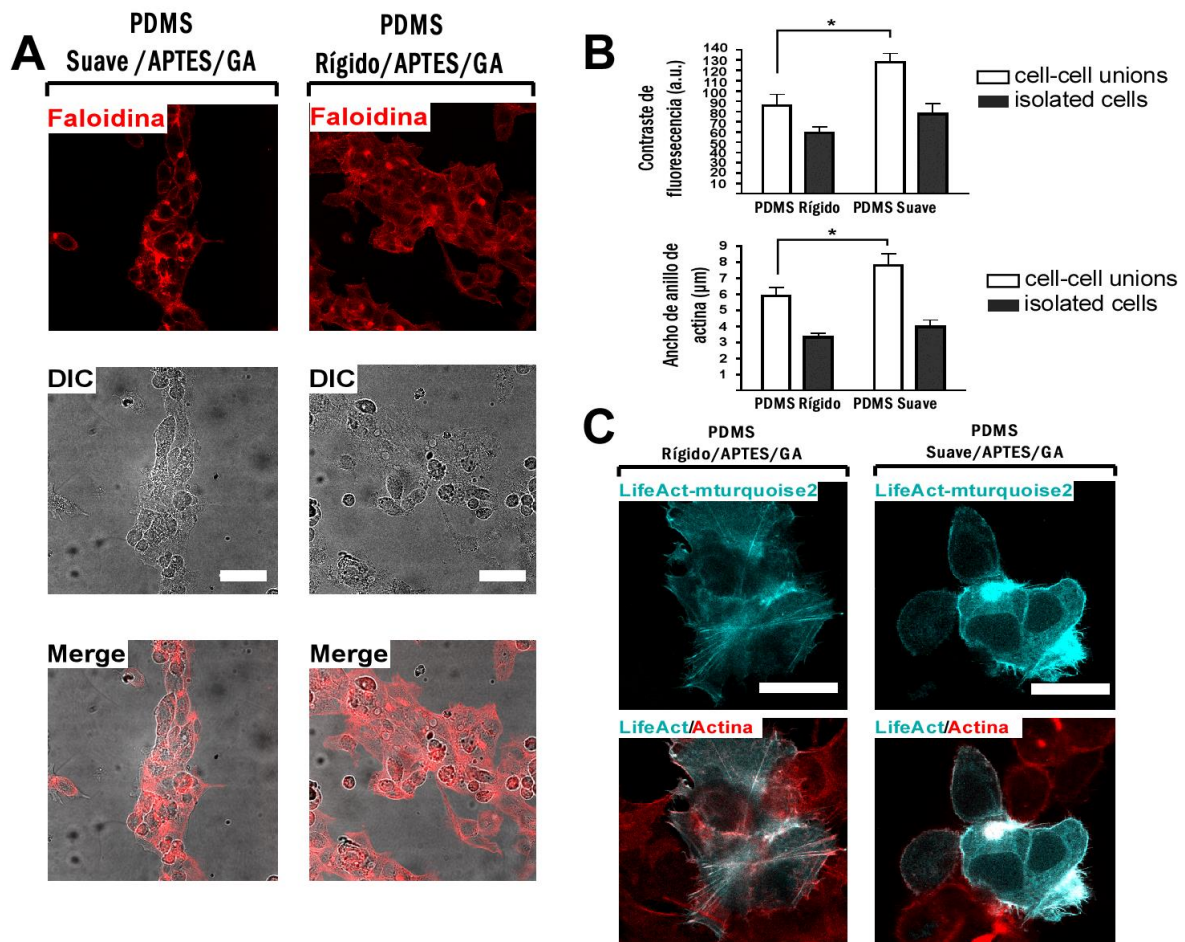


Figura 29. Localización de actina en células HepG2 confinadas en patrones de líneas de Col I sobre sustratos de PDMS rígido y suave con superficie químicamente modificada. A: Tinción de los filamentos de actina mediante faloidina acoplada a Alexa 594. Las imágenes de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y microscopía confocal fueron tomadas a las 48 horas de cultivo. Barra de escala = 50 μm . B: Niveles relativos de F-actina medidos como contraste de fluorescencia (a.u. = unidades arbitrarias) y como ancho de anillo de actina (μm), * $p < 0.021$ (célula - célula, contraste) y ** $p < 0.008$ (célula - célula, ancho). C: Tinción de F-actina con faloidina acoplada a Alexa 594 (rojo) en células transfectadas con LifeAct-mTurquoise2 (cian). Barra de escala = 30 μm .

3.6 Resultados iniciales de viabilidad, funcionalidad y fenotipo en hepatocitos de rata

Los hepatocitos primarios de rata fueron cultivados en plataformas iguales a las que se usaron en los cultivos de la línea celular HepG2 para analizar la organización de estas células según la rigidez del sustrato y el confinamiento en patrones de proteína.

En la figura 30 panel A se puede observar de manera cualitativa el resultado de la prueba de viabilidad y muerte con Calceína AM y yoduro de propidio. Las micrografías permiten ver que después de 24 horas de cultivo, las células presentan una alta viabilidad en ambos sustratos ya que en su mayoría se encuentran teñidas en verde por la incorporación de Calceína. Además, las células presentan una adhesión selectiva a las regiones en donde se encuentran los patrones de colágena sin realizar ningún

tratamiento adicional para bloquear la superficie, lo cual abre la posibilidad de realizar co-cultivos con fibroblastos para promover interacciones heterotípicas y mejorar así el modelo propuesto, incrementando sus características biomiméticas en un trabajo futuro. Se ha estudiado que la interacción con fibroblastos promueve el incremento de funciones hepáticas específicas en hepatocitos [134].

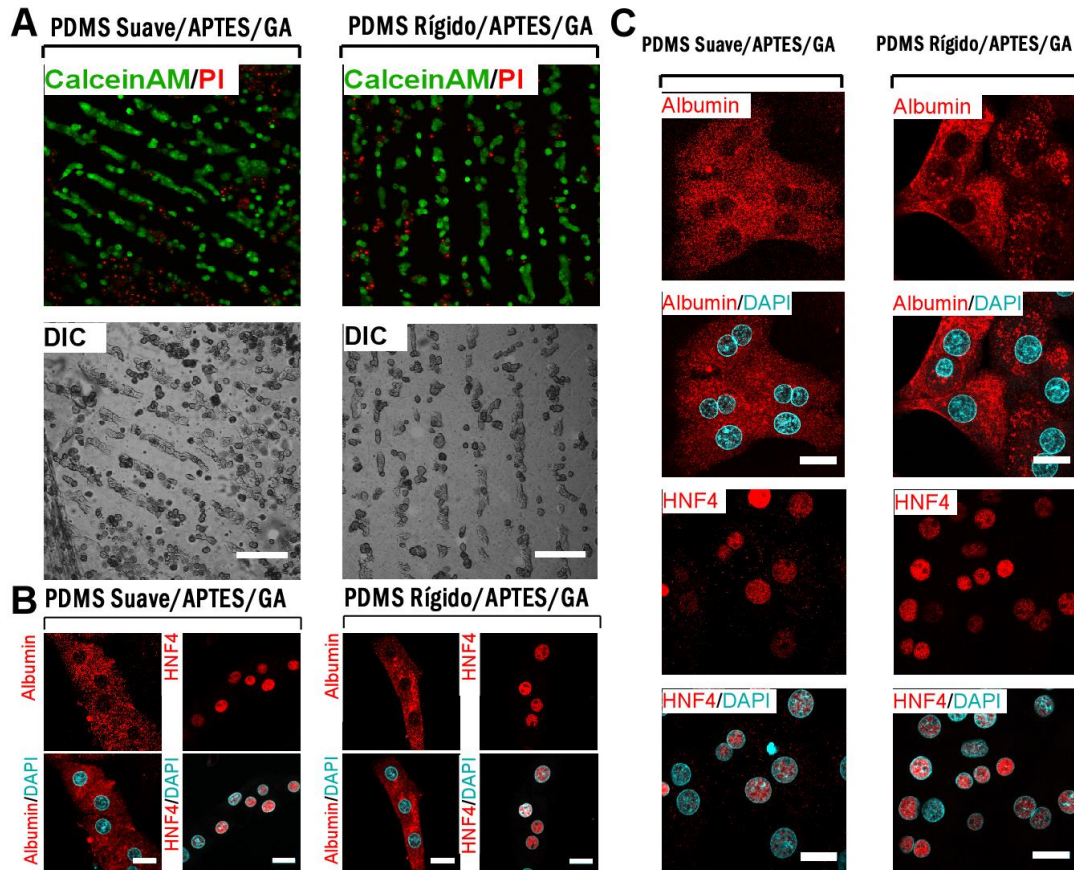


Figura 30. Confinamiento de hepatocitos primarios de rata cultivados sobre micropatrones de Colágena I obtenidos por impresión por microcontacto en sustratos de PDMS rígido y suave químicamente modificados con APTES/GA. A: Evaluación de la viabilidad de los hepatocitos con el método de Calceína AM/PI (células vivas en verde, muertas en rojo). Las imágenes de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y microscopía confocal fueron tomadas a las 24 horas de cultivo. Barra de escala = 100 μ m. B: Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la expresión de albúmina (citósol) y HNF4- α como marcadores hepáticos específicos después de 24 horas de cultivo. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala = 20 μ m. C: Imágenes de microscopía confocal de hepatocitos primarios de rata cultivados sobre PDMS suave y rígido tratado con APTES/GA y recubierto totalmente con Colágena I mostrando expresión de albúmina (citósol) y HNF4- α como marcadores hepáticos específicos después de 24 horas de cultivo. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala = 20 μ m

Los paneles B y C de la figura 30 corresponden al análisis por microscopía confocal de hepatocitos primarios sembrados en sustratos con patrones de proteína (panel B) y sembrados en sustratos con toda la superficie recubierta de colágena (panel C), en ambos casos se muestran los marcadores albúmina y HNF4 expresados en el citósol y núcleo respectivamente. El estudio de la expresión de la proteína albúmina es de interés ya que es utilizada como un marcador de diferenciación de hepatocitos maduros

y es una manera de evaluar la funcionalidad sintética de estas células [135]. En ambos tipos de sustratos tratados químicamente se observó una tinción uniforme de albúmina intracelular.

La presencia de la proteína HNF4 ha sido correlacionada con la expresión de un fenotipo hepático *in vitro* y la deficiencia de ésta tiene como consecuencia la disminución o supresión de la expresión ciertos genes característicos de hepatocitos [136].

El ensayo de Western Blot realizado en lisados de células HepG2 cultivadas durante 24 horas y hepatocitos primarios frescos y después de haber sido cultivados durante 24 horas y 7 días (figura 31), muestra la expresión de ciertas proteínas que son consideradas marcadores de fenotipo y funcionalidad hepática. Se analizó la expresión de Vimentina la cual es una proteína característica de una transición epitelio - mesénquima y en la cual se observa un incremento considerable a los 7 días de cultivo, indicativo de que las células hepáticas han iniciado una transdiferenciación hacia un fenotipo de células tipo miofibroblastos, Albúmina es un marcador de funcionalidad ya que es producida por los hepatocitos, puede observarse una expresión cualitativamente mayor en las células primarias frescas y de 24 horas de cultivo que en la línea celular HepG2, Citoqueratina 18 como marcador de fenotipo epitelial hepático no se encuentra expresado en los hepatocitos de cultivo primario pero sí en la línea HepG2, HNF4- α que ya fue mencionada anteriormente como marcador específico de fenotipo hepático adulto se encuentra presente en todas las condiciones excepto en hepatocitos cultivados durante 7 días que ya han sufrido transdiferenciación y alfa fetoproteína que es un marcador de hepatocitos inmaduros se encuentra expresada con menor intensidad que HNF4 en todas las condiciones menos en hepatocitos de 7 días de cultivo por las razones mencionadas.

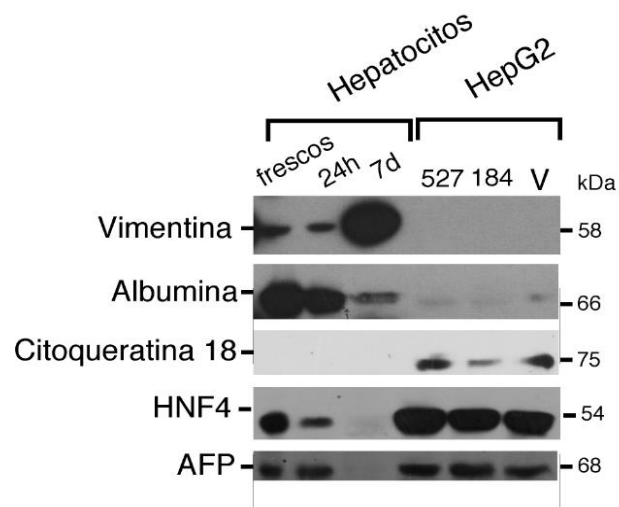


Figura 31. Niveles de expresión de proteínas marcadoras de fenotipo y función en Hepatocitos y HepG2. Se analizaron extractos totales de Hepatocitos frescos, Hepatocitos cultivados por 24h y 7 días, así como, células HepG2 cultivadas por 24 h sobre PDMS 527, 184 y vidrio. Se detectaron por Western Blot, vimentina, albumina, citoqueratina 18, HNF4 (Factor nuclear de hepatocitos 4) y AFP (alfa- feto proteína). Se indican los pesos moleculares de cada proteína en KDa.

En estudios posteriores será interesante realizar un seguimiento en un mayor número de días de cultivo de manera que pueda observarse si mediante mecanotransducción (rigidez) e interacciones célula-célula (confinamiento) en los sustratos propuestos pueden mantener o modular estas características de fenotipo hepático.

CAPÍTULO

4

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se realizó el estudio de la modificación química de superficie del polímero polidimetilsiloxano con la que se mejora las propiedades de este material y así favorecer su uso en el cultivo de células hepáticas. Se observó que en el PDMS 527 (suave) se puede además, tener una modificación en la topografía de la superficie obteniendo grietas que son modulables de acuerdo al método utilizado para funcionalizar la superficie y la concentración utilizada del organosilano APTES. Hasta este momento se desconoce el efecto que esta microestructuración puede tener en la respuesta celular pero será interesante estudiarla utilizando para ello la línea celular hepática C9 (línea celular de hepatocito de rata), la cual no requiere de colágena o proteínas de matriz extracelular para poder formar puntos de adhesión sobre el PDMS y da la posibilidad de analizar cambios en su morfología que puedan deberse sólo a cambios en la topografía del sustrato en el que se cultiven.

Se presentó también un método casero para la fabricación de estampas microestructuradas de PDMS para su uso en la técnica de litografía suave de impresión por microcontacto, mostrando su eficiencia para tener un control geométrico sobre la transferencia de colágena tipo I, una proteína que forma parte de la matriz extracelular hepática y que es necesaria para que las células puedan mantener una adecuada interacción célula-sustrato mediante puntos de adhesión. En estudios posteriores se tiene previsto el aislamiento de matriz extracelular de tejido hepático de rata mediante la descelularización del órgano, procesarla para tener este conjunto de proteínas en solución y poder realizar el procedimiento de estampado mediante impresión por microcontacto sobre superficies de PDMS químicamente modificado o incluso hidrogeles que permiten disminuir aún más la rigidez del material y mejorar el biomimetismo de las propiedades mecánicas de diversos tejidos. Se piensa que el uso de esta matriz extracelular específica de las células hepáticas en los sustratos de cultivo permitirá establecer una mejor interacción célula-sustrato, además de que dentro de esta matriz se encuentran moléculas de señalización que pueden favorecer el estado diferenciado de las células de cultivo primario por tiempos más prolongados.

En cuanto a los hepatocitos primarios de rata, se estudió por primera vez la influencia de micropatrones de proteínas de matriz extracelular sobre PDMS, lo cual es una característica útil para el desarrollo de plataformas de tipo *lab-on chip* u *organ-on-chip*. Los resultados mostraron que esta técnica para transferir microestampados permite el cultivo de hepatocitos primarios en una forma similar a los cordones que se presentan en la microarquitectura hepática sobre PDMS suave y rígido. Esto es muy importante para controlar el fenotipo de hepatocitos modulando la organización del citoesqueleto de actina no sólo mediante control de la rigidez del sustrato. Sin embargo, se requieren más estudios para tener mayor claridad sobre el efecto sinérgico de la rigidez del sustrato y el confinamiento en micropatrones sobre estas células.

Gracias al control ofrecido por la técnica de ablación láser presentada en este trabajo, es posible la fabricación de estas estampas microestructuradas en una gran variedad de geometrías y dimensión de patrones con los que se puede realizar impresión por microcontacto de diferentes moléculas, lo cual expande la posibilidad de confinar diversos tipos celulares de manera que se puedan representar interacciones célula-célula en una disposición espacial más cercana a la microarquitectura *in vivo* de diferentes tejidos dentro de un dispositivo de tipo *organ-on-chip*. Lo anterior es relevante ya que el mantenimiento a largo plazo del fenotipo hepático y la modulación de la funcionalidad, dependen de diversas señales del microambiente como son las interacciones intercelulares y célula - matriz. Esto se estudiará posteriormente ampliando el tiempo de monitoreo de la morfología y funcionalidad de hepatocitos primarios a 7 días o más de ser posible.

El control espacial de la adhesión celular tiene interesantes aplicaciones, por ejemplo es fundamental para el desarrollo de estudios de interacción célula - célula. La posibilidad de generar patrones para adhesión celular sobre superficies planas o canales microfluídicos es importante para poder localizar células en regiones cercanas a microdetectores dentro de dispositivos para biosensores basados en células.

Además de lo mencionado anteriormente, esta técnica es de bajo costo lo cual permite que la fabricación de los moldes para impresión por microcontacto sea más accesible en comparación con los moldes obtenidos mediante fotolitografía que requiere de materiales y equipos de alto costo además de formación especializada para realizar el procedimiento.

REFERENCIAS

- [1] Ingber DE. The architecture of life. *Sci Am* 1998; 278(1): 48-57.
- [2] Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro A, Fredberg J, Chen Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* 2017; 32(4): 266-277.
- [3] Meyer C, Liebe R, Breitkopf-Heinlein K, et al. Hepatocyte fate upon TGF-beta challenge is determined by the matrix environment. *Differentiation* 2015; 89(5): 105-116.
- [4] Yamada S, Otto PS, Kennedy DL, Wayne TF. The effects of dexamethasone on metabolic activity of hepatocytes in primary monolayer culture. *In vitro* 1980; 16(7): 559-570.
- [5] Ullrich A, Stolz DB, Ellis EC, Strom SC, Michalopoulos GK, Hengstler JG, Runge D. Long term cultures of primary human hepatocytes as an alternative to drug testing in animals. *ALTEX* 2009; 26: 295-302.
- [6] Huh D, Torisawa Y, Hamilton G, Kim H, Ingber D. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips. *Lab Chip* 2012; 12(12): 2156-216.
- [7] Cretel, E., Pierres, A., Benoliel, AM. and Bongrand P. How Cells feel their environment: a focus on early dynamic events. *Cel Mol Bioeng* 2008; 1: 5.
- [8] Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* 2008; 47(4): 1394-1400.
- [9] Pagan R, Llobera M, and Vilaro S. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cultured Neonatal Hepatocytes. *Hepatology* 1995; 21(3): 820 - 831.
- [10] Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM and Ingber DE. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* 1997; 276(5317): 1425-8.
- [11] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL and Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 2006; 126(4): 677-689.
- [12] Iskratsch, T., Wolfenson, H. & Sheetz, M. P. Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15(12): 825–833.
- [13] Burute M and Thery M. Spatial segregation between cell–cell and cell–matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24(5): 628-636.
- [14] Carey S P, Charest J M and Reinhart-King C C. Forces During Cell Adhesion and Spreading Implications for Cellular Homeostasis. *Stud Mechanobiol Tissue Eng Biomater* 2011; 4: 29-69.
- [15] Paluch E K, Elson C M, Biais N, Fabry B, Moeller J, Pruitt B L, Wollnik C, Kudryasheva G, Rehfeldt F and Federle W. Mechanotransduction: use the force(s). *BMC Biol* 2015; 13: 47.
- [16] DuFort C C, Paszek M J and Weaver V M, Balancing forces: architectural control of mechanotransduction *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(5): 308-319.

- [17] Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, Chen AC, Sah RL, Taylor SS, Engler AJ and Yang J. Matrix stiffness drives epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1–G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol* 2015; 17(5): 678-688.
- [18] Cretu A., Castagnino P., Assoian R. Studying the Effects of Matrix Stiffness on Cellular Function using Acrylamide-based Hydrogels. *J Vis Exp* 2010; 42 pii: 2089.
- [19] Han, S. J., K. S. Bielawski, ., N. J. Sniadecki. Decoupling substrate stiffness, spread area, and micropost density: a close spatial relationship between traction forces and focal adhesions. *Biophys. J.* 2012; 103: 640–648.
- [20] Oakes, P. W., S. Banerjee, ., M. L. Gardel. Geometry regulates traction stresses in adherent cells. *Biophys. J.* 2014; 107: 825–833.
- [21] Anderson DEJ, Hinds MT. Endothelial cell micropatterning: Methods, effects and applications. *Ann Biomed Eng* 2011; 39(9): 2329-2345.
- [22] Wen-Wen L, Zhen-Ling C, Xing-Yu J. Methods for cell micropatterning on two dimensional surfaces and their applications in biology. *Chin J Anal Chem* 2009; 37(7): 943-949.
- [23] Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DI, Whitesides GM. Engineering cell shape and function. *Science* 1994; 264 (5159): 696-8.
- [24] Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 2003; 200(4): 423-428.
- [25] Abdellatef SA, Ohi, A, Nabatame T, Taniguchi A. The effect of physical and chemical cues on hepatocellular function and morphology. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 4299-4317.
- [26] Wu J, Mao Z, Tan H, Han L, Ren T, Gao C. Gradient biomaterials and their influences on cell migration. *Interface Focus* 2012; 2: 337-355.
- [27] Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB* 1997; 11(1): 51-9.
- [28] Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* 2007; 179(6): 1311 - 1323.
- [29] Lautenschlager, F. & Piel, M. Microfabricated devices for cell biology: all for one and one for all. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25: 116-24.
- [30] Franssila, Sami. Introduction to Microfabrication. 2010 John Wiley & Sons. Singapore
- [31] Weibel DB, DiLuzio WR, Whitesides GM. Microfabrication meet microbiology. *Nature Rev. Microbiol* 2007; 5: 209-218.
- [32] Madou, Marc J. Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization. Second Edition. CRC Press 2002. USA. pp. 2
- [33] Qin D, Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature protocols* 2010; 5: 491-502.
- [34] Abdelgawad M, Watson MWL, Young EWK, Mudrik JM, Ungrin MD, Wheeler AR. Soft lithography: masters on demand. *Lab Chip* 2008; 8:1379-1385.

- [35] Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography. *Angewandte Chemie, International Edition* 1998; 37: 550-575.
- [36] Qin D, Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature protocols* 2010; 5(3): 491-502.
- [37] M.W. Pitcher, Y. Arslan, P. Edinc, M. Hartal, M. Masjedi, O. Metin, F. Sen, O. Turkarslan, B. Yigitsoy, Recent Advances in the Synthesis and Applications of Inorganic Polymer. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem* 2007; 182: 2861–2880.
- [38] Kumar A, Whitesides GM. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching. *Appl. Phys. Lett.* 1993; 63: 2002 - 2004
- [39] Kumar A, Biebuyck HA, Whitesides GM. Patterning Self-Assembled monolayers: Applications in materials science. *Langmuir* 1994; 10:1498-1511
- [40] Arrington D, Curry M, Street SC. Patterned thin films of polyamidoamine dendrimers formed using microcontact printing. *Langmuir* 2002; 18: 7788-7791.
- [41] Lange SA, Benes V, Kern DP, Hörber JKH, Bernard A. Microcontact printing of DNA Molecules. *Anal. Chem.* 2004; 76: 1641-1647.
- [42] Filipponi L, Livingston P, Kaspar O, Tokarova V. Protein patterning by microcontact printing using pyramidal PDMS stamps. *Biomed Microdevices* 2016; 18:9.
- [43] Kane RS, Takayama S, Ostuni E, Ingber DE, Whitesides GM. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999; 20: 2363-76.
- [44] Esch EW, Bahinski A, Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nature Rev Drug Discov.* 2015; 14: 248-260.
- [45] Maksud MI, Yusof MS, Mahadi M, Jamil A. (2013, Octubre) An investigation of parameter effect on microcontact printing and feasibility study for application in microelectronic and biomedical. Presentado en The 2013 Biomedical Engineering International Conference. Tailandia
- [46] Chen CS, Breslauer DN, Luna JI, Grimes A, Chin WC, Lee LP, Khine M. Shrinky-Dink microfluidics: 3D polystyrene chips. *Lab Chip* 2008; 8: 622-624.
- [47] Jiménez Zenteno, Alejandro Kayum; “Fabricación de microsistemas y máscaras de alta resolución con tecnología láser”, Tesis de Licenciatura, UNAM (2012)
- [48] Jiménez Díaz, Edgar; “Desarrollo de plataforma con microflujo para cultivo celular”, Tesis de Licenciatura, UNAM (2016)
- [49] Pérez Calixto, Daniel; “Fabricación y caracterización de guías de onda poliméricas para desarrollar microchips ópticos”, Tesis de Maestría, UNAM (2016)
- [50] Hautefeuille M, Jimenez-Zenteno AK, Pérez-Alcázar PR, Hess-Frieling KM, Fernandez-Sanchez G, Velazquez V, Grether-Gonzalez M, Lopez-Moreno E. Utilization of a digital-versatile-disc pickup head for benchtop laser microfabrication. *Applied Optics* 2012; 51: 1171-1177.

- [51] R. Zaouk, B. Y. Park and M. J. Madou., Introduction to Microfabrication Techniques in Microfluidic Techniques, Shelley D. Minter, ed. (Humana Press Inc, 2006).
- [52] Curtis A.S.G, Forrester J.V, McInnes C, and Lawriel F. Adhesion of Cells to Polystyrene Surfaces. *J Cell Biol* 1983; 97(5): 1500-1506.
- [53] Guo B, Li S, Song L, Yang M, Zhou W, et al. Plasma-treated polystyrene film that enhances binding efficiency for sensitive and label free protein biosensing. *App Surf Sci* 2015, 345: 379-386.
- [54] Ahmed I, Liu HY, Mamiya PC, Ponery AS, Babu AN, Weik T, Schindler M, Meiners S.. Three-dimensional nanofibrillar surfaces covalently modified with tenascin-C-derived peptides enhance neuronal growth in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006; 76(4): 851-60.
- [55] Leclerc E, Sakai Y and Fujii T. Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane), *Biomedical Microdevices* 2003, 5(2): 109-114.
- [56] Zhang Y,S. and Khademhosseini A. Advances in engineering hydrogels. *Science* 2017; 356(6337): eaaf3627.
- [57] Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32: 760-772.
- [58] D. J. Campbell, K. J. Beckman, C. E. Calderon, P. W. Doolan, R. H. Moore, A. B. Ellis, G. C. Lisensky. Replication and Compression of Bulk Surface Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer. *J. Chem. Educ* 1999; 76(4): 537.
- [59] Chuah YJ, Kuddannaya S, Lee MH, Zhang Y, Kang Y. The effects of poly(dimethylsiloxane) surface silanization on the mesenchymal stem cell fate. *Biomaterials science* 2015; 3: 383-390
- [60] Ma K, Rivera J, Hirasaki GJ, Biswal SL. Wettability control and patterning of PDMS using UV-ozone and water immersion. *Journal of Colloid and Interface Science* 2011; 363: 371-378
- [61] Efimenko K, Wallace WE, Genzer J. Surface modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl siloxane) networks by ultraviolet and ultraviolet/ozone treatment. *J. Colloid Interface Sci.* 2002; 254: 306-315.
- [62] Bodas D, Khan-Malek C. Formation of more stable hydrophilic surfaces of PDMS by plasma and chemical treatments. *Microelectronic Engineering.* 2006. 83: 1277-1279
- [63] Kuddanaya S, Chuah YJ, Lee MH, Menon NV, Kang Y, Zhang Y. Surface chemical modification of poly(dimethylsiloxane) for the enhanced adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013; 5: 9777-9784.
- [64] Harrison RG et al Observations of the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* 1907; 1: 116-128.
- [65] Astashkina A, Mann B, Grainger DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high throughput drug screening toxicity. *Pharmacol Ther* 2012; 134(1): 82-106.
- [66] Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103: 655-663.
- [67] Zhang, S.; Zhao, X.; Spirio, L. PuraMatrix: Self-assembling peptide nanofiber scaffolds. In: Ma, PX.; Elisseeff, J., editors. *Scaffolding in tissue engineering.* Boca Raton, FL: CRC Press; 2005. p. 217-238

- [68] Ashe HL, Briscoe J. The interpretation of morphogen gradients. *Development* 2006;133(3): 385–394.
- [69] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 2001, 294: 1708.
- [70] Abbott A. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature* 2003, 424: 870-872.
- [71] Dunn, J . C. Y., M. L. Yarmush, H. G. Koebe, and R. G. Tompkins . Hepatocyte function and extracellular matrix geometry : long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB* 1989; 3(2) : 174-177.
- [72] Dunn, J . C. Y., R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* 1991; 7(3): 237-245.
- [73] Luo Y, Engelmayr G, Auguste DT, da Silva Ferreira L, Karp JM, Saigal R, Langer R. 3D Scaffolds. en *Principles of Tissue engineering* editors Robert Langer, Joseph Vacanti, Robert Lanza. 4° edición Academic Press 2014 USA
- [74] http://www.um.es/eubacteria/Esferoides_Cultivos_3D_Eubacteria34.pdf
- [75] <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>
- [76] Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology* 2011; 21: 745-754.
- [77] Polini A, Prodanov L, Bhise NS, Manoharan V, Dokmeci MR, Khademhosseini A. Organs-on-a-chip: a new tool for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2014; 9: 335-52.
- [78] Zhang YS, Zhang YN, Zhang W. Cancer-on-a-chip systems at the frontier of nanomedicine. *Drug Discovery Today.* 2017; 22(9): 1392-1399.
- [79] <https://wyss.harvard.edu/fda-to-evaluate-organs-on-chips/>
- [80] <https://hubpages.com/education/How-are-drugs-developed-and-approved-The-drug-development-process>
- [81] Sun W, Chen YQ, Luo GA, Zhang M, Zhang HY, Wang YR, Hu P. Organs-on-chips and its applications. *Chin J Anal Chem.* 2016; 44: 533-541.
- [82] Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotech* 2014; 32: 760-772.
- [83] Ross MH, Gordon IK, Wojciech P. (2003) *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.* 4° edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- [84] Song Z, Gupta K, Ng IC, Xing J, Yang YA, Yu H. Mechanosensing in liver regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2017; 71: 153-167.
- [85] Tortora, G.J. y Derrickson B.H. *Principles of anatomy and physiology.* 12° ed, John Wiley & Sons: Danvers MA, 2013.
- [86] Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto M, Schachter D, Shafritz DA. *The liver: Biology and Pathology* 4° ed, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, 2001
- [87] Monga, Satdarshan, *Molecular pathology of liver diseases.* Springer: Pittsburg, PA, 2011

- [88] Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol*. 2002; 1:1
- [89] Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klaunig JE. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 2007; 96 (1): 2-15.
- [90] Bataller R, Brenner D. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest*. 2005; 115(2): 209-218.
- [91] Haschek WM, Rousseaux CG. *Fundamentals of toxicologic pathology*. Academic Press: Waltham, MA, 1997
- [92] Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003; 200: 504-515.
- [93] Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 1984; 51 : 57–74.
- [94] Bissel M, Caron JM, Babiss LE, Friedman S. Transcriptional regulation of the albumin gene in cultured rat hepatocytes: role of basement-membrane matrix. *Mol Biol Med* 1990; 7 : 187–197.
- [95] Gressner AM. Hepatic proteoglycans: a brief survey of their pathobiochemical implications. *Hepato-Gastroenterol* 1983; 30 : 225–229.
- [96] <http://www.eclinpath.com/chemistry/liver/liver-structure-and-function/liverlobule/>
- [97] Palakaan AA, Drummond R, Anderson RA, Greenhough S, Tv K, Hay DC, Ross JA. Polarisation and functional characterisation of hepatocytes derived from human embryonic and mesenchymal stem cells. *Biomedical reports* 2015; 3: 626-636.
- [98] Decaens C, Durand M, Grosse B, Cassio D. Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell* 2008; 100: 387-98.
- [99] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15: 178-196.
- [100] Brenes-Pino F, Brenes-Leñero E, Alfaro-Alcocer E. El valor de la inmunohistoquímica en el diagnóstico de carcinomas hepáticos primarios y secundarios. *Medicina Legal de Costa Rica* 2011; 28: 35-42.
- [101] Bonzo JA, Ferry CH, Matsubara T, Kim JH, Gonzalez FJ. Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4a in adult mice. *J Biol Chem* 2012; 287: 7345-7356.
- [102] Santangelo L, Merchetti A, Cicchini C, Conigliaro A, Conti B, Mancone C, Bonzo JA, Gonzalez FJ, Alonzi T, Amicone L, Tripodi M. The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4a. *Hepatology* 2011; 53: 2063-74.
- [103] Ihrke G, Neufeld EB, Meads T, Shanks MR, Cassio D, Laurent M, Schroer TA, Pagano RE, Hubbard AL. WIF-B cells: An in vitro model for studies of hepatocyte polarity. *J Cell Biol* 1993; 123: 1761-1775.
- [104] Calvisi DF, Ladu S, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS. Disregulation of E-cadherin in transgenic mouse models of liver cancer. *Lab Invest* 2004; 84: 1137- 1147.
- [105] Treyer A, Müsch A, Hepatocyte polarity. *Compr Physiol* 2013; 3: 243-287.

- [106] Stecca BA, Nardo B, Chieco P, Mazziotti, Bolondi L, Cavallari A. Aberrant dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/ CD26) expression in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27(2): 337-345.
- [107] Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nature Genetics* 2003; 34: 292-296.
- [108] Lee JS. Albumin for End-Stage liver disease. *Korean J Intern Med* 2012; 27: 13-19.
- [109] Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression of liver injury. *Int J Exp Path* 2006; 87: 343-359.
- [110] D.Voet, JG Voet, CW Pratt. (2007) *Fundamentos de Bioquímica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- [111] Chen Z, Tang N, Wang X, Chen Y. The activity of the carbamoyl phosphate synthase 1 promoter in human liver-derived cells is dependent on hepatocyte nuclear factor 3-beta. *J Cell Mol Med* 2017; 21(9): 2036-2045.
- [112] Cahan P, Li H, Morris SA, da Rocha EL, Daley GQ, Collins JJ. CellNet: Network Biology Applied to Stem Cell Engineering. *Cell* 2014; 158(4): 903-915.
- [113] Kim KP, Schöler HR. CellNet - Where your cells are standing. *Cell* 2014; 158: 699-701
- [114] Karp G. (2010) *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. 4^o edición, China: McGraw Hill.
- [115] Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2005; 118: 4325-4326
- [116] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1420-1428.
- [117] Mendez MG, Kojima SI, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility and adhesion during epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 2010; 24(6): 1838-1851.
- [118] Zeigerer A, Wuttke A, Marsico G, Seifert S, Kalaidzidis Y, Zerial M. Functional properties of hepatocytes in vitro are correlated with cell polarity maintenance. *Exp Cell Res* 2017; 350 (1): 242-252.
- [119] Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde I, Donato T. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2014; 10: 1553-1568.
- [120] Bhise NS, Manoharan V, Massa S, Tamayol A, Ghaderi M, Miscuglio M, Lang Q, Zhang YS, Shin SR, Calzone G, Annabi N, Shupe TD, Bishop CE, Atala A, Dokmeci MR, Khademhosseini A. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*. 2016; 8: 014101.
- [121] Cozzolino AM, Noce V, Battistelli C, Marchetti A, Grassi G, Cicchini C, Tripodi M, Amicone L. Modulating the substrate stiffness to manipulate differentiation of resident liver stem cells and to improve the differentiation state of hepatocytes. *Stem Cells International*. 2016; 2016:5481493.
- [122] McCarty WJ, Usta OB, Yarmush ML. A microfabricated platform for generating physiologically-relevant hepatocyte zonation. *Sci Rep*. 2016; 6: 26868

- [123] Hedge M, Jindal R, Bhushan A, Bale SS, McCarty WJ, Goldberg I, Usta OB, Yarmush ML. Dynamic interplay of flow and collagen stabilizes primary hepatocytes culture in a microfluidic platform. *Lab Chip*. 2014; 14: 2033-2039.
- [124] Ho C T, Lin R Z, Chang W Y, Chang H Y, Liu C H. Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab Chip*; 2006, 6(6): 724–734.
- [125] Lee PJ, Hung PJ, Lee LP. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnol Bioeng*. 2007; 97:1340-6.
- [126] Du Y, Li N, Yang H, Luo C, Gong Y, Tong C, Gao Y, Lü S, Long M. Mimicking liver sinusoidal structures and functions using a 3D-configured microfluidic chip. *Lab Chip*. 2017; 17(5): 782-794.
- [127] Yadav AR, Sriram R, Carter JA, Miller BL. Comparative study of solution phase and vapor phase deposition of aminosilanes on silicon dioxide surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 35: 283-290.
- [128] Kim K, Park SW, Yang SS. The optimization of PDMS-PMMA bonding process using silane primer. *BioChip J*. 2010; 4: 148-154.
- [129] Ren Y, Huang S, Mosser S, Heuschkel MO, Bertsch A, Fraering PC, Chen JJJ, Renaud P. A simple and reliable PDMS and SU-8 irreversible bonding method and its application on a microfluidic - MEA device for neuroscience research. *Micromachines*. 2015, 6; 1923-1934.
- [130] Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, Khademhosseini A. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. *Biomaterials* 2012; 33: 5230-5246
- [131] Yesildag C, Tyushina A, Lensen M. Nano-contact transfer with gold nanoparticles on PEG hydrogels and using wrinkled PDMS stamps. *Polymers* 2017; 9: 199
- [132] T.T. Chang and M. Hughes-Fulford. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Engineering* 2009; 15, 559
- [133] Ong SM, He L, Linh NTT, Tee YH, Arooz T, Tang G, Tan CH, Yu H. Transient inter-cellular polymeric linker. *Biomaterials* 2007; (28): 3656
- [134] Khetani SR, Bhatia SN. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nature Biotechnology*. 2008, 26: 120-126
- [135] Kurosawa H, Yasuda R, Osano Y, Amano Y. Adult rat hepatocytes cultured on an oxygen-permeable film increases the activity of albumin secretion. *Cytotechnology* 2001; (36):85-92
- [136] Späth GF, Weiss MC. Hepatocyte Nuclear Factor 4 provokes expression of epithelial marker genes acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J. Cell Biol* 1998; (140): 935-946.

APÉNDICE. PUBLICACIONES

- Primer autor en el artículo titulado “Fabrication of low-cost micropatterned polydimethylsiloxane scaffolds to organise cells in a variety of two-dimensional biomimetic arrangements for lab-on-chip culture platforms”, publicado en el Journal of Tissue Engineering el 30 de noviembre de 2017. Se anexa artículo completo.
- Coautora en el Conference Proceedings of SPIE (Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers) titulado “Progress on CD-DVD laser microfabrication method to develop cell culture scaffolds integrating biomimetic characteristics”. Evento: SPIE BiOS 2018, San Francisco CA, USA. Fecha de publicación: 19 de febrero de 2018. Se anexa abstract.
- Participación en la elaboración de procedimientos estandarizados del Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) para el Sistema de Gestión de Calidad.

Fabrication of low-cost micropatterned polydimethyl-siloxane scaffolds to organise cells in a variety of two-dimensional biomimetic arrangements for lab-on-chip culture platforms

Journal of Tissue Engineering
Volume 8 1–10
© The Author(s) 2017
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/2041731417741505
journals.sagepub.com/home/tej


Lidia Escutia-Guadarrama^{1,3}, Genaro Vázquez-Victorio^{1,3}, David Martínez-Pastor², Brenda Nieto-Rivera¹, Marcela Sosa-Garrocho², Marina Macías-Silva^{2,3} and Mathieu Hautefeuille^{1,3}

Abstract

We present the rapid-prototyping of type I collagen micropatterns on poly-dimethylsiloxane substrates for the biomimetic confinement of cells using the combination of a surface oxidation treatment and 3-aminopropyl triethoxysilane silanisation followed by glutaraldehyde crosslinking. The aim of surface treatment is to stabilise microcontact printing transfer of this natural extracellular matrix protein that usually wears out easily from poly-dimethylsiloxane, which is not suitable for biomimetic cell culture platforms and lab-on-chip applications. A low-cost CD-DVD laser was used to etch biomimetic micropatterns into acrylic sheets that were in turn replicated to poly-dimethylsiloxane slabs with the desired features. These stamps were finally inked with type I collagen for microcontact printing transfer on the culture substrates in a simple manner. Human hepatoma cells (HepG2) and rat primary hepatocytes, which do not adhere to bare poly-dimethylsiloxane, were successfully seeded and showed optimal adhesion and survival on simple protein micropatterns with a hepatic cord geometry in order to validate our technique. HepG2 cells also proliferated on the stamps. Soft and stiff poly-dimethylsiloxane layers were also tested to demonstrate that our cost-effective process is compatible with biomimetic organ-on-chip technology integrating tunable stiffness with a potential application to drug testing probes development where such cells are commonly used.

Keywords

Hepatocytes, microcontact printing, poly-dimethylsiloxane, cell patterning, cell proliferation

Date received: 10 August 2017; accepted: 18 October 2017

Introduction

Nowadays, biomimetic cell culture platforms are enabling a better manipulation of biological cell behaviour under *in vitro* or *in silico* study. Thanks to a finer technological control of increasingly complex synthetic microenvironments; it is now possible to imitate the native physicochemical properties that biological tissues undergo *in vivo* and hence guarantee a phenotype, organisation and function resembling that encountered in the native conditions. That makes possible to study the desired cells with greater fidelity on a biomimetic chip.¹

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

³Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Corresponding author:

Mathieu Hautefeuille, Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México.

Email: mathieu_h@ciencias.unam.mx



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access page (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

Indeed, in addition to well-studied molecular signaling, more recent considerations of how superficial mechanics, fluid dynamics and static three-dimensional (3D) microfeatures of host substrates are perceived by the cells have shown that the culture microenvironment has a direct correlation with phenotypic cues that are important to preserve when developing organ-on-chip devices or cell culture platforms for testing probes of drug metabolism or cytotoxicity for instance. The adhesion and viability of cells,² response to external stimuli,^{3,4} metabolism,⁵ growth⁶ and fate⁷ are some of the most critical examples of traits that are deeply affected by environmental parameters that need to and can be controlled by technology to progress in the development of biomimetic devices. One particular drawback of traditional static Petri dish culture is that it has a tendency to induce relatively rapid cell transdifferentiation of cells in primary culture that in turn limits its use in long-term studies as the cells evolve and diverge from their natural phenotype which is under study.⁸

One of the preferred materials to fabricate biomimetic cell culture platforms for studies of cell physiology and mechanobiology is poly-dimethylsiloxane (PDMS). Some of its well-known advantages for cell studies are its optical transparency, tunable mechanical properties,^{9,10} gas permeability, flexibility and non-toxicity when polymerisation is complete.¹¹ Thanks to its ease of use in microfabrication, and it is also an excellent candidate for cell culture inside microstructured lab-on-chip and organ-on-chip platforms.^{12,13} However, this silicone is a hydrophobic material and this represents a challenge for its application in long-term cell culture due to a poor cell adhesion leading to detachment or transdifferentiation.¹⁴ This lack of affinity for cells such as HepG2 hepatic cells (human hepatocellular carcinoma) is a limiting factor for PDMS as it affects the growth and organised confluence of the cells required for the obtention of the desired phenotype, for example, for the formation of organoids or drug testing platforms.¹⁵ In this case, the organisation and polarisation of cells in PDMS biomimetic microstructures is impossible without an adhesion promoter such as a protein present in the native surroundings of the cells (extracellular matrix) *in vivo*. Many efforts have thus been made in order to achieve a stable PDMS hydrophilic surface to improve cell adhesion. For example, a method in which PDMS is functionalised with aminosilane 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) and then crosslinked with glutaraldehyde (GA) has been reported,¹⁶ showing a reduction in contact angle with water characteristic of a hydrophilic surface ($\sim 70^\circ$). Furthermore, this method allows to covalently immobilise extracellular matrix proteins, stabilising them for a longer period of time and thus enhancing biomimetic design.

In addition to adhesion promoter and in order to allow for cell patterning on a chip, the protein coating has to be transferred in the form of a micropattern, as a means to guarantee a better-controlled arrangement of confluent

regions where cells organise themselves.¹⁷ One of the most common techniques to achieve a simple, rapid and cost-effective biomimetic cell patterning is microcontact printing (μ CP), useful for transferring structured protein features from a microstructured stamp onto a host substrate.¹⁸ Although the feasibility of μ CP on PDMS has been proven in previous reports,^{19–21} the obtention of the micropatterned stamps is not an easy task as it typically requires costly multi-step photolithographic methods, and the host substrates usually require preliminary chemical treatment, hence preventing the wide integration of μ CP patterns in polymeric lab-on-chip devices. Moreover, PDMS is not a very suitable material to undergo microcontact printing of extracellular matrix due to its high hydrophobicity. Although a recent work has demonstrated the use of fibronectin and laminin on this particular polymer for nerve and muscle cells,²² we have been unable to reproduce a complete, stable transfer of the most common extracellular matrix, type I collagen (COL I), on PDMS using this procedure without further treatment of the surface as COL I structure is more complex and hence less stable on PDMS for such applications.

In this work, we present a cost-effective technique to print stable, resistant micropatterns of COL I on PDMS previously treated with APTES-GA. After employing a low-cost, custom-made laser setup to fabricate microstructured poly-methyl methacrylate (PMMA) mould with the desired patterns in a single-step fashion,²³ rigid PDMS stamps were fabricated by soft lithography and then inked with COL I before transferring the patterns onto PDMS substrates treated with APTES-GA adapting previously reported procedures^{16,24} to our process. Our technique offers the possibility to design and fabricate protein patterns on PDMS chips that can resemble the organisation of cells in an *in vivo* environment and are easily integrable in lab-on-chip and organ-on-chip platforms. Human hepatoma HepG2 cell line was selected to validate our process as such cells do not adhere on PDMS without COL I.²⁵ Indeed, another important characteristic to pursue when biomimicry is sought to maintain a certain phenotype when cultured is a local planar²⁶ or 3D organisation of the cells that ensures conditions similar to that of the desired tissue source. It is of particular importance for naturally polarised cells, such as epithelia, subject to an epithelial–mesenchymal transition when cultured in a foreign environment, as it occurs with hepatocytes.²⁷ So far, hepatic spheroids have been used as 3D culture model for drug testing and toxicity studies.²⁸ However, there are several disadvantages in spheroid cultures such as oxygen gradients within the aggregates, the absence of vascularisation, uniformity in cell proliferation and lack of acquisition of any biomimetic environment.²⁹ Nakao and collaborators demonstrated that by confining primary hepatocytes in a thin linear space, they are arranged naturally in rows of one or

two neighbouring cells similar to the hepatic cords present in hepatic lobules. They showed that hepatocytes present a proper organisation with a greater level of biomimicry: enclosed inside a microfluidics channel allowing nutrients exchange made them even capable of producing bile canaliculi on a chip.³⁰ Unfortunately, the impact of cell attachment to extracellular matrix proteins or the influence of a substrate stiffness similar to liver tissue were not tested. The biomimetic geometry of the micropatterns was designed to organise a line of only a few cells alike the hepatic cord and study its impact on the cell viability, proliferation and organisation for further use in drug metabolism test probes, where a phenotype similar to that of an adult human hepatocyte is desired. Finally, after showing that our patterned scaffolds are useful to guarantee a cell behaviour more appropriate for lab-on-chip cell studies, as the biomimetic level increases, we report successful and very promising cell adhesion, viability and organisation of primary rat hepatocytes in an hepatic cord-type structure.

Materials and methods

PDMS host substrate preparation

As mentioned, PDMS is an ideal candidate to fabricate biomimetic cell culture platforms. In this work, it was used as a host substrate with a tunable stiffness for protein patterns transfer to validate our process aimed at organising biological cells on a microstructured biomimetic lab-on-chip platform. Sylgard 527 and Sylgard 184 (Dow Corning) were used for soft kPa-range and stiff MPa-range substrates, respectively, and glass was used as control. In case of the preparation of soft substrates, the prepolymer and the curing agent were mixed for 5 min in a 1:1 w/w ratio. Stiff substrates were prepared by mixing 10 parts of prepolymer with one part of the curing agent. Both mixtures were degassed under vacuum for 20 min, poured on the top of clean circular coverslips with a diameter of 18 mm and cured for 48 h at 60°C.

For protein immobilisation, PDMS substrates were silanised with APTES (440140; Sigma-Aldrich) followed by a treatment with GA (340855; Sigma-Aldrich), as can be seen in Figure 1. Some modifications were made to existing procedures^{16,24} as detailed in the following. A stock APTES solution was prepared by mixing 50% methanol, 47.5% APTES and 2.5% deionised water. It was stored for 1 h at 4°C. The working solution was prepared at the moment diluting the stock solution 1:500 in methanol (the concentration of this solution was 0.095%).

The surface of PDMS host substrates was exposed to ultraviolet light in the presence of ozone in a UV/Ozone ProCleaner (BioForce Nanosciences) for 15 min and then immersed in the APTES working solution for 2 h. At the end of incubation, the substrates were washed three times

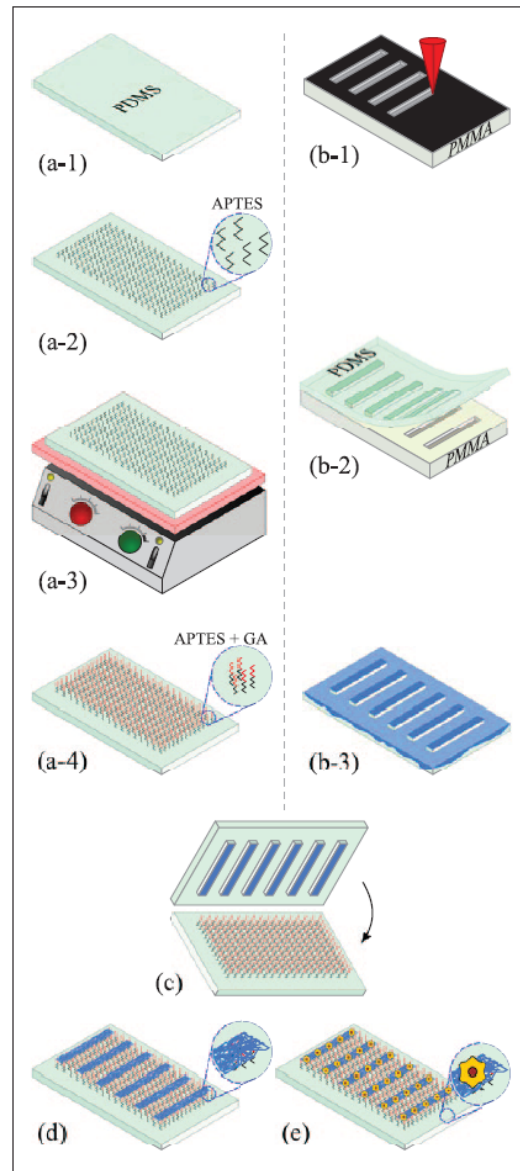


Figure 1. Fabrication process of micropatterned scaffolds: (a-1) soft and stiff PDMS host substrates were used; (a-2) surface chemical modification by silanisation with APTES; (a-3) thermal treatment on a hotplate at 110°C; (a-4) surface activation with GA; (b-1) laser-etching of a PMMA slide with the desired microstructures; (b-2) obtention of a stiff PDMS stamp by replica moulding; (b-3) incubation of the PDMS stamp with type I collagen; (c) microcontact printing onto the chemically modified PDMS host substrate; (d) generation of COL I micropatterns; and (e) culture and organisation of HepG2 cells or primary rat hepatocytes on COL I patterns.

with methanol and thermally baked on a hotplate at 110°C for 30 min. The last step of the surface modification was the immersion of the substrates in a 2.5% GA aqueous solution for 1 h. After removing the solution, substrates were rinsed three times with deionised water.

Micromould fabrication

The micromoulds used in this work for microcontact-printing of collagen on PDMS were fabricated using a simple, direct laser ablation technique based on previous work that manages to avoid costly photolithographic steps and materials with a similar pixel resolution of 4 µm.^{23,31} Clean PMMA sheets were etched locally using this procedure to fabricate 17-µm-deep design-specific features with controlled width, pitch and length in a rapid-prototyping fashion, following the procedure reported in López-Aparicio et al.²³ and as shown in Figure 1(b-1). The moulds were characterised after etching by profilometry (KLA Tencor D600) to verify the structural integrity and geometry of the microstructures before replicating on PDMS microstamps (see Supplementary Data). As said, although any desired pattern with different dimensions may be transferred using our low-cost technique, as reported in López-Aparicio et al.,²³ only straight lines imitating hepatic cords were fabricated in this work to study how the confinement of hepatic cells in such COL I features promoting adhesion on PDMS induce a phenotype that is suitable for drug testing and organ-on-chip platforms.

Microcontact printing

Stamps for microcontact printing are routinely fabricated of PDMS Sylgard 184 in a 10:1 w/w proportion of prepolymer and curing agent. Indeed, rigid structures are desired for better pattern transfer of the ink in microcontact printing.^{32,33} After preparing the liquid polymer following the procedure used to construct the stiff substrates, the material was poured on the micromoulds and cured at 60°C for 48 h. Such temperature did not affect or deform the moulds and ensure a perfect replication of the features on the stamps. The PDMS stamps were peeled from the micromoulds and cut with a scalpel.

The stamps were placed in a UV/Ozone Procleaner for 15 min in order to oxidise its surface and increase its hydrophilicity. Then, a COL I solution (BD Biosciences) was prepared at a concentration of 0.1 mg/mL for HepG2 cells and 1 mg/mL for primary rat hepatocytes, using acetic acid 20 mM to dissolve collagen. The surface of the stamp was covered with a drop of 50 µL of this solution and incubated for 10 min at room temperature (RT). After the protein solution was aspirated, the stamps were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and air-dried.

Finally, the stamps were placed on the substrates and pressed for 5 min with a 20 g weight. Stamps were then

rinsed three times with PBS solution and sterilised by soaking in sterilised PBS and exposed to UV light for 30 min.

Characterisation of PDMS substrates

PDMS stiffness. PDMS micromechanical properties were characterised by a Micromechanical Testing and Assembly System FT-MTA-02 (FemtoTools). By indenting a 50 µm sphere into the PDMS slabs and measuring force against indentation distance, it was possible to evaluate Young's moduli of the substrates used in this work using the Hertz model. Stiff PDMS presented Young's modulus of 1–2 MPa, while soft PDMS layers showed a 12–13 kPa modulus. The measurements were very consistent at different positions on each sample and from run to run; more than five different runs were used to calculate the average values reported here.

Characterisation of microstamps. Microstamps were obtained by a conventional replica-moulding technique of the microstructured acrylic moulds using Sylgard 184. Moulds were characterised using a profilometer to measure an average depth of 17 µm for the microstructures. The stamps were characterised by optical microscopy (Figure 2) and with the same profilometry technique, confirming the correct and accurate replication of the patterns etched in PMMA onto the PDMS stamps. As said, Alexa594 fluorescence assays were used to finally verify the transfer of micropatterns on the substrates (Figure 2(c)).

HepG2 and rat hepatocyte primary cultures

HepG2 cell line was maintained in modified essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) plus sodium pyruvate and antibiotics (penicillin/streptomycin). Hepatocytes were isolated from livers of male Wistar rats approximately 200–250 g of weight. Animals were maintained on an ad libitum diet and handled according to internal institutional guidelines and ethical agreements (Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México) for animal experimentation. Rat hepatocytes were isolated using the modified collagenase perfusion method from Berry and Friend as previously described in Caligaris et al.³⁴ After digestion, hepatocytes were separated by centrifugation at 400 r/min for 2 min from non-parenchymal cells, and viable hepatocytes were isolated by iso-density percoll centrifugation (Amersham-GE Life Science). Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion staining. For primary culture, hepatocytes were seeded on coverslips coated with PDMS and treated with 1 mg/mL rat tail collagen type 1 (BD Biosciences), and cells were cultured for 4 h at 37°C in attachment medium supplemented with 10% FBS and antibiotics. Then, media was changed for feeding medium (FBS-free) and hepatocytes were cultured for 24 h for further studies.

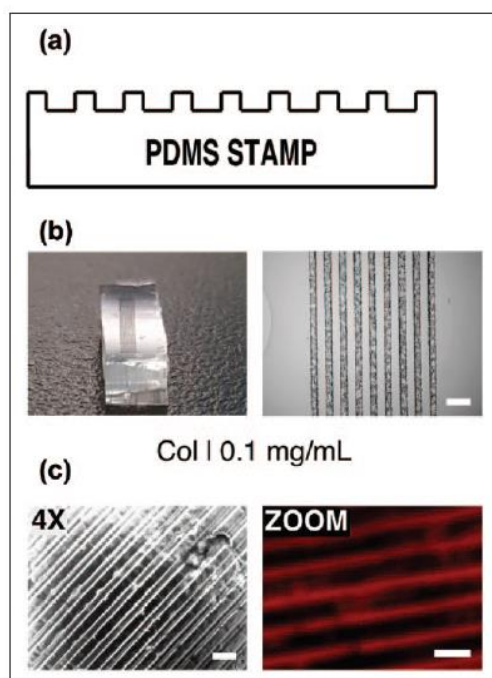


Figure 2. Details of microstructured PDMS stamps for microcontact printing: (a) diagram of the transversal section of a PDMS stamp showing the microstructure; (b) example of a stamp cutted in $0.5\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ and with an array of lines with a $80\text{ }\mu\text{m}$ width and with $80\text{ }\mu\text{m}$ spacing (scale = $200\text{ }\mu\text{m}$); and (c) micropatterns of type I collagen (COL I) deposited onto soft PDMS surface. (Left: objective $4\times$ micrograph (Nomarski); right: ZOOM micrograph of anti-collagen type I immunofluorescence (red). Scale = $200\text{ }\mu\text{m}$.)

HepG2 cell transfection. HepG2 cell line, stably overexpressing mTurquoise2-coupled LifeAct, was generated by transfecting $5\text{ }\mu\text{g}$ of LifeAct-mTurquoise2 plasmid with $10\text{ }\mu\text{L}$ of Lipofectamine[®] 2000 as manufacturer describes (Invitrogen); the plasmid No. 36201 was obtained from Addgene (Goedhart et al., 2012). After 48 h post-transfection, cells were treated with $900\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ of Geneticin[®] (G418) from GIBCO for stable cell selection. LifeAct-mTurquoise2 stable expression was analysed by confocal microscopy as previously reported.³⁵

Fluorescence microscopy

HepG2 cells and rat hepatocytes were seeded on collagen-treated glass or PDMS-coated coverslips in 12-well tissue culture plates and cultured at different days as indicated. Glass was used as a GPa-range rigid control substrate commonly used in HepG2 culture and ideal for immunofluorescence assays. Those assays were performed as described in Vázquez-Victorio et al.³⁵ Cells were fixed for

15 min with 4% paraformaldehyde in PBS at 37°C . Cells were permeabilised with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min at RT and blocked with bovine albumin fraction V at 1% in PBS for 30 min. F-actin was stained with Alexa Fluor 594-coupled Phalloidin (Molecular probes, ThermoFisher), diluted 1:40. Actin-cytoskeleton dynamics was studied using two different approaches that stain actin filaments: (1) Phalloidin-coupled Alexa Fluor 594 and (2) LifeAct coupled to mTurquoise2 fluorescent protein. Cells were seeded on collagen-treated glass or PDMS-coated coverslips in 12-well tissue culture plates. Samples were mounted in glass coverslips ($24 \times 50\text{ mm}$) using either VECTASHIELD mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories) or staining nuclei with DAPI at 1:200 (Invitrogen) in PBS for 10 min and samples were mounted with Mowiol (Calbiochem) at RT. Cells were visualised in Zeiss LSM 800 Airyscan confocal microscope. Leica TCS SP8 confocal microscope and Olympus epifluorescence microscope IX71 were also used for image acquisition. ImageJ free software was used for imaging processing and analysis. For immunofluorescence, samples were incubated with 10% horse serum (HS) in PBS for 1 h at RT. Goat anti-COL 1 (1:100; SC-59772), goat anti-HNF4- α (SC-6556; 1:100) and goat anti-Albumin (SC-46293; 1:100) primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were incubated in 10% HS PBS for 12 h at 4°C , and coverslips were incubated with anti-goat secondary antibody coupled to Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch), diluted 1:500 for 1 h at RT. Anti-COL 1 was used to verify the proper transfer of COL I on the different substrates. Hepatocyte Nuclear Factor 4- α (HNF4- α) and albumin were used as specific biomarkers of hepatic phenotype and function in rat hepatocytes.

Cell adhesion, viability and proliferation

HepG2 cells and rat hepatocytes were seeded on collagen type I (#354236; Corning) treated glass or PDMS-coated coverslips in 12-well tissue culture plates. HepG2 cells were seeded at low density (1×10^5 cells per well) and cultured for 4 or 48 h. After culture, cells were incubated with $1\text{ }\mu\text{M}$ Calcein AM (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) and $5\text{ }\mu\text{M}$ propidium iodide (PI; P4170; Sigma) for 15 min in fresh medium at 37°C .³⁶ Then, live and dead cells were visualised by epifluorescence or confocal microscopy, and images were processed and analysed in ImageJ software. Likewise, rat hepatocytes adhesion and viability were analysed after 24 h of culture.

Western blot

Confluent cells were lysed using radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid

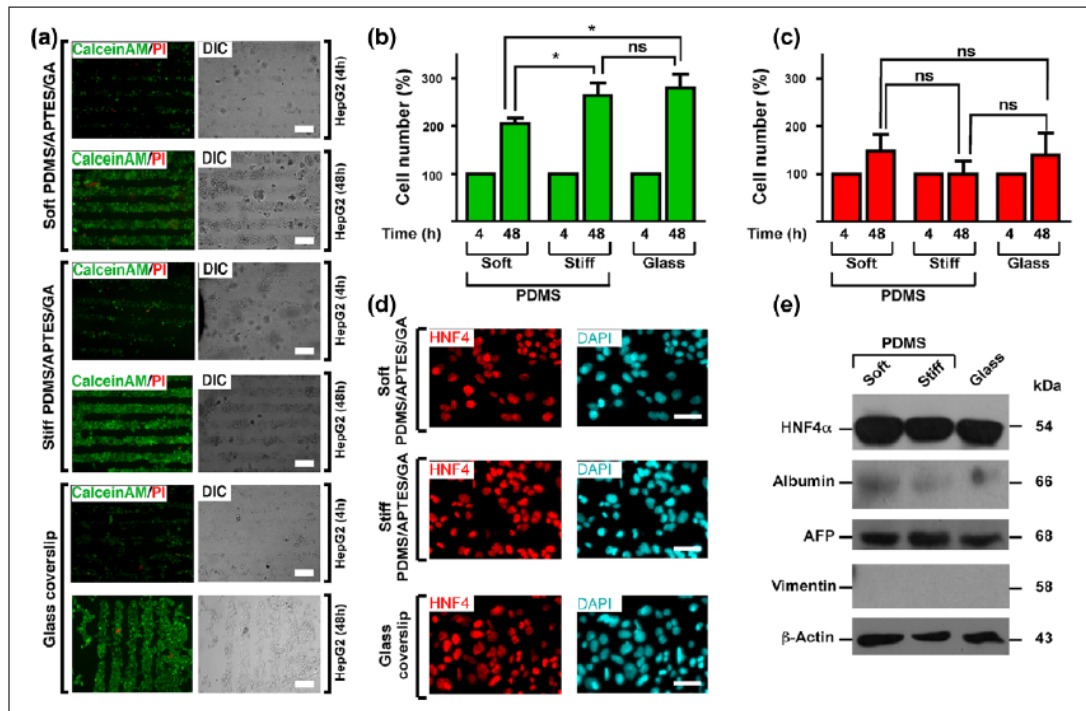


Figure 3. High adhesion, viability and proliferation of HepG2 cells confined on stiff- and soft-PDMS/APTES/GA scaffolds patterned with COL I in lines: (a) HepG2 cell adhesion, viability and proliferation were evaluated by calcein AM/PI assay. HepG2 cells were seeded at low density (1×10^5 cells per well) on glass, stiff- and soft-PDMS/APTES scaffolds patterned by microcontact printing with collagen type I micropatterns. Live cells were stained with calcein AM (green) and dead cells were stained with propidium iodide (PI; red). Epifluorescence microscopy images were acquired 4 and 48 h after cell culture. Cells were visualised by differential interference contrast microscopy (DIC). Scale bars = 200 μ m; (b and c) Viable and dead cells were presented as cell number percentage based on cell occupancy area for calcein (live cells/green bars) and PI (dead cells/red bars). Data are represented as mean \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.0318$ (soft vs stiff, viable cells), * $p < 0.0201$ (soft vs glass, viable cells) and ns = not significant (stiff vs glass and in every condition on dead cells). (d) HepG2 cells were seeded at low density (1×10^5 cells per well) for 24 h on glass, stiff- and soft-PDMS/APTES scaffolds coated with 0.1 mg/mL COL I. Epifluorescence microscopy images show that HNF4- α marker exhibited a nuclear localisation. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars = 50 μ m. (e) Expression levels of protein makers of phenotype and function in primary hepatocytes and HepG2. Total extracts of freshly isolated hepatocytes and hepatocytes cultured for 24 h and 7 days were analysed, as well as HepG2 cells cultured for 24 h on soft PDMS, stiff PDMS and glass. Vimentin, albumin, AFP and HNF4 were detected by western blot. Molecular weights of each protein are indicated in kilodalton.

(EDTA), 1% Nonidet-P40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS)) plus protease and phosphatase inhibitors and incubated 1 h at 4°C. Cell extracts were quantified by Bradford protein assay (#5000006; Bio-Rad) and normalised before loading in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After resolving, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and it was incubated in blocking solution (5% of fat-free milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 0.1%) for 1 h at RT, and primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Later, membrane was washed and incubated by secondary antibodies in blocking solution for 1 h in RT. Proteins were detected by Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore).

Statistical analysis

Student's t-test was used to calculate statistical significance, and $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

HepG2 cell adhesion, viability and proliferation

HepG2 cells were cultured on COL I micropatterns for 4 and 48 h. Cell viability was analysed by Calcein AM/propidium iodide assays. As we expected, HepG2 cells adhered exclusively on the COL I patterns and showed high cell viability after 4 and 48 h of culture (Figure 3(a)). Interestingly, HepG2 cells proliferated on the collagen micropatterns and were confined to the COL I

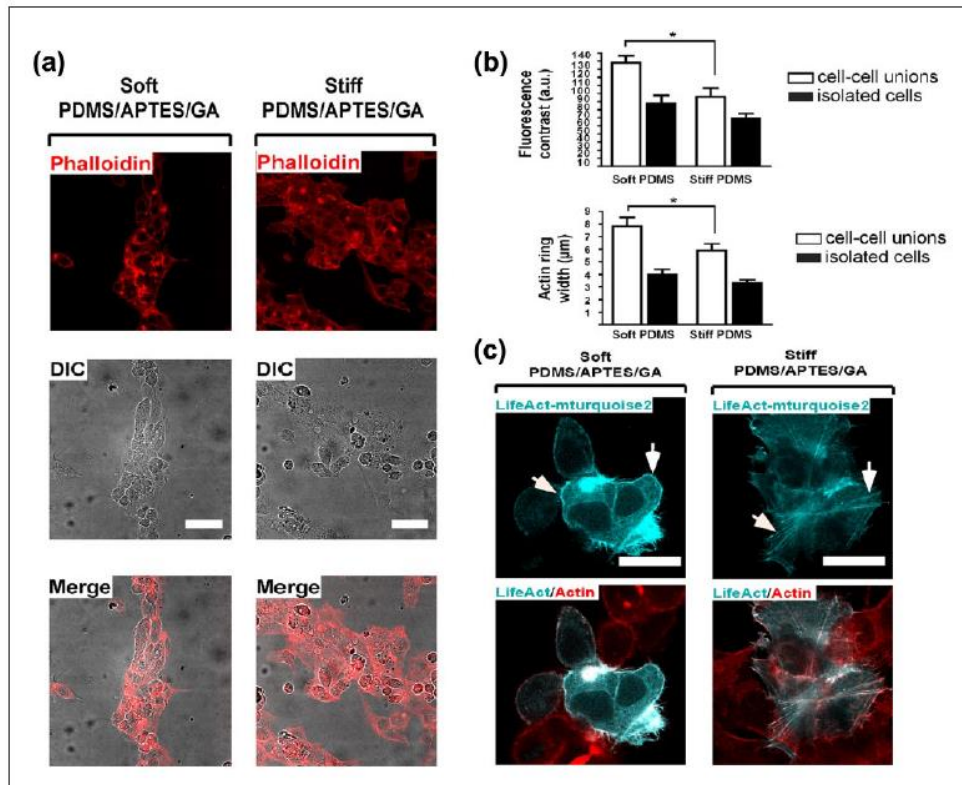


Figure 4. HepG2 cells confined on soft-PDMS/APTES/GA rather than on stiff scaffolds patterned with COL I in lines exhibit a greater cortical actin arrangement. (a) Actin filaments were observed with Alexa594-coupled phalloidin in HepG2 cells. Cells were seeded at high density on stiff- and soft-PDMS/APTES scaffolds patterned by microcontact-printing with type I collagen in micropatterns. Differential interference contrast (DIC) and confocal microscopy images were acquired 48 h after cell culture. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars = 50 μm . (b) Relative F-actin levels were measured as fluorescence contrast (a.u. = arbitrary units) and cortical actin ring width (μm). Data are represented as mean \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.021$ (cell–cell unions, contrast) and ** $p < 0.008$ (cell–cell unions, width). (c) HepG2 cells were seeded at low density (1×10^5 cells per well) for 24 h on stiff- and soft-PDMS/APTES scaffolds coated with 0.1 mg/mL COL I. F-actin was stained with Alexa594-coupled phalloidin (red) and LifeAct-mTurquoise2 (cyan). Scale bars = 30 μm .

stamps even when cells reached confluence (Figure 3(a)). Moreover, as can be observed from calcein levels in Figure 3(b), HepG2 cells seem to have a higher proliferation rate as the substrates grow stiffer and diverge from natural conditions (a few kPa). HepG2 cell monolayers cultured on collagen-treated glass or PDMS-coated coverslips showed nuclear HNF4- α staining (Figure 3(c)).

Fluorescence labelling of actin cytoskeleton

Confluent HepG2 cells were cultured on collagen stamps and the organisation of actin filaments was observed by Alexa Fluor 594-coupled phalloidin. Surprisingly, HepG2 cells cultured on collagen micropatterns on soft PDMS exhibited a greater cortical actin arrangement than cells

cultured on stiff PDMS (as seen in Figure 4(a)). The width of the F-actin ring and its density, demonstrated in this case by fluorescence intensity contrast between the ring and the interior of the cells (Figure 4(b)), indeed shows a clear difference between soft and stiff PDMS for HepG2 culture on the microcontact-printed COL I stamps. A comparative analysis of F-actin staining with phalloidin and LifeAct showed that both methods detected a greater cortical actin layer on HepG2 cells cultured on soft PDMS (Figure 4(c)).

Primary rat hepatocytes cultured on micropatterned collagen

Here, primary rat hepatocytes were also cultured on similar platforms to those used for HepG2 cells in order

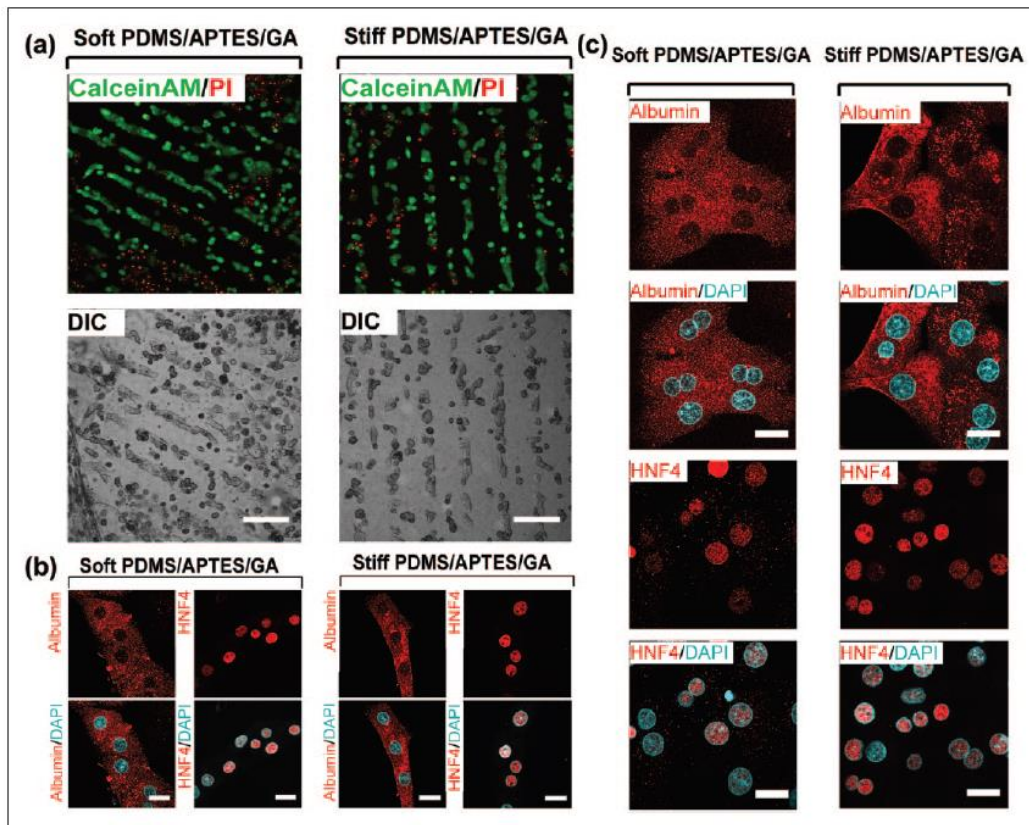


Figure 5. Confinement of primary hepatocytes cultured on stiff- and soft-PDMS/APTES/GA scaffolds patterned with COL I in lines. (a) Freshly isolated rat hepatocytes were seeded at high density (2×10^5 cells per well) on stiff- and soft-PDMS/APTES/GA scaffolds patterned by microcontact printing with type I collagen micropatterns. Primary rat hepatocytes viability was evaluated by calcein AM/PI assay. Live cells are shown in green and dead cells are shown in red. Differential interference contrast (DIC) and confocal microscopy images were acquired 24 h after cell culture. Scale bars = 100 μ m. (b) Albumin (cytosol) and HNF4- α (nucleus) specific markers were expressed in primary rat hepatocytes cultured for 24 h at high density (2×10^5 cells per well) on stiff- and soft-PDMS/APTES/GA scaffolds patterned with 1 mg/mL COL I in lines. Scale bars = 20 μ m. (c) Primary rat hepatocytes were cultured for 24 h at high density (2×10^5 cells per well) on stiff- and soft-PDMS/APTES/GA scaffolds coated with 1 mg/mL type I collagen. Confocal microscopy images show subcellular localisation of albumin (cytoplasm) and HNF4- α (nucleus) specific biomarkers of primary cultured hepatocytes. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars = 20 μ m.

to analyse cellular viability and organisation caused by confinement and stiffness. As can be seen in Figure 5(a) and (b), after 24 h of culture, hepatocytes showed high viability; intriguingly, hepatocytes were selectively attached to collagen micropatterns, promoting their confinement and organisation with an architecture that resemble a hepatic cord-like shape. Primary hepatocytes cultured on collagen-treated PDMS-coated coverslips showed cytoplasmic albumin and nuclear HNF4- α staining (Figure 5(b)). Figure 5(c) presents results of HNF4 and albumin on primary hepatocytes without any pattern as a control to validate that these cells present those hepatic markers.

Discussion

Characterisation of cell culture on collagen microstamps

Cell viability and proliferation. Because of many limitations in the use of isolated human hepatocytes, several hepatic cell lines are used as alternative models to study hepatocyte functions. Hepatoma cell lines such as HepG2 are used to study human hepatocyte functions as they still exhibit epithelial features; intriguingly, confluent HepG2 cells rather than sparse cells enhance many of their hepatic metabolic functions.³⁷ Our results suggest that it is possible to control

hepatic cell proliferation on PDMS by tuning its stiffness, and it is very important to maintain this tendency on printed COL I micropatterns for organ-on-chip development.

Actin-cytoskeleton organisation in collagen stamps. Confluent HepG2 cells show cortical actin filaments along with cell–cell interactions when they reach confluence.^{37,38} We decided to study the influence of stiffness on actin-cytoskeleton organisation of HepG2 cells cultured on collagen micropatterns on PDMS in order to validate the compatibility of our process with organ-on-chip development. It is well known that substrate stiffness controls actin-cytoskeleton dynamics of hepatocytes, modifying their phenotype and functions.³⁹ Actin-cytoskeleton arrangement observed in HepG2 cells cultured on soft and rigid PDMS-treated substrates supports that the substrates' mechanical properties have differential effects on cell organisation and very likely on the rates of cell proliferation. Indeed, the assembly of cortical actin was promoted in HepG2 cells confined on soft substrates micropatterned with Col I, suggesting that the stiffness of soft PDMS seeks to resemble that of the native hepatic tissue, proving that biomimicry is critical for culturing cells.

Primary hepatocyte alignment on collagen micropatterns. It is well known that primary hepatocytes modify their phenotype during long-term culture (5–7 days), and these changes can be stopped or delayed by culturing hepatocytes in a collagen sandwich or with chemical treatments.⁴⁰ Dedifferentiation of primary hepatocytes is promoted by long-term culture, which initiates with changes on cell cytoskeleton rearrangements, mainly in actin cytoskeleton.²⁶ To the best of our knowledge, the influence of micropatterns of this particular extracellular matrix proteins on PDMS has not been tested in primary hepatocytes, although it is a very useful feature for lab-on-chip and organ-on-chip platform development. The obtained results demonstrate that our low-cost collagen microstamp transfer technique allows for the culture of primary hepatocytes in a cord-like shape on stiff and soft PDMS. This is very important to control hepatocytes phenotype by modulating actin-cytoskeleton organisation not only by stiffness tuning.⁹ Further studies are needed to clarify the effect of both PDMS stiffness and micropattern on primary hepatocyte phenotype. The hepatocytes' confinement to collagen lines also would allow coculturing with other hepatic cells that are able to adhere to bare PDMS, such as fibroblasts.

Conclusion

We have presented a low-cost custom-made laser method to fabricate microstructured PDMS stamps for microcontact printing and shown its efficiency to transfer COL I, a natural extracellular matrix protein required for hepatic cell adhesion on PDMS with a precise geometric control. Thanks to the control offered by the laser technique,²³ and the geometry and dimensions of patterns can be tuned to

construct the microarchitecture of different tissues. Simple thin lines imitating hepatic cord patterns allowed to confine and organise HepG2 and primary rat hepatocytes. They were successfully deposited on different stiffness, enabling a greater level of biomimicry on chip, as required in modern cell culture platforms. It is a technique that is also compatible with 3D PDMS scaffolds and organ-on-chip devices integrating microfluidics as it offers a very resistant and stable union of COL I on PDMS.⁴¹ Moreover, as suggested by other works,^{10,16} this method can be naturally adapted to study other cell types besides hepatocytes.

Acknowledgements

G.V.-V., M.M.-S. and M.H. contributed equally as senior authors and correspondents to this work.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

Funding

This project has received financial support from CONACyT (projects 246988 and 280317), DGAPA-PAPIIT (TA100315 and IT102017). Authors would like to thank Aarón Cruz Ramírez for the fabrication of the moulds, Diego Zamarrón Hernández for profilometry, Jehú López-Aparicio for technical support, José Alfredo Jiménez Medina for his help with confocal microscopy and Fernando García Hernández (Unidad de Imagenología, IFC). This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Materials Science and Engineering at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); Escutia-Guadarrama L. acknowledges the scholarship provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 353349).

References

1. Sun W, Chen YQ, Luo GA, et al. Organs-on-chips and its applications. *Chinese J Anal Chem* 2016; 44: 533–541.
2. Wells R. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* 2008; 47: 1394–1400.
3. Kamble H, Barton MJ, Jun M, et al. Cell stretching devices as research tools: engineering and biological considerations. *Lab Chip* 2016; 16: 3193–3203.
4. Ho CT, Lin RZ, Chen RJ, et al. Liver-cell patterning lab chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue. *Lab Chip* 2013; 13: 3578–3587.
5. Choe A, Ha SK, Choi I, et al. Microfluidic gut-liver chip for reproducing the first pass metabolism. *Biomed Microdevices* 2017; 19: 4.
6. Jayaraj V, Wangikar PP and Jadhav SS. Microfluidic device optimization for cell growth. In: *IEEE 5Th International Nanoelectronics Conference*, Singapore, 2–4 June 2013. New York: IEEE.
7. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G110–G118.
8. Godoy P, Schmidt-Heck W, Natarajan K, et al. Gene networks and transcription factor motifs defining the differentiation of

- stem cells into hepatocyte-like cells. *J Hepatology* 2015; 63: 934–942.
9. Cozzolino AM, Noce V, Battistelli C, et al. Modulating the substrate stiffness to manipulate differentiation of resident liver stem cells and to improve the differentiation state of hepatocytes. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 5481493.
 10. Natarajan V, Berglund EJ, Chen DX, et al. Substrate stiffness regulates primary hepatocyte functions. *RSC Adv* 2015; 5: 80956–80966.
 11. Regehr KJ, Domenech M, Koepsel JT, et al. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab Chip* 2009; 9: 2132–2139.
 12. Huh D, Torisawa Y, Hamilton GA, et al. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip* 2012; 12: 2156–2164.
 13. Bhatia SN and Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 760–772.
 14. Chuah YJ, Koh YT, Lim K, et al. Simple surface engineering of polydimethylsiloxane with polydopamine for stabilized mesenchymal stem cell adhesion and multipotency. *Sci Rep* 2015; 5: 18162.
 15. Murray LM, Nock V, Evans JJ, et al. The use of substrate materials and topography to modify growth patterns and rates of differentiation of muscle cells. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104: 1638–1645.
 16. Kuddannaya S, Chuah YJ, Lee MHA, et al. Surface chemical modification of poly(dimethylsiloxane) for the enhanced adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013; 5: 9777–9784.
 17. Tamura T, Sakai Y and Nakasawa K. Two-dimensional microarray of HepG2 spheroids using collagen/polyethylene glycol micropatterned chip. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 2071–2077.
 18. Ruiz SA and Chen CS. Microcontact printing: a tool to pattern. *Soft Matter* 2007; 3: 168–177.
 19. Bernard A, Delamarche E, Schmid H, et al. Printing patterns of proteins. *Langmuir* 1998; 14: 2225–2229.
 20. Brock A, Chang E, Ho CC, et al. Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir* 2003; 19: 1611–1617.
 21. Ricoult SG, Nezhad AS, Knapp-Mohammady M, et al. Humidified microcontact printing of proteins: universal patterning of proteins on both low and high energy surfaces. *Langmuir* 2014; 30: 12002–12010.
 22. Palchesko RN, Zhang L, Sun Y, et al. Development of polydimethylsiloxane substrates with tunable elastic modulus to study cell mechanobiology in muscle and nerve. *PLoS ONE* 2012; 7: e51499.
 23. López-Aparicio J, Hautefeuille M, Herrera-Domínguez S, et al. Use of a CD laser pickup head to fabricate microelectrodes in polymethylmethacrylate substrates for biosensing applications. *Biomed Microdevices* 2017; 19: 5.
 24. Yadav AR, Sriram R, Carter JA, et al. Comparative study of solution-phase and vapor-phase deposition of aminosilanes on silicon dioxide surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 35: 283–290.
 25. Van Midwoud PM, Janse A, Merema MT, et al. Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Anal Chem* 2012; 84: 3938–3944.
 26. Sung JH and Shuler ML. Microtechnology for mimicking in vivo tissue environment. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 1289–1300.
 27. Alépée N, Bahinski A, Daneshian M, et al. State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology. *ALTEX* 2014; 31: 441–447.
 28. Ramaiahgari SC, den Braver MW, Herpers B, et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol* 2014; 88: 1083–1095.
 29. Katt ME, Placone AL, Wong AD, et al. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front Bioeng Biotechnol* 2016; 4: 12.
 30. Nakao Y, Kimura H, Sakai Y, et al. Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device. *Biomicrofluidics* 2011; 5: 022212.
 31. Hautefeuille M, Cabriaes L, Pimentel-Domínguez R, et al. New perspectives for direct PDMS microfabrication using a CD-DVD laser. *Lab Chip* 2013; 13: 4848–4854.
 32. Kaufmann T and Ravoo B. Stamps, inks and substrates: polymers in microcontact printing. *Polym Chem* 2010; 1: 371–544.
 33. Huang YY, Zhou W, Hsia KJ, et al. Stamp collapse in soft lithography. *Langmuir* 2005; 21: 8058–8068.
 34. Caligaris C, Vázquez-Victorio G, Sosa-Garrocho M, et al. Actin-cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850: 1832–1841.
 35. Vázquez-Victorio G, González-Espinosa C, Espinosa-Riquer ZP, et al. GPCRs and actin-cytoskeleton dynamics. *Methods Cell Biol* 2016; 132: 165–188.
 36. Haugland RP, MacCoubrey IC and Moore PL. *Dual-fluorescence cell viability assay using ethidium homodimer and calcein AM*. US5314805 Patent, 1994.
 37. Chang TT and Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 559–567.
 38. Ong S-M, He L, Linh NTT, et al. Transient inter-cellular polymeric linker. *Biomaterials* 2007; 28: 3656–3667.
 39. Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2011; 53: 1192–1205.
 40. Ezzell RM, Toner M, Hendricks K, et al. Effect of collagen gel configuration on the cytoskeleton in cultured rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1993; 208: 442–452.
 41. Chuah YJ, Kuddannaya S, Lee MHA, et al. The effects of poly(dimethylsiloxane) surface silanization on the mesenchymal stem cell fate. *Biomater Sci* 2015; 3: 383–390.

Progress on CD-DVD laser microfabrication method to develop cell culture scaffolds integrating biomimetic characteristics

Mathieu Hautefeuille^{1,2*}, Genaro Vázquez-Victorio^{1,2}, Aarón Cruz-Ramírez^{1,2}, Lucía Cabriales^{1,2}, Edgar Jiménez-Díaz^{1,2}, Lidia Escutia-Guadarrama^{1,2}, Jehú López-Aparicio^{1,2}, Daniel Pérez-Calixto^{1,2}, Mariel Cano-Jorge^{1,2}, Brenda Nieto Rivera¹, Raúl Sánchez-Olvera^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, CP 04500, Ciudad de México, México.

² Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia *LaNSBioDyT*, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, CP 04500, Ciudad de México, México.

ABSTRACT

The development of organ-on-chip and biological scaffolds is currently requiring simpler methods to microstructure biocompatible materials in three dimensions, fabricate structural and functional elements in biomaterials or modify the physicochemical properties of desired substrates. With the aim of creating simple, cost-effective alternatives to conventional existing techniques to produce such platforms with very specific properties, a low-power CD-DVD laser pickup head was recycled and mounted on a programmable three-axis micro-displacement system in order to modify the surface of polymeric materials in a local fashion. Thanks to a specially-designed method using a strongly absorbing additive coating the materials of interest, it has been possible to establish and precisely control processes useful in microtechnology for biomedical applications and normally restricted to much less affordable high-power lasers. In this work, we present our latest progress regarding the application of our fabrication technique to the development of organ-on-chip platforms thanks to the simple integration of several biomimetic characteristics typically achieved with traditional, less cost-effective microtechnology methods in one step or through replica-molding. Our straightforward approach indeed enables great control of local laser microablation for true on-demand biomimetic micropatterned designs in several transparent polymers and hydrogels of tunable stiffness and is allowing integration of microfluidics, microelectronics, optical waveguides, surface microstructuring and even transfer of superficial protein micropatterns on a variety of biocompatible materials. The results presented here were validated using hepatic and fibroblasts cell lines to demonstrate the viability of our procedure for organ-on-chip development and show the impact of such features in cell culture.

Keywords: organ-on-chip, laser, microfabrication, biomimetism