



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE MICRODISPOSITIVOS PARA CULTIVO CELULAR

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MIGUEL ANGEL OLMEDO SUÁREZ

**DRA. MARIA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**



Ciudad de México,

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Artículo Publicado.

Olmedo-Suárez, M.Á.; Sekiguchi, T.; Takano, A.; Cañizares-Macías, M.P.; Futai, N. Integrated On-Chip 3D Vascular Network Culture under Hypoxia. *Micromachines* **2020**, *11*, 475.

Artículo en revisión

Olmedo-Suárez, M.Á.; Pedraza-Chaverri, J.; Medina-Campos O.N; Cañizares-Macías, M.P. Evaluation of the antioxidant capacity, cytotoxicity, and cytoprotective of vanilla extracts and vanillin in the LLC-PK1 cell line.

Congresos.

- **Lab on a Chip and Microfluidics World Congress 2018.** San Diego California. Tema: Culture of LLC-PK1 cells in microfluidic devices and cell viability evaluation with neutral red and MTT assays Modalidad: Poster. Octubre 1-3, 2018
- **Simposio Anual LaNSBioDyT 2018:** Mecanobiología en Biomimética. Facultad de Ciencias, UNAM. Tema: Cell viability evaluation on-chip. Noviembre 2018
- **Quimiunam 2018.** Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM. Tema: Evaluación del cultivo de la línea celular LLC-PK1 en dispositivos de microfluídica. Modalidad: Poster. Ciudad de México, agosto 7, 2018
- **VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica (2016).** Cancún, México. Tema: Evaluación del cultivo de la línea celular LLC-PK1 en dispositivos de microfluídica. Modalidad: Poster. Noviembre 2016

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios:

- Laboratorio 228, “Método de Flujo Continuo” con el apoyo de la Dra. María del Pilar Cañizares Macías. Departamento de Química Analítica. Edificio F2, Facultad de Química, UNAM.
- Laboratorio 309, “Biofísicoquímica”, con el apoyo del Dr. Luis Fernando Olguín Contreras. Departamento de Físicoquímica. Edificio F2, Facultad de Química, UNAM
- Laboratorios 315 “Bioquímica de Antioxidantes”y 314 “Cultivo Celular”, con el apoyo del Dr. José Pedraza Chaverri y el M. en C. Omar Noel Medina Campos. Departamento de Biología. Edificio F1, Facultad de Química, UNAM
- Laboratorio O3C29 “Biomicrofluídica” con el apoyo del Dr. Nobuyuki Futai Departamento de Ingeniería Mecánica, Instituto de Tecnología Shibaura, Tokio, Japón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que junto con sus investigadores, estudiantes y administrativos me acompañaron y apoyaron en las diferentes etapas de este trabajo. Al Posgrado en Ciencias Químicas por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado. Asimismo al personal del edificio F de la Facultad de Química.

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Proyecto IT200718: Desarrollo de microdispositivos biológicos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por permitirme ser beneficiario de su programa de becas de manutención (número 289105, CVU 513317) y por su beca de movilidad otorgada para realizar una estancia de investigación en el Instituto Shibaura de Tecnología (Tokio, Japon). Porque sin el apoyo de ambas instituciones, el proyecto no hubiera podido realizarse.

Al finalizar un trabajo de doctorado es inevitable sentir algo de egocentrismo que te lleva a acreditarse todas las victorias experimentales y humanas que se han conseguido durante este periodo. Sin embargo, sin la participación de investigadores, administrativos e instituciones académicas, este trabajo no podría llevarse a cabo y ser olvidado. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mi agradecimiento. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. María del Pilar Cañizares Macías por aceptarme para realizar esta tesis doctoral y el tiempo dedicado al seguimiento de este trabajo. Al Dr. José Pedraza Chaverri por su confianza en mí, quien desde las 6am, me abrió las puertas a su laboratorio y cuarto de cultivo lo cual fue un aporte invaluable para la realización de este trabajo, que no podré olvidar jamás. Asimismo al M. en C. Omar Medina Campos por su apoyo técnico y amistad. Al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo en la manufactura de microdispositivos y sobretodo por su amistad. A los compañeros de todos los laboratorios en donde estuve presente dentro, fuera y hasta en los pasillos del edificio F, de manera especial a Kenia Chávez Ramos y Tania Gómez Sierra.

Mi agradecimiento al Dr. Nobuyuki Futai porque con su combinación de sentido del humor, generosidad y capacidad intelectual, se convirtió en un modelo a seguir. Asimismo quiero agradecer al personal del Instituto Shibaura de Tecnología y a los miembros del laboratorio de Biomicrofluídica en especial a Shahira Binti Ramli y Keiko Laura Arase. A todos los miembros del grupo CÉLULAS de Japón, gracias a ustedes mi estancia fue una experiencia muy agradable. Espero volverlos a ver.

A todos los integrantes de mi jurado: la Dra. Gloria Dávila Ortiz, Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Luis Fernando Olguín Contreras, Dra. Martha Patricia García Camacho y Dra. Laura Oropeza Ramos por sus valiosos comentarios, observaciones y sugerencias.

Este último párrafo (que debería ser el primero) está dedicado a Pamela Vázquez Vergara. Describir lo que ella ha aportado a este trabajo y a mi persona es imposible, su enorme paciencia, cariño,

ternura y contribución intelectual es indescriptible. En esta tesis estamos juntos desde la primera palabra hasta la última. Gracias por la *compañía*.

DEDICATORIAS

A PAMELA VÁZQUEZ VERGARA

A MIS PADRES

A LA MEMORIA DE LA DRA. ALBA LAURA VARGAS RAMIREZ

Por generar en mí el gusto por el cultivo celular

“The cell culture methods, already established in the 1970s, have been only accessible to researchers or technicians equipped with cell culture rooms exclusively for scientific experiments. But we believe cell culture is too important and fun to limit in a lab. Our goal is to transform cell culture into a handheld device”

Nobuyuki Futai

RESUMEN

El cultivo celular es el resultado de una colección de técnicas para el aislamiento y mantenimiento de células en condiciones controladas de laboratorio. Es de importancia en aplicaciones en ciencia básica y aplicada (ciencias de la salud, análisis de fármacos, y monitoreo ambiental, entre otras) y en la industria, por ejemplo, para la producción de vacunas y proteínas terapéuticas.

A finales de los años 90 el desarrollo de técnicas de miniaturización y el surgimiento del concepto de los microistemas *lab on a chip* planteó la posibilidad de trasladar procedimientos experimentales macroscópicos a un entorno a microescala. Por lo tanto, es posible usar las técnicas de miniaturización para desarrollar plataformas de operación sencilla de cultivo y manipulación de células en microambientes reducidos tal y como se mantienen en condiciones fisiológicas. Algunas otras ventajas del uso de sistemas miniaturizados basados en microfluídica son: rapidez, portabilidad, alta resolución y sensibilidad, volumen reducido de muestra y reactivos necesarios.

No obstante, dada la relativa novedad de estos sistemas, no hay protocolos establecidos, por lo que se determinó un protocolo experimental optimizado para el desarrollo de microdispositivos de operación sencilla, portátil y reproducible para cultivos celulares en monocapa donde se evalúe el efecto de compuestos fenólicos en la viabilidad celular, y cultivos tridimensionales donde se estudie la formación de redes vasculares.

En los capítulos siguientes se describirá:

- 1) El cultivo de células de epitelio de riñón (LLC-PK1) en monocapa y evaluación del efecto de compuestos fenólicos y extracto de vainilla en la viabilidad celular mediante el análisis de imágenes utilizando el reactivo de rojo neutro por primera vez como indicador de viabilidad en microdispositivos.
- 2) El cultivo tridimensional de células endoteliales (HUVEC) y evaluación de redes vasculares en condiciones controladas de oxígeno. Estos microdispositivos permitieron el desarrollo de protocolos sencillos de cultivo y análisis de células, simplificando el análisis y sirviendo como plataformas de bajo costo y manteniendo los cultivos de manera portable disminuyendo la infraestructura requerida para controlar las condiciones de gases.

ABSTRACT

Cell culture is the result of a collection of techniques for the isolation and maintenance of cells under controlled laboratory conditions. It is of importance in applications in basic and applied science (health sciences, drug analysis, environmental monitoring) and in industry, for example, for the production of vaccines and therapeutic proteins.

In the late 1990s, the development of miniaturization techniques and the emergence of the concept of Lab on a Chip microsystem raised the possibility of transferring macroscopic experimental procedures into a microscale environment. Therefore, it is possible to use miniaturization techniques to develop simple operation platforms for culturing and manipulating cells in small microenvironments as maintained under physiological conditions. Some other advantages of using microfluidic-based miniaturized systems are: speed, portability, high resolution and sensitivity, reduced sample volume and required reagents.

However, given the relative novelty of these systems, there are no established protocols. Therefore, an optimized experimental protocol for simple, portable and reproducible cell culture microdevices was developed. They were used for culturing monolayer cells and evaluate the effect of polyphenols in cell viability. Additionally, a microdevice for three-dimensional cultures and the formation of vascular networks was developed.

The following chapters will describe:

- 1) Culture of kidney epithelial cells (LLC-PK1) in monolayers and evaluation of the effect of polyphenols and vanilla extract on cell viability by image analysis using the neutral red reagent for the first time as an indicator of viability in microdevices.
- 2) Three-dimensional culture of endothelial cells (HUVEC) and evaluation of vascular networks under controlled oxygen conditions. These microdevices allowed the development of simple cell culture and analysis protocols, simplifying the analysis and serving as low-cost platforms for maintaining the cultures in a portable way, reducing the infrastructure required to control gas conditions.

Este trabajo se presentará en 4 capítulos independientes, pero relacionados entre sí. Comenzando en el capítulo 1 con una introducción de los fundamentos de cultivo celular en macroescala y en microdispositivos, en donde se describirá la importancia de este trabajo. En el Capítulo 2 se describen los estudios realizados a macroescala para el estudio de citotoxicidad de compuestos fenólicos y extracto de vainilla en la línea celular LLC-PK1. El tercer capítulo consiste en el desarrollo de microdispositivos para cultivo de la misma línea celular y se comparan con los estudios realizados a macroescala. El cuarto capítulo consiste en el desarrollo de microdispositivos portátiles de cultivo celular tridimensional de células endoteliales HUVEC en condiciones controladas de oxígeno y dióxido de carbono.

Índice

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	17
1.1) Definición y aplicaciones generales del cultivo celular	17
1.2) Requerimientos del cultivo celular	18
1.3) Líneas celulares.....	18
1.3.1) Línea celular LLC-PK1.....	19
1.3.2) Línea celular HUVEC.	19
1.4) Estudios basados en células: Citotoxicidad	20
1.4.1) Ensayos colorimétricos de viabilidad: Aplicaciones, ventajas y desventajas.....	21
1.4.1.1) Ensayo MTT	21
1.4.1.2) Ensayo de captación de Rojo Neutro.....	23
1.5) Estudios basados en células para la evaluación de productos naturales.....	24
1.5.1) Vainilla	25
1.6) Limitaciones de las técnicas de cultivo celular.	27
1.7) Avances en las técnicas de cultivo celular: cultivos tridimensionales y sistemas miniaturizados.	29
1.7.1) Cultivo celular tridimensional (3D).....	29
1.7.2) Sistemas miniaturizados de cultivo por microfluídica	31
1.7.2.1) Materiales y técnicas de fabricación de microdispositivos	33
1.7.2.2) Diferencias clave entre el cultivo en microdispositivos y macroescala	34
1.7.2.2) Métodos de evaluación de viabilidad celular en microdispositivos.	36
1.7.2.3) Comparación de los ensayos de viabilidad por microfluídica con las técnicas convencionales a macroescala.....	38
1.7.2.4) Limitaciones actuales y aspectos a mejorar de los microdispositivos de cultivo celular.....	39
1.7.2.5) Microdispositivos portátiles de cultivo celular con el control de gases.....	39
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	42
OBJETIVO GLOBAL	43
METAS	43

HIPÓTESIS	44
CAPITULO 2: CITOTOXICIDAD Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MACROESCALA	46
2.1) RESUMEN	46
2.2) OBJETIVO.....	46
2.2.1) OBJETIVOS PARTICULARES.....	46
2.3) HIPÓTESIS.....	47
2.4) METODOLOGIA.....	47
2.4.1) Reactivos, disoluciones y equipos	47
2.4.2) Capacidad antioxidante por el método ORAC.....	49
2.4.3) Ensayos de viabilidad en la línea celular LLC-PK1 expuesta a compuestos fenólicos y extracto de vainilla	49
2.4.3.1) Estabilidad de los compuestos fenólicos en el medio de cultivo	50
2.4.3.2) Ensayos de viabilidad	50
2.4.3.2.1) Repetibilidad y reproducibilidad del ensayo de viabilidad en macroescala.....	52
2.4.4) Estudios de protección antioxidante por compuestos fenólicos y extracto de vainilla en células LLC-PK1 sometidas a daño oxidativo por H ₂ O ₂	52
2.4.4.1) Estudio de la estabilidad de H ₂ O ₂ en medio DMEM.....	52
2.4.4.2) Evaluación de la protección celular por compuestos fenolicos y extracto de vainilla frente a daño oxidativo por H ₂ O ₂	53
2.4.5) Implementación del análisis de imágenes por Image J para evaluar viabilidad	54
2.5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS A MACROESCALA	55
2.5.1) Capacidad antioxidante por el método ORAC.....	55
2.5.2) Estudios del efecto de compuestos fenolicos y extracto de vainilla en células LLC-PK1 cultivadas a macroescala.....	56
2.5.2.1) Estabilidad de compuestos fenólicos en medio de cultivo DMEM (control sin células).....	56
2.5.2.2) Evaluación de la viabilidad celular.....	57
2.5.2.3) Repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad celular	62
2.5.2.4) Protección de compuestos fenólicos y extracto de vainilla frente a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno en células LLC-PK1	63

2.5.3) Determinación de viabilidad celular por análisis de imágenes con Image J.....	68
2.6) CONCLUSIONES.....	71
CAPITULO 3: MICRODISPOSITIVOS DE CULTIVO Y EVALUACION DE LA VIABILIDAD CELULAR	74
3.1) RESUMEN.....	74
3.2) OBJETIVO GENERAL.....	75
3.2.1) OBJETIVOS PARTICULARES.....	75
3.3) HIPÓTESIS.....	75
3.4) METODOLOGIA.....	75
3.4.1) Reactivos, equipos y disoluciones	75
3.4.2) Construcción y caracterización del microdispositivo	76
3.4.3) Evaluación de parámetros de cultivo en los microdispositivos.....	77
3.4.4) Evaluación del efecto de compuestos fenólicos y del extracto de vainilla en la viabilidad de LLC-PK1 cultivadas en los microdispositivos de PDMS. ..	78
3.4.5) Evaluación del estrés oxidativo en células LLC-PK1 cultivadas en microdispositivos y a macroescala.....	79
3.5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS A MICROESCALA	80
3.5.1) Caracterización del microdispositivo.....	80
3.5.2) Estudio de los parámetros de cultivo en microdispositivos	81
3.5.2.1) Ancho de microcanal	81
3.5.2.2) Evaluación de la densidad de células sembradas en la confluencia y morfología.....	81
3.5.2.3) Efecto del pretratamiento con plasma y Poli-L-Lisina en la adherencia celular al microchip.....	82
3.5.3) Análisis de las células en microdispositivos y comparación con macroescala.....	83
3.5.4) Ensayos de viabilidad en los microdispositivos	84
3.5.4.1) Efecto de los compuestos fenólicos VAI, PHB, AVAI, APHB y extracto de vainilla en la viabilidad celular de LLC-PK1	84
3.5.4.2) Evaluación del efecto de CDDP en la viabilidad de células LLC-PK1 en microdispositivo y macroescala	87

3.5.4.3) Repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad en el microdispositivo	88
3.5.5) Comparación del estrés oxidativo en células LLC-PK1 cultivadas en microdispositivo y macroescala.	93
3.6) CONCLUSIONES.....	95
CAPITULO 4: MICRODISPOSITIVOS DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL EN CONDICIONES DE HIPOXIA	98
4.1) RESUMEN.....	98
4.2) OBJETIVO GENERAL	98
4.2.1) OBJETIVOS PARTICULARES.....	98
4.3) HIPOTESIS	99
4.4) METODOLOGÍA.....	99
4.4.1) Reactivos, equipos y disoluciones	99
4.4.2) Construcción del microdispositivo.....	100
4.4.3) Caracterización de O ₂ y CO ₂	101
4.4.4) Cultivo celular en los microdispositivos.....	103
4.4.4.1) Evaluación de la formación de redes en condiciones de normoxia e hipoxia.....	103
4.5) RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	104
4.5.1) Evaluación de los niveles de oxígeno y dióxido de carbono.	104
4.5.2) Formación de redes vasculares en condiciones de normoxia.....	107
4.5.3) Formación de redes bajo transiciones de normoxia-hipoxia.	108
4.5.4) Viabilidad celular	112
4.6) CONCLUSIONES.....	114
REFERENCIAS.....	116
ANEXOS.	125
ARTICULO.....	134

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de capacidad antioxidante mediante el método de ORAC	56
Tabla 2. Estabilidad de disoluciones de VAI, PHB, AVAI y APHB en DMEM al tiempo 0 y después de 72h	57
Tabla 3. Valores de concentración media inhibitoria (IC_{50}) de VAI y PHB en función del tiempo de exposición, en la línea celular LLC-PK1 con los métodos rojo neutro y MTT.....	60
Tabla 4. Valores de IC_{50} del extracto de vainilla (24h de exposición)	62
Tabla 5. Repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad con vainillina usando rojo neutro y MTT	63
Tabla 6. Viabilidad de la línea celular LLC-PK1 expuesta a los diferentes compuestos fenólicos y H_2O_2 usando rojo neutro como método de ensayo.....	66
Tabla 7. Valores de IC_{50} de vainillina en células T24 obtenidas mediante Image J y espectrofotometría en los ensayos de rojo neutro y MTT	70
Tabla 8. Concentraciones de VAI, PHB, AVAI, APHB, extracto de vainilla y CDDP evaluadas en células LLC-PK1 cultivadas en microdispositivos.	79
Tabla 9. Valores de IC_{50} de compuestos fenólicos y extracto de vainilla a partir de los datos obtenidos en micro y macroescala.....	86
Tabla 10. Proporción de células fluorescentes respecto al total	93
Tabla 11. Valores de pH y de pCO_2 calculadas para las condiciones de hipoxia y no hipoxia.....	106

INDICE DE FIGURAS.

CAPITULO 1

Figura 1-1. Aplicaciones del cultivo celular.....	17
Figura 1-2. Morfología de la línea celular LLC-PK1.....	19
Figura 1-3. Cultivos en monocapa y 3D de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC)	20
Figura 1-4 Reducción del anillo de tetrazolio a formazán durante el ensayo de viabilidad celular con el indicador de MTT.....	22
Figura 1-5. Estructura de Rojo Neutro.	24
Figura 1-6. Estructuras de los principales compuestos fenólicos en vainilla	27
Figura 1-7. Diagramas esquemáticos de los cultivos 2D y 3D.....	30
Figura 1-8. Ejemplos de dispositivos de cultivo celular en chip	32
Figura 1-9. Ilustración del microambiente celular.....	33
Figura 1-10. Estructura del PDMS.....	34
Figura 1-11. Diagrama de fabricación de chips de PDMS por fotolitografía y litografía suave.....	34
Figura 1-12. Efectos de volumen reducido en dispositivos de microfluídica para cultivo celular.....	35

Figura 1-13. Dispositivo de cultivo celular con control de oxígeno y dióxido de carbono.....	40
---	----

CAPÍTULO 2

Figura 2-1. Viabilidad de LLC-PK1 en función de [VAI] a 24, 48 y 72h	58
Figura 2-2. Viabilidad de LLC-PK1 en función de [PHB] a 24, 48 y 72h.	59
Figura 2-3. Viabilidad de LLC-PK1 en función de [AVAI] a 24, 48 y 72h.....	59
Figura 2-4. Viabilidad de LLC-PK1 en función de [APHB] a 24, 48 y 72h	60
Figura 2-5. Viabilidad de las células LLC-PK1 en función de [VAI] en el extracto de vainilla.....	61
Figura 2-6. Concentración de peróxido en medio DMEM en función del tiempo... ..	64
Figura 2-7. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración y el tiempo de exposición de peróxido de hidrógeno	65
Figura 2-8. Efecto de los ácidos fenólicos APHB y AVAI en la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a H ₂ O ₂ (Condiciones de incubación simultánea).....	67
Figura 2-9. Viabilidad de células LLC-PK1 tratadas con peróxido de hidrógeno y diferentes concentraciones del extracto de vainilla (incubación preliminar y simultánea).	68
Figura 2-10. Imágenes representativas de células teñidas por RN y MTT empleadas para la determinación de viabilidad por Image J	69
Figura 2-11. Comparación entre el método por Image J (a) y espectrofotométrico (b) para la evaluación de viabilidad de células T24 y LLC-PK1 expuestas a VAI por el método de RN.	70
Figura 2-12. Comparación entre el método por Image J (a) y espectrofotométrico (b) para la evaluación de viabilidad de células T24 y LLC-PK1 expuestas a VAI por MTT.	70

CAPÍTULO 3

Figura 3-1. Representación del microdispositivo de PDMS para cultivo celular	77
Figura 3-2. Microdispositivos de cultivo celular en monocapa.....	80
Figura 3-3. Distribución celular en microdispositivos de diferente ancho	81
Figura 3-4. Células LLC-PK1 en microchip después de 24h de cultivo.....	82
Figura 3-5. Células adheridas a los microdispositivos comparando los tratamientos de irradiación con plasma-poli-L-Lisina.	83
Figura 3-6. Células LLC-PK1 a diferentes ampliaciones: (a) 10x, (b) 20x, (c) 40x	84
Figura 3-7. Imágenes representativas de células LLC-PK1 tratadas con rojo neutro y MTT en el microdispositivo	84
Figura 3-8. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de VAI y PHB en microdispositivo y pozos	85
Figura 3-9. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de AVAI y APHB. Comparación del cultivo en chip y pozos	86

Figura 3-10 Viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a extracto de vainilla en chip y pozos	86
Figura 3-11. Correlación de la viabilidad medida en microdispositivo y en macroescala para cultivos con VAI.....	87
Figura 3-12. Viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a CDDP en chip y pozos mediante el ensayo de rojo neutro	88
Figura 3-13. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a vainillina en micro y macroescala.	91
Figura 3-14. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a PHB en micro y macroescala	91
Figura 3-15. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a AVAI en micro y macroescala.	92
Figura 3-16. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a APHB en micro y macroescala.	92
Figura 3-17. Células LLC-PK1 cultivadas en medio DMEM en macroescala y microdispositivos, evaluadas con el ensayo DCFH-DA.....	94
Figura 3-18. Células LLC-PK1 cultivadas con H ₂ O ₂ y extracto de vainilla; evaluadas con el ensayo DCFH-DA.	95

CAPÍTULO 4

Figura 4-1. Dispositivo portátil para cultivo celular en 3D bajo niveles controlados de oxígeno y dióxido de carbono.	101
Figura 4-2. Esquema de experimentos de transición de normoxia e hipoxia.	104
Figura 4-3. Concentración de oxígeno en el microdispositivo en función del tiempo.....	106
Figura 4-4. Optimización de la densidad de sembrado de HUVECs basada en la formación de redes a las 72h de cultivo	107
Figura 4-5. Desarrollo de redes vasculares en el microdispositivo en (condiciones de normoxia hasta por 240h.....	108
Figura 4-6. Evolución temporal de redes vasculares HUVEC bajo diferentes transiciones de normoxia / hipoxia.	109
Figura 4-7. Parámetros de las redes vasculares de células HUVEC en diferentes condiciones de normoxia e hipoxia.....	112
Figura 4-8. Ensayo de viabilidad en células HUVEC cultivadas en normoxia e hipoxia.....	113

ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AAPH	Cloruro de 2,2'-azobis (2-metil-propionamida) dihidratado
ABC	Área bajo la curva cinética
AVAI	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico o ácido vanílico
APHB	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
BHT	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol
CAM	Calceína AM
CDDP	Cisplatino o cis-diaminodicloroplatino II
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2-7-diclorofluoresceína
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EGM-2	Medio de cultivo para el crecimiento de células endoteliales
EthD1	Homodímero de etidio-1
FOX	Fe ³⁺ -naranja de xilenol
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
hLF	Fibroblastos humanos de pulmón
HUVEC	Células endoteliales aisladas de la vena del cordón umbilical humano
IC ₅₀ .	Concentración inhibitoria media
LLC-PK1	Células renales de epitelio de túbulo proximal de cerdo
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaHASc	L-ascorbato de sodio
NIH	Institutos Nacionales de Salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
pO ₂	Presión parcial de O ₂
pCO ₂	Presión parcial de CO ₂
PBS	Disolución amortiguadora de fosfatos
PHB	Aldehído <i>p</i> -hidroxibenzoico
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA:	Polimetilmetacrilato
RN	Rojo Neutro
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SET	Transferencia de electrones
SFB	Suero fetal bovino
T-24	Línea celular de cáncer de vejiga
TAH	Transferencia de átomo de hidrogeno
Trolox	Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico
VAI	Vainillina

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN.

1) CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1) Definición y aplicaciones generales del cultivo celular

El cultivo celular es el termino general utilizado para la extracción de células, tejidos u órganos de un animal o planta, y su posterior colocación en un ambiente artificial adecuado para su supervivencia y/o proliferación (Meenakshi Arora, 2013). Es una herramienta utilizada como sistema modelo en áreas de investigación básica y aplicada (Figura 1-1) y provee datos preliminares para estudios posteriores en sistemas *in vivo*. Se ha aplicado en ciencias como inmunología, farmacología, toxicología, por ejemplo, en los estudios de interacción de fármacos u otros compuestos químicos en células, así como el trasplante y regeneración de tejidos, diagnóstico médico así como monitoreo ambiental. También se usa en caracterización y aislamiento de virus, y en la fabricación a gran escala de compuestos biológicos (por ejemplo, vacunas y proteínas terapéuticas) (Freshney, 2010).

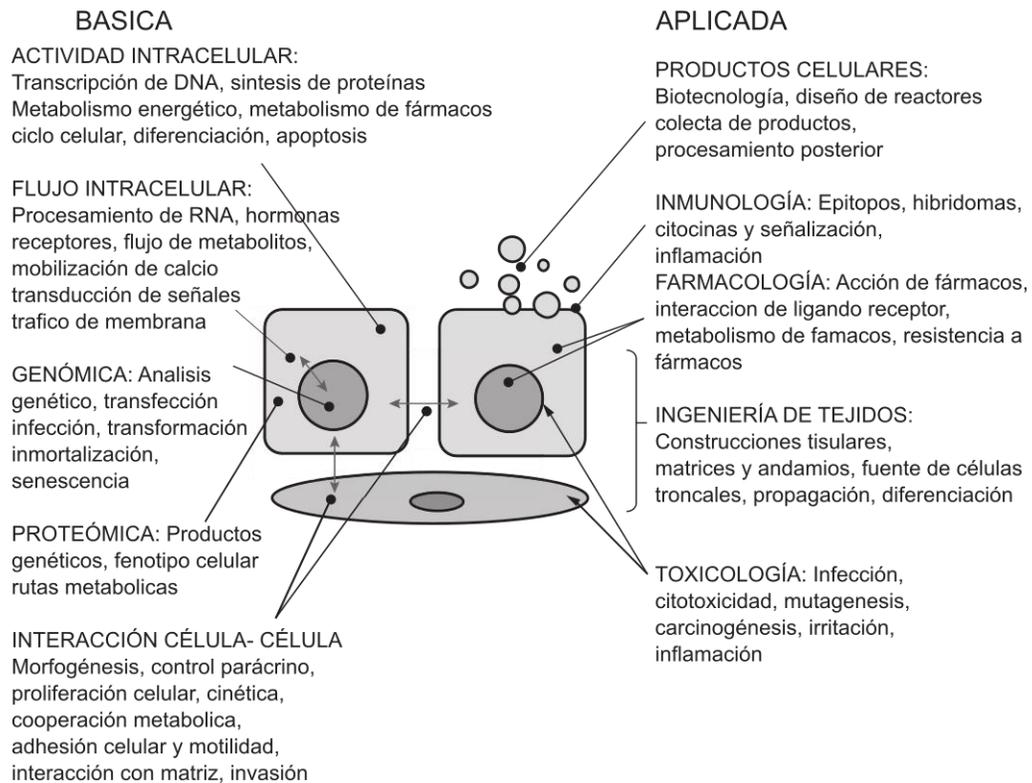


Figura 1-1. Aplicaciones del cultivo celular (Modificado de Freshney, 2010).

1.2) Requerimientos del cultivo celular

Para mantener un cultivo de células *in vitro* se requiere de las siguientes condiciones:

- 1) **Substrato de crecimiento:** es la superficie donde se logra la adhesión, crecimiento y por ende determina la actividad celular. Actualmente el plástico (usualmente poliestireno) es utilizado.
- 2) **Medio de cultivo:** es un líquido o gel diseñado para mantener el crecimiento de celular. Se compone de un complemento de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero como fuente de factores de crecimiento, hormonas y factores de fijación (Meenakshi Arora, 2013; Swain, 2014)
- 3) **pH y sistema de amortiguación:** El sistema de amortiguación es esencial para mantener niveles adecuados de pH. En células animales y humanas un pH óptimo está en el intervalo de 7.0 -7.4. En el intervalo de 6.5 a 7.0 las células dejan de crecer, y entre pH 6.0–6.5 células pierden su viabilidad. Para establecer un pH fisiológico en las células, el CO₂ es disuelto en el medio de cultivo. El dióxido de carbono establece un equilibrio con los iones HCO₃⁻ presentes en el medio de cultivo. El tampón de bicarbonato no solo muestra baja toxicidad sino también ayuda en el metabolismo de la glucosa. (Freshney, 2010; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014; Swain, 2014).
- 4) **Oxígeno:** Se requiere para una adecuada fisiología, y función celular. Los requisitos de oxígeno dependen del tipo celular y en general dependen de la cantidad disuelta en el medio de cultivo. (Freshney, 2010; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014; Swain, 2014).
- 5) **Temperatura:** En general la mayoría de las líneas celulares se mantienen a 37°C, sin embargo la temperatura se determina por origen del tejido, por ejemplo, menores temperaturas se emplean usualmente para cultivos de células de piel y testículos (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014)
- 6) **Osmolaridad:** Las células exhiben una tolerancia bastante amplia a la presión osmótica. Este factor puede influir en el crecimiento y la función celular y en general la osmolaridad debe ser similar a la del ambiente del tejido natural (Freshney, 2010; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014; Swain, 2014).

1.3) Líneas celulares

Una línea celular se define como una población particular de células que pueden mantenerse en cultivo durante un período prolongado de tiempo, conservando la estabilidad de ciertos fenotipos y funciones (Li, 2011). Surgen de cultivos celulares

primarios los cuales se obtienen directamente de las células, tejidos u órganos de animales. Han tenido un papel importante en el estudio de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Asimismo, permiten la examinación de alteraciones en la estructura, biología y composición genética de la célula en entornos controlados (Ulrich & Pour, 2001).

1.3.1) Línea celular LLC-PK1

La línea LLC-PK1 (*Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney 1*) proviene del epitelio del túbulo proximal del riñón de cerdo fueron obtenidas por Hull y colaboradores en 1958 (Hull *et al.*, 1976). En superficies sólidas, forman monocapas que exhiben morfología epitelial (Figura 1-2) (Taub, 1985). Esta línea se emplea como modelo de células renales en estudios relacionados con estrés oxidativo intracelular (Fujii *et al.*, 2006), daño renal inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) y de protección antioxidante (Song *et al.*, 2014). Asimismo, son empleadas en la evaluación de compuestos citoprotectores frente a compuestos nefrotóxicos como cis-platino (CDDP, cis-diaminodicloroplatino), el cual es utilizado en el tratamiento contra el cáncer (Reyes-Fermín *et al.*, 2019).

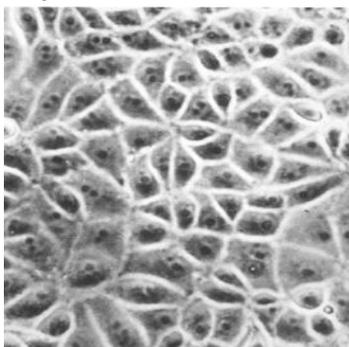


Figura 1-2. Morfología de la línea celular LLC-PK1 Tomado de Hull *et al.*, 1976

1.3.2) Línea celular HUVEC.

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) se aislaron y cultivaron por primera vez en la década de 1970 por Jaffe y colaboradores (Jiménez *et al.*, 2013). Se han utilizado como un modelo *in vitro* en medicina molecular, para la obtención de información sobre eventos celulares y moleculares en la fisiopatología de la aterosclerosis, y mecanismos para el control de la angiogénesis o la neovascularización en respuesta a hipoxia e inflamación en tumores, tejido isquémico y en embriogénesis (Park *et al.*, 2006). Asimismo, representan una fuente ampliamente utilizada de células endoteliales primarias para estudios *in vitro* sobre formación de redes vasculares y de

angiogénesis. Aunque este modelo no representa todos los tipos de células endoteliales que se encuentran en un organismo, son un modelo simple y disponible de células endoteliales humanas, siendo adecuado para la obtención de grandes cantidades de células (Baudin et al., 2007; Kocherova et al., 2019).

Las células HUVEC cultivadas en cultivos en monocapa (2D) se adhieren y propagan sobre la superficie plana y forman uniones celulares no naturales a la superficie sintética (Figura 1-3a). En cambio, en cultivo 3D dentro de una matriz de fibrina forman estructuras de redes capilares con lúmenes (Figura 1-3b) (Li *et al.*, 2017).

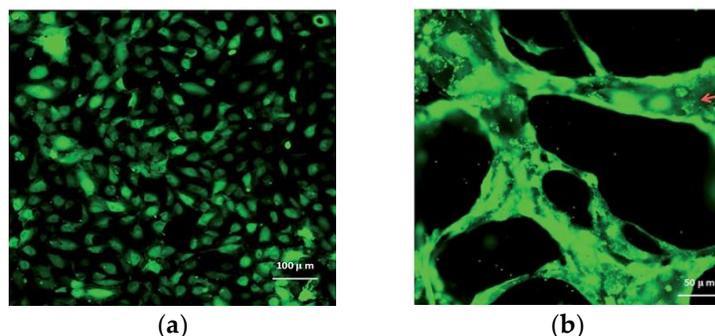


Figura 1-3. Cultivos en monocapa y 3D de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). (a) Imagen de microscopio confocal de HUVEC cultivada en 2D; (B) Imagen de microscopio confocal de la red microvascular 3D. Modificado de Li *et al.*, 2017.

1.4) Estudios basados en células: Citotoxicidad

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado (Arrebola *et al.*, 2003; Niles *et al.*, 2009). Diversos agentes físicos y químicos pueden afectar el estado y el metabolismo de la célula a través de diferentes mecanismos como la destrucción de membranas, bloqueo de síntesis de proteínas, unión irreversible a receptores, inhibición del alargamiento de polidesoxinucleótidos y mediante reacciones enzimáticas (Aslantürk, 2017; Ishiyama *et al.*, 1996).

La citotoxicidad se puede evaluar mediante métodos directos e indirectos. Los métodos directos involucran ensayos que cuantifican biomarcadores de muerte celular (por ejemplo, pérdida de integridad de la membrana). Por otro lado, la toxicidad celular se puede determinar de manera indirecta mediante ensayos de viabilidad celular (Niles *et al.*, 2009). Los ensayos de viabilidad son utilizados para determinar la relación del número de células vivas y funcionales en un cultivo. Existen una gran variedad de ensayos de viabilidad, los cuales aportan una información diferente según su fundamento biológico. Con base en el método de detección, los ensayos de viabilidad se pueden clasificar como: ensayos

colorimétricos, ensayos fluorométricos y ensayos luminométricos (Aslantürk, 2017).

1.4.1) Ensayos colorimétricos de viabilidad: Aplicaciones, ventajas y desventajas.

El principio de los ensayos colorimétricos es la medición de una característica o un marcador bioquímico que permita evaluar la actividad metabólica como un indicador del estado de las células. Estos ensayos requieren la incubación de un reactivo con una población de células para convertir el reactivo en un producto colorido o fluorescente que pueda ser detectado con un lector de placas. La incubación del reactivo con las células viables genera una señal que es proporcional al número de células viables presentes (Riss *et al.*, 2016).

Los reactivos utilizados desarrollan un color en respuesta a la viabilidad de las células, lo que permite la medición colorimétrica mediante espectrofotometría (Aslantürk, 2017). Por ejemplo, la reducción de sales de tetrazolio (MTT, MTS, XTS, etc.) y resazurina permite determinar la actividad de deshidrogenasa de las células viables ya que a medida que las células mueren o dejan de proliferar, hay un cambio medible en la reducción de estos compuestos (Gordon *et al.*, 2018).

Ventajas: Los ensayos colorimétricos son aplicables en líneas celulares adherentes o suspendidas (Präbst *et al.*, 2017), son fáciles de realizar, se pueden acoplar a ensayos de alto rendimiento (*high throughput*) y proporcionan un enfoque accesible para la determinación de la eficacia terapéutica (Gordon *et al.*, 2018). **Desventajas:** Éste tipo de ensayos no tienen la capacidad de evaluar células en tiempo real. En comparación con los ensayos fluorométricos, tienen una menor sensibilidad, en especial cuando se trabaja con muestras pequeñas de células (<1000) (Gordon *et al.*, 2018; van Meerlo *et al.*, 2013).

A continuación se describirán los ensayos de rojo neutro y MTT los cuales son considerados los ensayos colorimétricos de viabilidad celular mayormente utilizados (Van Tonder *et al.*, 2015).

1.4.1.1) Ensayo MTT

El método de MTT es una prueba colorimétrica ampliamente utilizada para determinar la viabilidad de células aisladas. El MTT, presenta una estructura molecular con forma de anillo (tetrazolio), escindida en la célula por la enzima mitocondrial *succínico deshidrogenasa*, dando cristales de formazán, que son insolubles y presentan color violeta. Estos cristales se acumulan dentro de las

células depositándose cerca de la superficie celular y en el medio de cultivo (Figura 1-4). A su vez, las células muertas son incapaces de formar cristales de formazán y por lo tanto no muestran tinción. Las lecturas se llevan a cabo en un espectrofotómetro que puede evaluar mediante la absorbancia el número de células que sufrieron muerte celular ya que cuanto mayor sea la absorbancia, mayor será el número de células viables (Rivas-Morales *et. al.*, 2016).

Ventajas: El ensayo MTT mide la capacidad metabólica de las células como marcador de las células viables.

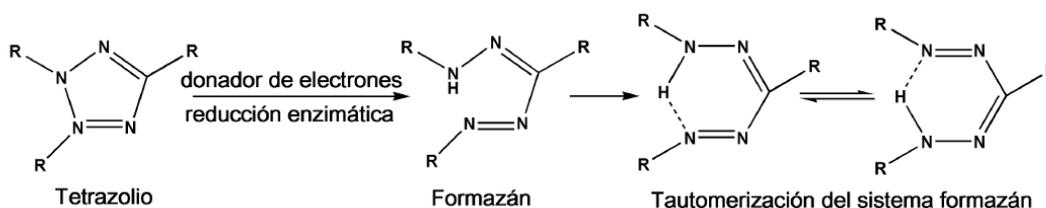


Figura 1-4 Reducción del anillo de tetrazolio a formazán durante el ensayo de viabilidad celular con el indicador de MTT (Tomado de Maldonado-Cubas *et al.*, 2018)

Desventajas: Los cristales de formazán producidos deben solubilizarse antes de realizar las lecturas de absorbancia. Se han utilizado una variedad de métodos para solubilizar el producto de formazán, estabilizar el color producido, evitar la evaporación y reducir la interferencia del rojo fenol y otros componentes del medio de cultivo (Denizot & Lang, 1986; Hansen *et al.*, 1989; Riss *et al.*, 2016; Tada *et al.*, 1986). La acidificación de la solución solubilizante tiene el beneficio de cambiar el color del rojo fenol a amarillo, el cual tiene menos interferencia con las lecturas de absorbancia.

Se ha descrito que la morfología de algunos tipos de células cambia drásticamente cuando se adiciona el reactivo de MTT, lo que sugiere una alteración de la fisiología celular (Riss *et al.*, 2016; Squatrito *et al.*, 1995). Dada la naturaleza citotóxica de MTT, este ensayo debe considerarse como de punto final (al finalizar el experimento). Además su potencial toxicidad en células, el ensayo MTT puede tener interferencias cuando se evalúan compuestos reductores. Los compuestos químicos como el ácido ascórbico o los compuestos que contienen sulfhidrilo, incluido el glutatión reducido o la coenzima A, pueden reducir las sales de tetrazolio de forma no enzimática (Riss *et al.*, 2016). Por otro lado, el medio de cultivo a pH elevado o la exposición prolongada del reactivo de MTT a la luz directa también puede causar una reducción espontánea de las sales de tetrazolio (Riss *et al.*, 2016).

1.4.1.2) Ensayo de captación de Rojo Neutro

El ensayo de captación de rojo neutro (RN) fue desarrollado en la universidad Rockefeller (Borenfreund & Puerner, 1985) y se basa en la capacidad de células sanas para captar y retener el compuesto rojo neutro (Figura 1-5) (Gordon *et al.*, 2018). Este colorante penetra las membranas celulares por difusión pasiva y se concentra en los lisosomas donde se une por interacciones electrostáticas a grupos aniónicos (por ejemplo grupos fosfato) en la matriz lisosomal (Nemes *et al.*, 1979; Winckler, 1974). El colorante es extraído de las células viables y se mide por espectrofotometría. La captación del colorante RN depende de la capacidad de la célula para mantener gradientes de pH a través de la producción de ATP. A pH fisiológico, el colorante presenta una carga neta cercana a cero, permitiéndole penetrar las membranas. Dentro de los lisosomas, hay un gradiente de protones que mantiene un pH menor que en el citoplasma. Así, el colorante se carga y es retenido dentro de los lisosomas (Repetto *et al.*, 2008).

El ensayo de RN provee una estimación cuantitativa del número de células viables en un cultivo. **Aplicaciones:** Es uno de los ensayos de citotoxicidad más usados en ciencias biomédicas y medioambientales. Los estudios que emplean el método de RN como indicador de viabilidad han sido utilizados en la evaluación de la citopatogenicidad viral (Smee *et al.*, 2017), inmunotoxicidad (Parish & Mollbacher, 1983) y en la detección de compuestos tóxicos (Repetto *et al.*, 2008). Asimismo, permite estimar las concentraciones iniciales de compuestos a evaluar en ensayos de toxicidad sistémica oral *in vivo* (Stokes *et al.*, 2008). Este método también se ha introducido en las recomendaciones regulatorias como parte del ensayo de fototoxicidad 3T3-NRU, que fue aceptado en todos los estados miembros de la Unión Europea (UE) en 2000 y en los estados miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) en 2004 como una guía de prueba (TG 432) (Ates *et al.*, 2017; OCDE, 2004). **Ventajas:** El reactivo de rojo neutro es relativamente no citotóxico, el procedimiento es muy sensible y fácilmente cuantificable, es más barato (en comparación con los ensayos que utilizan sales de tetrazolio (MTT)), presenta menos interferencia, es más sensible y no requiere de reactivos inestables (Repetto *et al.*, 2008). Asimismo requiere menos equipos que la estimación de la muerte celular mediante fuga de enzimas como la lactato deshidrogenasa (Repetto *et al.*, 2008). Es posible realizar la determinación tanto del contenido de proteína total como de viabilidad usando el ensayo de RN en el mismo cultivo celular (Arranz & Festing, 1990; Vichai &

Kirtikara, 2006). La facilidad del ensayo de captación de rojo neutro permite la automatización, mejorando el rendimiento y permitiendo la detección rápida y confiable de una gran cantidad de compuestos de prueba en un lapso de tiempo relativamente corto (Ates *et al.*, 2017; Bouhifd *et al.*, 2012). **Desventajas:** Una vez iniciado el ensayo, éste debe ser completado inmediatamente y no es posible utilizarlo en las células congeladas (Repetto *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha descrito que puede precipitar colorante rojo neutro en el medio de cultivo, lo que podría afectar la precisión de las lecturas de absorbancia utilizadas para detectar la presencia del colorante (McGaw *et al.*, 2014). Otra desventaja es que este método no distingue definitivamente si un compuesto es citotóxico o citostático (Gordon *et al.*, 2018; van Meerlo *et al.*, 2013).

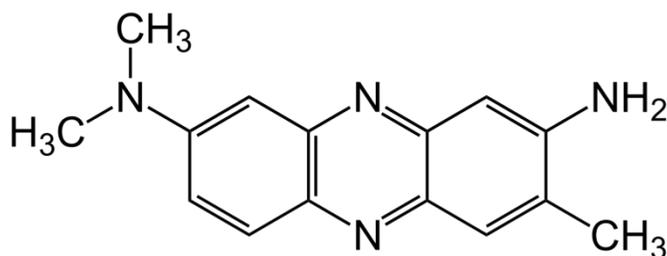


Figura 1-5. Estructura de Rojo Neutro.

De manera general, los ensayos de viabilidad han mostrado ser de utilidad para estudios de bioactividad basados en la capacidad antioxidante de productos naturales.

1.5) Estudios basados en células para la evaluación de productos naturales

Las pruebas clínicas y estudios epidemiológicos han establecido una correlación inversa entre el consumo de frutas y vegetales y la ocurrencia de enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, cáncer y desordenes relacionados con el envejecimiento. Se cree que los antioxidantes de la dieta, incluidos los compuestos fenólicos, son los componentes responsables de la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Çam *et al.*, 2013).

Numerosos métodos se han utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de productos naturales. Con base en las reacciones químicas involucradas, la capacidad antioxidante puede evaluarse mediante ensayos de eliminación de radicales o especies reactivas de oxígeno mediante enfoques basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH) y de transferencia de electrones (SET). No obstante, las múltiples actividades de los antioxidantes

incluyen la inactivación de catalizadores metálicos por quelación, la reducción de hidroperóxidos en derivados de hidroxilo estables, y la interacción sinérgica con otros compuestos reductores (Frankel & Finley, 2008).

La fiabilidad de los ensayos químicos con respecto a las perspectivas terapéuticas es cuestionable por varias razones: (i) casi todas las plantas tienen un excelente potencial antioxidante *in vitro*; (ii) las pruebas *in vitro* consisten en una reacción química directa que no toma en cuenta los parámetros citotóxicos y otros parámetros farmacológicos, y (iii) los resultados contradictorios encontrados entre los estudios *in vitro* e *in vivo* (Nascimento da Silva *et al.*, 2016).

En la última década se ha propuesto el uso de cultivos celulares como estudios complementarios para evaluación de los compuestos con potencial actividad antioxidante. Estos ensayos pueden revelar compuestos capaces de potenciar rutas antioxidantes, capacidad inhibitoria de enzimas prooxidantes y capacidad de inducir genes citoprotectores sin reacción directa con el agente oxidante (lo cual no puede ser determinado mediante ensayos químicos) (López-Alarcón & Denicola, 2013; Nascimento da Silva *et al.*, 2016). Además, los ensayos basados en células permiten evaluar el efecto citotóxico, abordar aspectos relacionados a la biodisponibilidad como la absorción, el metabolismo, la partición de membranas, los cuales son importantes para la eficacia del antioxidante *in vivo*. Los modelos animales y estudios en humanos son más apropiados pero más costosos y requieren mucho tiempo, haciendo que los ensayos de cultivo celular sean atractivos como métodos de prueba intermedios (Lopez & Denicola, 2013). Para evaluar el efecto antioxidante en células, se emplean diversas especies oxidantes como peróxido de hidrógeno y la capacidad de los compuestos para proteger a las células del daño oxidativo puede evaluarse mediante métodos de viabilidad como rojo neutro y MTT, y mediante el estudio de vías metabólicas por técnicas de biología molecular (Nascimento da Silva *et al.*, 2016).

1.5.1) Vainilla

La vainilla es un producto natural ampliamente utilizado en la industria alimentaria debido a sus propiedades organolépticas y a su funcionalidad como intermediario en productos farmacéuticos. Es considerada como la especia más cara del mundo, después del azafrán y se obtiene de las vainas de las orquídeas *Vanilla Pompona*, *Vanilla Tahitiensis* y *V. planifolia Andrews* (también conocida como *Vanilla fragans*) (de Guzman & Zara, 2012; Hernández-Fernández *et al.*, 2019). Dado

que las vainas verdes carecen de sabor, se someten a un proceso denominado como “beneficio o curado” que desarrolla los compuestos responsables del sabor y aroma (Korthou & Verpoorte, 2007). En la vainilla natural se han descrito más de 300 compuestos presentes entre los cuales se encuentran compuestos fenólicos, los cuales le dan una alta capacidad antioxidante. Los principales compuestos fenólicos de la vainilla (Figura 1-6) son: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído o vainillina (VAI) (1-3%), aldehído *p*-hidroxibenzoico (0.1-0.2%) (PHB), ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico ó ácido vanílico (AVAI) (0.1-0.2%) y ácido *p*-hidroxibenzoico (APHB) (0.01-0.02%) (Rojas-López and Cañizares-Macías, 2013). Cabe mencionar que el método de extracción, las características del disolvente, y las condiciones de beneficio de las vainas, contribuyen a cantidad y/o variedad de compuestos extraídos que pueden influir en la capacidad antioxidante total del extracto de vainilla (Hernández-Fernández *et al.*, 2019; Rojas-López & Cañizares-Macías, 2013).

VAI es uno de los compuestos de sabor mayoritariamente utilizados. Las concentraciones de vainillina utilizadas en alimentos y bebidas varía de 0.3 a 33 mM (Kamat *et al.*, 2000), por lo cual se espera que un alto consumo de vainillina de alimentos y bebidas tenga efectos en la salud humana (Tai *et al.*, 2011). Se ha atribuido a VAI diferentes propiedades como antimutagénico, antiangiogénico, anticolitis, inhibidores de la anemia falciforme y antianalgésico (Bezerra *et al.*, 2016). Con respecto a su capacidad antioxidante, se han reportado diferentes resultados dependiendo del mecanismo antioxidante estudiado. Se ha demostrado que VAI tiene actividad depuradora contra radicales hidroxilo (Harish *et al.*, 2005) y radical catiónico 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Maurya *et al.*, 2007), capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC) e inhibición de la hemólisis oxidativa (OxHLIA) (Tai *et al.*, 2011). Por otro lado, VAI tiene poca actividad de eliminación de radicales superóxido, poca protección en la peroxidación lipídica, así como en la inactivación del radical 1,1-difenil-picryl-hidrazilo (DPPH) (Yan-Chun & Rong-Liang, 1991) Además, también se ha informado que el VAI puede tener una acción prooxidante, ya que promovió la oxidación del glutatión, los grupos sulfhidrilo y la coenzima NADPH en condiciones experimentales, lo que podrá explicar su acción citotóxica en algunas líneas celulares tumorales (Bezerra *et al.*, 2016; Castor *et al.*, 2010).

AVAI es la forma oxidada de VAI y un producto metabólico de ácido cafeico que está presente en la orina de los humanos después del consumo de café,

chocolate o té verde (Falconnier *et al.*, 1994). AVAI funciona como antimicrobiano, anticancerígeno y propiedades antiinflamatorias confirmadas experimentos *in vitro* e *in vivo* (Aziz *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2007; Kampa *et al.*, 2004; M. Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010). Además, se demostró que los AVAI tienen una mayor capacidad antioxidante que VAI en los ensayos de capacidad antioxidante por DPPH, ABTS y de radical galvinoxil (Tai *et al.*, 2011). Por otro lado, PHB y APHB tienen menor capacidad antioxidante que VAI y AVAI (Rojas-López & Cañizares-Macías, 2013). Actualmente, no hay algún estudio sobre su efecto citotóxico / citoprotector en líneas celulares.

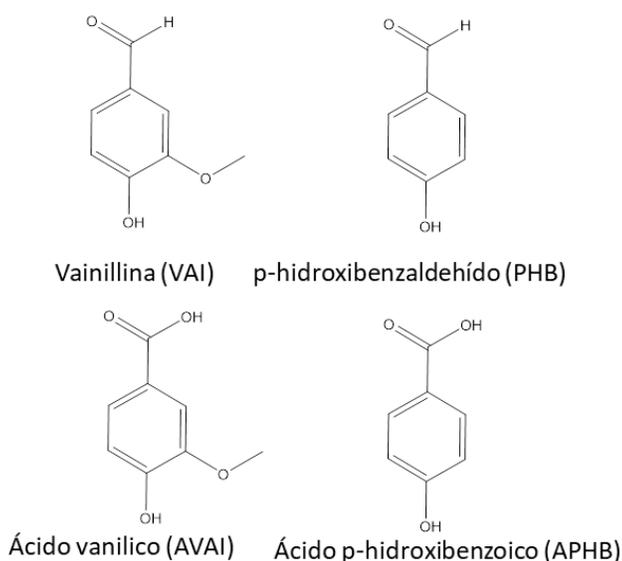


Figura 1-6. Estructuras químicas de los principales compuestos fenólicos en vainilla

Por otro lado, VAI en altas concentraciones (en el rango milimolar) ha sido descrito como un agente citotóxico dañando varias líneas celulares como fibroblastos de ratón, células de cáncer de ovario A2780-CS1, células de cáncer colorectal HT-29, y células de cáncer de hígado, HepG2 (Bezerra *et al.*, 2016).

1.6) Limitaciones de las técnicas de cultivo celular.

Los ensayos basados en células han sido clave durante el proceso de descubrimiento de fármacos con el objetivo de revelar la efectividad y la seguridad de compuestos con potencial terapéutico. Considerando el costo involucrado y los requerimientos éticos en los estudios en animales para obtener la aprobación clínica, es comprensible la necesidad de recopilar toda la información relacionada con la actividad biomédica, la citotoxicidad, el mecanismo de acción y las

interacciones en las primeras etapas del descubrimiento de fármacos (Nascimento da Silva *et al.*, 2016). Actualmente se utiliza un amplio espectro de ensayos de viabilidad /citotoxicidad en los campos de toxicología y farmacología, ya que son pruebas rápidas y económicas en comparación con modelos animales (Aslantürk, 2017). Estos ensayos en general tienen varias ventajas tales como la facilidad de cultivo, el potencial de expansión, la predictibilidad, la posibilidad de automatización, realización simultánea de ensayos y de miniaturización, que los hacen adecuados para las altas demandas de las primeras etapas del descubrimiento de fármacos (Nascimento da Silva *et al.*, 2016).

Los retos y/o limitaciones de los cultivos celulares se listan a continuación:

- **Esterilidad:** Las técnicas de cultivo celular requieren de estrictas condiciones de asepsia para evitar contaminación de bacterias, virus y hongos las cuales pueden provocar la muerte del cultivo (Santacruz Reyes *et al.*, 2017).
- **Suplementación:** Para el crecimiento de células animales es necesario suplementar el medio de cultivo con suero, plasma y fluidos intersticiales, para proveer a las células cultivadas un medio semejante al *in vivo* (Hermersdörfer, 1995).
- **Gastos y demanda de tiempo requerida:** Una mayor limitación en el cultivo de células es el tiempo y materiales requeridos para la producción de una pequeña cantidad de células o de tejido. Se requiere de ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación, volúmenes de muestra, tiempos de centrifugación, etc. Así, como el requerimiento de personal con experiencia en el manejo de células (Santacruz Reyes *et al.*, 2017).
- **Comparación con sistemas *in vivo*:** En los cultivos celulares se dificulta relacionar las células cultivadas con las células funcionales ubicadas en el tejido del cual son derivadas dado que en la mayoría de los casos presentan propiedades muy diferentes, debido a que los cultivos celulares aún no están lo suficientemente avanzados técnicamente (Aslantürk, 2017; Santacruz Reyes *et al.*, 2017). Las células cultivadas en monocapas en superficies bidimensionales (2D) planas y rígidas, como el poliestireno o el vidrio, han funcionado como una plataforma estándar para los cultivos celulares convencionales. Una limitación clave del cultivo 2D es la

incapacidad de imitar el microambiente y la arquitectura *in vivo*. En consecuencia, existen diferencias entre las células cultivadas en 2D y las células *in vivo*, tales como características morfológicas, proliferación, interacciones entre las células y la matriz extracelular así como la transducción de señales (Duval *et al.*, 2017).

1.7) Avances en las técnicas de cultivo celular: cultivos tridimensionales y sistemas miniaturizados.

Desde la implementación del cultivo celular, las herramientas y requisitos básicos no han cambiado significativamente. Además de avances sustanciales en el control de la contaminación con microorganismos, la mayoría de las mejoras en el cultivo celular han sido en cuanto a la composición de los medios de cultivo y los materiales utilizados para producción de placas de cultivo celular. Sin embargo, la forma de las placas de cultivo celular se mantuvo principalmente sin cambios durante casi un siglo.

Se han implementado diferentes tecnologías basadas en sistemas robotizados para la mejora de técnicas de cultivo celular. Estos sistemas se han implementado para eliminar los pasos de pipeteo manual, resultando en un mayor rendimiento en cuanto al tiempo y una mayor precisión. A pesar de su volumen, y los costos asociados con su uso, los sistemas robóticos se han convertido en la piedra angular de aplicaciones a gran escala para el cultivo celular. Sin embargo, los materiales y técnicas de cultivo se mantienen sin cambios (Mehling & Tay, 2014). A continuación se describen dos estrategias desarrolladas para el mejoramiento de los cultivos celulares incluyen los cultivos celulares tridimensionales y el desarrollo de sistemas miniaturizados por microfluídica.

1.7.1) Cultivo celular tridimensional (3D).

Con el objetivo de desarrollar modelos de cultivo más fidedignos y prospectivos, en la última década se introdujeron los modelos de cultivo tridimensional (3D). En este modelo, las células son cultivadas en una matriz o andamio con estructura 3D a diferencia de los cultivos en monocapa adheridas solamente en el fondo de una superficie plana (Figura 1-7a,b) (Brajša *et al.*, 2016). Se han desarrollado diferentes protocolos de cultivo 3D como el de formación de esferoides por el método de gota colgante, hidrogeles, cultivos en suspensión, técnicas de bioimpresión y a base de andamios prefabricados (Chaicharoenaudomrung *et al.*, 2019).

Los hidrogeles se han convertido en una de las plataformas más populares para el cultivo tridimensional (3D) (Ruedinger *et al.*, 2015). Debido a que proporciona ciertas ventajas: pueden prepararse a partir de una gran variedad de materiales sintéticos y naturales o sus combinaciones; pueden combinarse con factores de adherencia y crecimiento. Además, la rigidez, porosidad y elasticidad se pueden controlar fácilmente. Las proteínas como fibrina y el colágeno, las cuales están presentes en la matriz extracelular (ECM) son un biomaterial ideal para andamios a base de hidrogel, debido a su biocompatibilidad y la capacidad de adhesión celular (Schneider-Barthold *et al.*, 2016).

Una limitación de los sistemas de cultivo 3D ha sido la falta de una red vascular estructurada que permita el intercambio de oxígeno, nutrientes y desechos. Por ejemplo, al alcanzar cierto tamaño, los organoides dejan de proliferar y desarrollan un núcleo necrótico debido a la difusión limitada de oxígeno, nutrientes y metabolitos (Figura 1-7c) (Grebenyuk & Ranga, 2019)

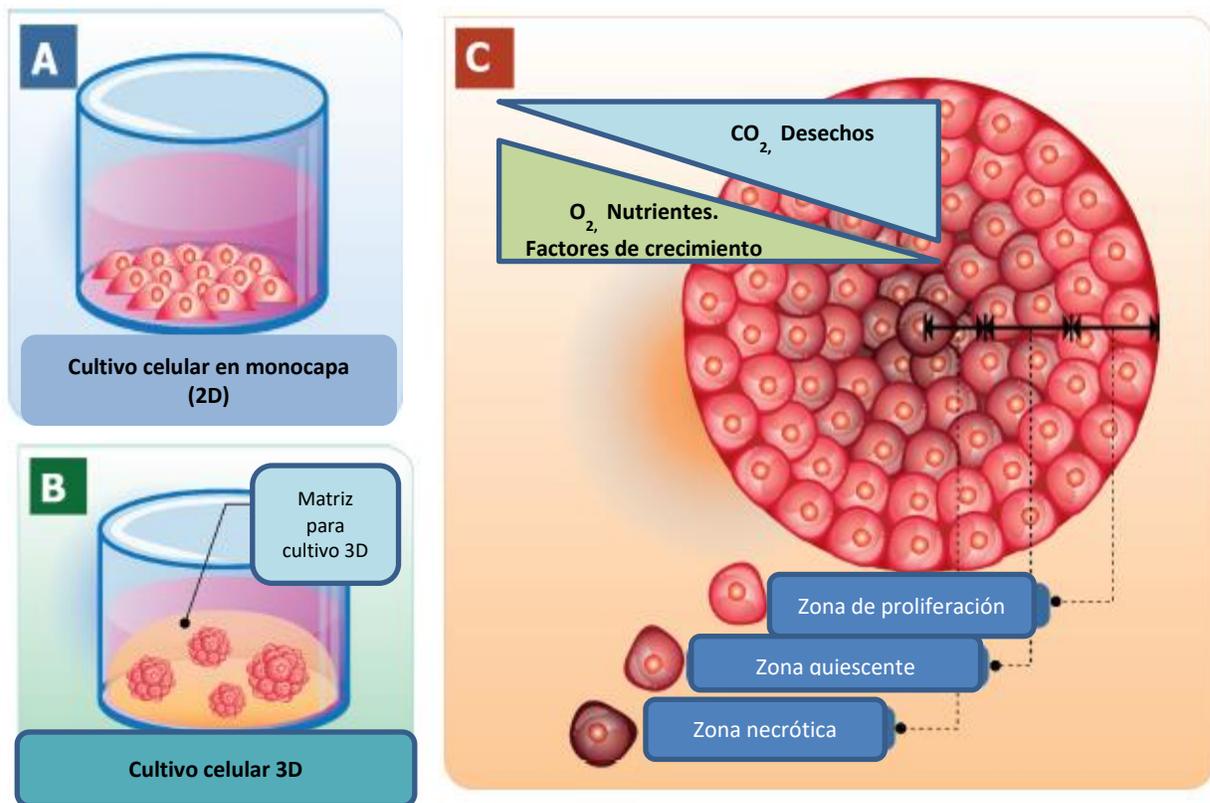


Figura 1-7. Diagramas esquemáticos de los cultivos 2D y 3D. A) Cultivo celular 2D en monocapa; B) Sistema de cultivo tridimensional; C) Estructura de un esferoide 3D con diferentes zonas de células con los modelos de oxigenación, nutrición y eliminación de CO_2 . Las zonas necróticas (interna), la zona celular viable quiescente (media) y la zona de proliferación (externa). Modificado de (Chaicharoenaudomrung, *et al.*, 2019).

1.7.2) Sistemas miniaturizados de cultivo por microfluídica

La microfluídica es el conjunto de tecnologías para la manipulación de pequeños volúmenes de fluido (μL , nL, pL) dentro de microsistemas fabricados artificialmente (Whitesides, 2006). Los sistemas microfluídicos permiten la miniaturización, integración, automatización y paralelización de procesos (bio)químicos (Mark *et al.*, 2010). Asimismo permite el cultivo y análisis de una o varias células aisladas, así como agregados celulares con estructuras complejas u organoides (Mehling & Tay, 2014)

El cultivo celular por microfluídica permite el desarrollo de técnicas y dispositivos para cultivar, mantener, analizar y experimentar con células con volúmenes a microescala (Meyvantsson & Beebe, 2008). Tiene como objetivo simplificar los protocolos de cultivo y evaluación de células, integrando operaciones y sensores para pretratar y analizar muestras, reduciendo el trabajo manual y asegurando al mismo tiempo una alta resolución de análisis, y un mayor número de muestras analizadas. Además, los dispositivos de microfluídica permiten recrear entornos dinámicos (Coluccio *et al.*, 2019).

Los microdispositivos pueden ser de un solo microcanal, o de múltiples microcanales. Los microcanales funcionan como cámaras miniaturizadas que permiten el manejo, suministro de medio, tratamiento así como el análisis de las células de una manera controlada y reproducible (Primiceri *et al.*, 2013). Pueden integrarse sistemas de detección para el análisis y manipulación de células con una alta resolución temporal y espacial

La miniaturización en plataformas de microfluídica es una herramienta ampliamente utilizada para el cultivo celular en 2D y 3D. Algunos ejemplos de microdispositivos de configuración sencilla son los siguientes: Mollica *et al.*, 2018, desarrollaron un dispositivo de canal sencillo (Figura 1-8a) para cultivar y evaluar la adherencia de células cancerosas (HCT-15 y MDA-MB-231) en células HUVEC cultivadas en monocapa. Jastrzebska *et al.*, 2013 desarrollaron un microdispositivo de múltiples series de microcámaras de cultivo e integradas a un sistema generador de gradiente de concentración (GGC) para ensayos de toxicidad (Figura 1-8b). En el caso de cultivo 3D, se han desarrollado un microsistema para el cultivo de esferoides 3D que consiste en una serie de microcámaras con pozos donde se mantienen esferoides celulares (Figura 1-8c) (Zuchowska *et al.*, 2018). Asimismo, se han desarrollado microplataformas de mayor complejidad (Figura 1-8d) o

acopladas a interfaces para el control de temperatura y el suministro de medio de cultivo (Figura 1-8e) (Coluccio *et al.*, 2019; Gärtner *et al.*, 2015).

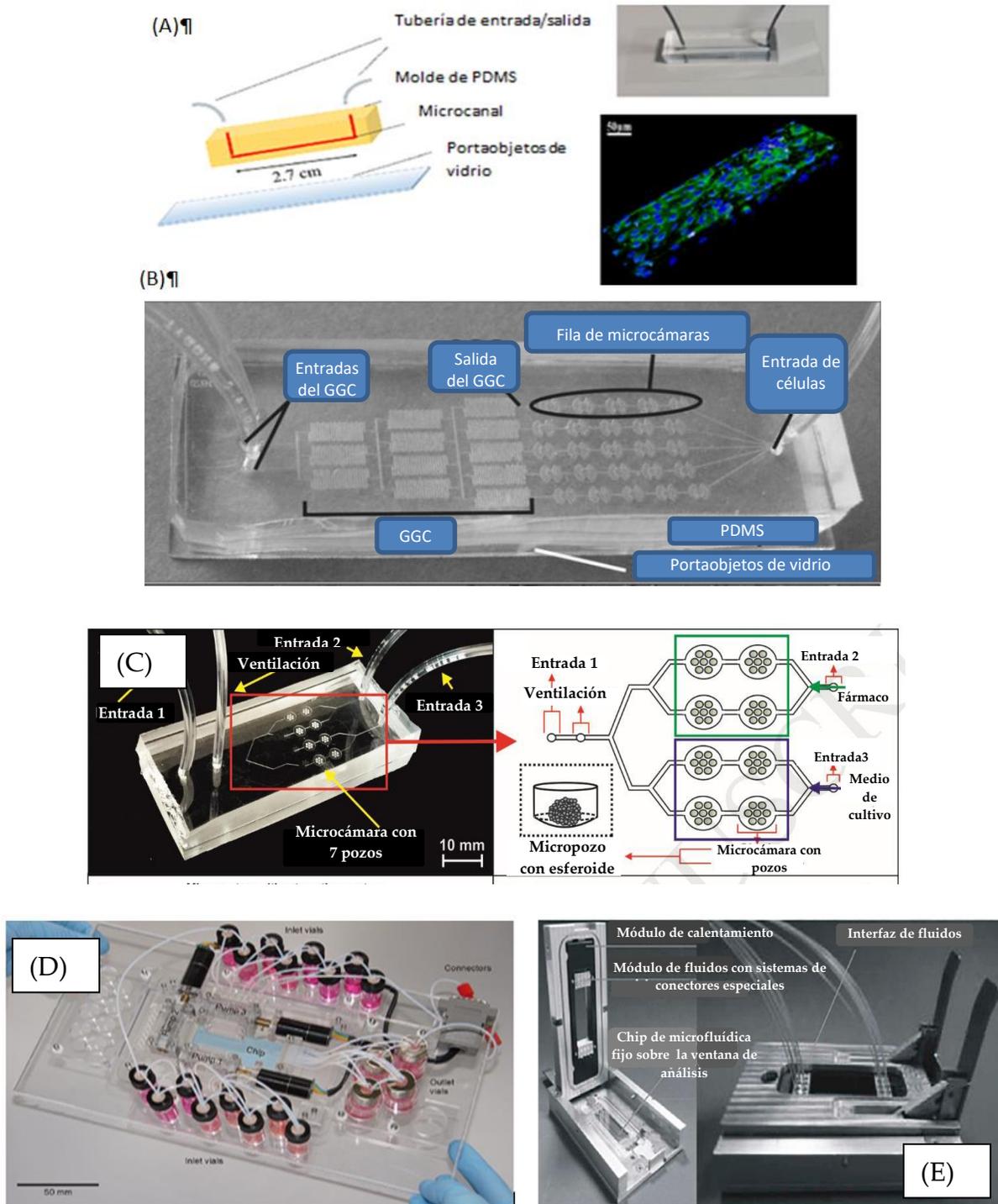


Figura 1-8. Ejemplos de dispositivos de cultivo celular en chip. (A) Dispositivo de canal sencillo para el cultivo de células HUVEC en monocapa y analizadas por microscopia confocal. Tomado de (Mollica *et al.*, 2018). (B) Microdispositivo de PDMS/vidrio cultivo en microcámaras integrado a un generador de gradiente de concentraciones (GGC). Tomado de Jastrzebska *et al.*, 2013. (C) Esquema de un arreglo de microcámaras para cultivo de esferoides 3D e imagen del

microdispositivo. Tomado de Zuchowska *et al.*, 2018. (D) Microplataforma de cultivo celular programable. Tomado de Skafte-Pedersen *et al.*, 2012. (E) Interfaz de manejo de microdispositivos de cultivo celular. Tomado de Gärtner *et al.*, 2015.

La aplicación de la microfluídica en cultivo permite un control del microambiente celular (Figura 1-9) con mayor precisión en comparación con los sistemas *in vitro* convencionales (Boussommier-Calleja *et al.*, 2016). Esto se debe al confinamiento de las células en una variedad de configuraciones microscópicas definidas por el usuario, lo que permite controlar la distribución celular en escalas de longitud fisiológicas. El control del microambiente también se ve facilitado por la presencia de canales que permiten el establecimiento de gradientes bioquímicos o físicos (Kim *et al.*, 2010). Asimismo, permiten un menor suministro de células y menor consumo reactivos dentro del ensayo, menor riesgo de contaminación (ya que el microcanal se encuentra confinado por una pared de PDMS, disminuye la probabilidad de entrada de algún microorganismo) y un eficiente rendimiento de experimentación (Mehling & Tay, 2014).

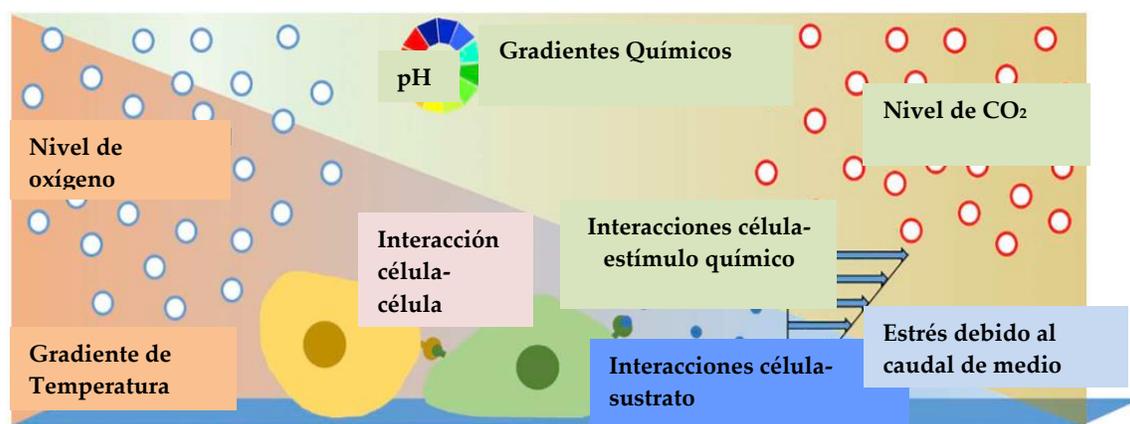


Figura 1-9. Ilustración del microambiente celular. Este consiste en factores físicos (estrés debido al flujo de medio), bioquímicos (interacción entre células) y fisicoquímicos (pH, CO₂, temperatura, O₂), Tomada de Coluccio *et al.*, 2019.

1.7.2.1) Materiales y técnicas de fabricación de microdispositivos

Los materiales usados en la construcción de microdispositivos son: 1) polímeros termoplásticos como poliestireno (PS) (Su *et al.*, 2011), polimetilmetacrilato (PMMA) (Wu, 2010), Policarbonato (PC) (Chang *et al.*, 2014); 2) vidrio (Jang *et al.*, 2008), 3) papel (Mosadegh *et al.*, 2015), 4) polidimetilsiloxano (PDMS) entre otros, siendo este último el más usado.

El PDMS (Figura 1-10), es un elastómero, ópticamente transparente, biocompatible y permeable a gases. Permite la implementación de estructuras

geométricas robustas con bajo nivel de autofluorescencia haciéndolo útil para cultivo celular (Halldorsson *et al.*, 2015). Sin embargo, una de las desventajas es su hidrofobicidad y porosidad, lo que resulta en la absorción de moléculas hidrofóbicas como lípidos o moléculas pequeñas presentes en el medio de cultivo (Mehling and Tay, 2014) lo cual dificulta la adherencia de células. Es por esto que el PDMS requiere algún pretratamiento para reducir su hidrofobicidad o cubrir la superficie con polipeptidos como la Poli-L-lisina que faciliten la unión celular (Halldorsson *et al.*, 2015).

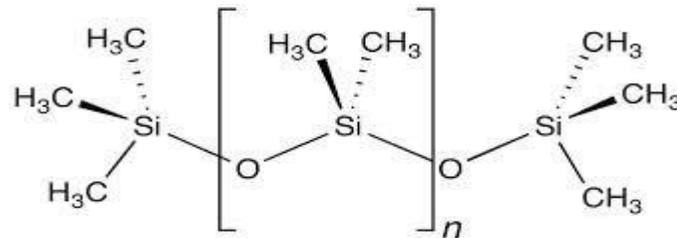


Figura 1-10. Estructura del PDMS

Entre la multitud de métodos para la fabricación de dispositivos de microfluídica, la litografía suave se ha convertido en un procedimiento estándar (Figura 1-11). Con esta técnica, estructuras de resolución micrométrica son fabricadas a partir de un molde (Lin, 2018; Mehling & Tay, 2014).

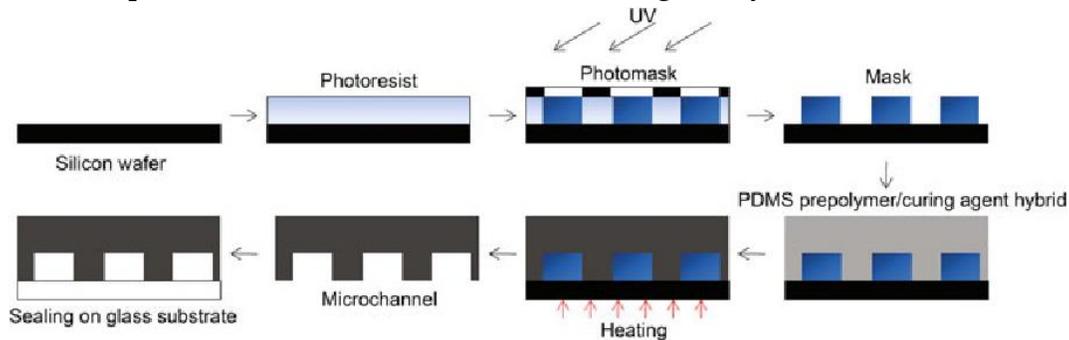


Figura 1-11. Diagrama de fabricación de chips de PDMS por fotolitografía y litografía suave. Tomado de Lin, 2018.

1.7.2.2) Diferencias clave entre el cultivo en microdispositivos y macroescala

Los cultivos miniaturizados presentan retos en la adaptación de protocolos estándar de cultivo debido a las diferencias con el cultivo tradicional a macroescala, como el uso de diferentes superficies de cultivo, reducción de volúmenes de medio de cultivo (Figura 1-12) y los diferentes métodos para el recambio de medio de cultivo (Halldorsson *et al.*, 2015)

Por otro lado, los datos obtenidos con los microdispositivos pueden no ser comparables con los ensayos estándar debido a las diferentes condiciones de tratamiento y análisis de células (Coluccio *et al.*, 2019). Para optimizar un sistema

de cultivo celular en microfluídica se debe considerar que la reducción de escala de cultivo y el confinamiento de células pueden influir en el microambiente y por lo tanto en el comportamiento celular. Asimismo, existen variaciones en macro y microescala en cuanto al número de células en estudio (Paguirigan & Beebe, 2009). Los dispositivos de microfluídica permiten la reducción de la población celular en estudio a unos pocos cientos de células e inclusive analizar una sola célula (*single cell analysis*). Esta reducción es considerable en comparación con los sistemas de cultivo convencional que requieren de una población de entre 10^4 - 10^7 células (Halldorsson *et al.*, 2015).

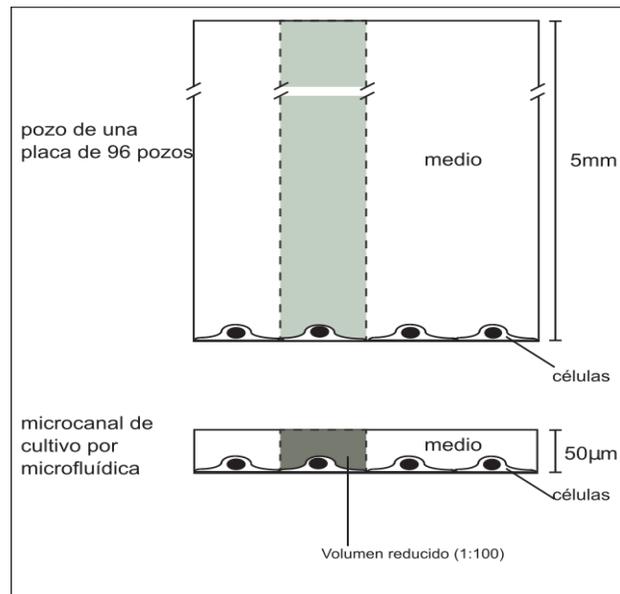


Figura 1-12. Efectos de volumen reducido en dispositivos de microfluídica para cultivo celular. El volumen reducido de medio de cultivo resulta en un consumo más rápido de nutrientes, así como un aumento de la concentración de metabolitos o moléculas secretadas. Ambas condiciones son similares a las existentes en tejidos. Modificado de Mehling & Tay, 2014.

Los sistemas de microfluídica requieren del recambio periódico del medio de cultivo para mantener las condiciones de cultivo estables. Un factor clave en la microescala es la relación área-volumen (SAV) significativamente mayor en comparación con los cultivos a macroescala, lo cual significa que los cultivos en microdispositivos tienen mucho menos volumen de medio disponible por célula (Devadas, & Young, 2016). Los pequeños volúmenes implican un consumo rápido de nutrientes y un aumento en la concentración de metabolitos o de moléculas secretadas, comparado con las técnicas de cultivo convencionales (Mehling & Tay, 2014). El medio puede suministrarse por gravedad, tensión superficial, bombas peristálticas o de jeringa etc., los cuales pueden tener influencia en los parámetros de flujo y por ende influenciar en el comportamiento celular (Byun *et al.*, 2014).

Considerando las diferencias intrínsecas entre el cultivo en macroescala y en microdispositivos, estos últimos tienen el potencial para ser utilizados en varios aspectos poco explorados de la biología celular (Halldorsson et al., 2015). Por ejemplo, la reducción de volúmenes resulta benéfico cuando se requiere una alta concentración de factores de crecimiento que de otro modo se diluirían en volúmenes utilizados a macroescala (Devadas, D., & Young, 2016; Domenech et al., 2009).

Por otro lado, la manipulación en dispositivos de microfluídica implica la presencia de flujos alrededor de las células. Tales flujos imparten un estrés conocido como estrés hidrodinámico o de cizalla (*shear stress*). Si bien este parámetro es considerado como un factor estresante en la mayoría de las aplicaciones en microdispositivos para cultivo (Varma & Voldman, 2018), juega un papel clave en el comportamiento de ciertas células como las endoteliales y epiteliales renales en sistemas *in vivo* (Weinbaum et al., 2011). Por ejemplo, las células endoteliales que recubren la superficie de vasos sanguíneos y linfáticos están constantemente expuestas al estrés hidrodinámico impuesto por fricción del flujo de sangre y líquido linfático, respectivamente. Este estrés mecánico actúa sobre los receptores mecanosensibles de las células y por ende influye en el comportamiento celular (Ruzycka et al., 2019). Por lo tanto, las condiciones de flujos impuestas por los microdispositivos simulan mejor las condiciones fisiológicas asociadas a la circulación. No obstante, otro efecto del estrés hidrodinámico en células es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por ende, este factor puede influir en la respuesta de las células a compuestos con capacidad antioxidante (Lo et al., 2013).

1.7.2.2) Métodos de evaluación de viabilidad celular en microdispositivos.

La reducción del número de células en estudio y de los volúmenes utilizados de medio de cultivo y reactivos en los dispositivos de microfluídica presenta un desafío en el posterior análisis (Halldorsson et al., 2015). Por lo tanto, se han propuesto métodos alternativos para el análisis de células en microdispositivos. Dada la transparencia de los materiales utilizados en su fabricación, la microscopía óptica es una de las técnicas analíticas más populares y confiables en microfluídica aplicada a problemas biomédicos, y ha permitido la evaluación de células con y sin tinción fluorescente (Coluccio et al., 2019). Mediante el análisis de imágenes, también conocida como citometría de imágenes por

microfluídica (o μ FIC, por sus siglas en inglés, *microfluidic image cytometry*) (Lim *et al.*, 2012; Lin, 2018) se puede extraer información cuantitativa y datos numéricos mediante el análisis de imágenes que permiten mediciones específicas como tamaño, forma y fracción de área (Gonzalez *et al.*, 2010). Debido a su alta sensibilidad, la posibilidad de utilizar múltiples indicadores y su fácil implementación, muchos grupos de investigación usan imágenes de fluorescencia de las células para obtener información estructural y funcional y para monitorear diversas actividades celulares en cultivos por microfluídica (Choi *et al.*, 2016). No obstante, en años recientes se ha reportado que el uso de marcadores fluorescentes puede inducir fototoxicidad en los cultivos celulares debido al tiempo de exposición al haz de luz (Varma & Voldman, 2018).

Además de técnicas por fluorescencia, la microscopia de campo claro se ha utilizado junto con el análisis de imágenes se ha empleado en la evaluación de viabilidad celular por microfluídica. Park & Yoon (2012) desarrollaron una metodología para la determinación de viabilidad de células cultivadas en microdispositivos utilizando el reactivo de MTT. La implementación de este ensayo se ha realizado adquiriendo imágenes ópticas de campo claro utilizando un microscopio invertido para el estudio de la citotoxicidad de Cd^{2+} (Lim *et al.*, 2012) y de nanomateriales (Lee *et al.*, 2014).

Otros tipo de enfoques se basan en detección espectrofotometría UV-Vis, infrarrojo (IR) y resonancia de plasmón superficial (SPR) (Choi *et al.*, 2016; Lin, 2018). Asimismo se han desarrollado técnicas mixtas que emplean el acoplamiento de métodos electroquímicos y ópticos (Choi *et al.*, 2016). Por ejemplo, la detección de impedancia eléctrica entre el cultivo celular y la superficie de cultivo puede monitorear los cambios en la viabilidad en células adherentes cultivadas en electrodos metálicos (Choi *et al.*, 2016; Gerasimenko *et al.*, 2020). Si bien esta técnica permite evaluar la viabilidad celular en tiempo real sin requerir tinción celular, el material usado en la fabricación de los electrodos no debe causar ningún efecto tóxico y permanecer estable durante todo el experimento. Los electrodos a base de oro o platino han sido implementados debido a su estabilidad y biocompatibilidad, sin embargo tienen un alto costo. Otro tipo de electrodos a base de cloruro de plata son recomendados para estudios a corto plazo debido a que los medios de cultivo pueden provocar la erosión de dichos electrodos causando toxicidad a las células (Gerasimenko *et al.*, 2020). Otra limitación está asociada a que la detección

electroquímica no proporciona información estructural de las células, para lo cual debe apoyarse en técnicas de microscopía (Choi *et al.*, 2016).

Por último, se han implementado sensores de glucosa, oxígeno y pH que pueden monitorear el estado de las células en tiempo real. Al aumentar el número de sensores integrados en un dispositivo, se pueden realizar múltiples análisis simultáneamente en un solo experimento. No obstante, a mayor número de sensores aumenta la complejidad del dispositivo y su manejo se vuelve más difícil, lo cual puede ocasionar mayor riesgo de contaminación y el consumo de tiempo es mayor por cada ciclo analítico (Coluccio *et al.*, 2019).

1.7.2.3) Comparación de los ensayos de viabilidad por microfluídica con las técnicas convencionales a macroescala.

Se han realizado diversos estudios de viabilidad celular en microdispositivos y se han comparado con los obtenidos a macroescala. De manera general, los datos obtenidos con los microdispositivos muestran correlación con los obtenidos por placa de 96 pozos. No obstante, en ciertos casos suele haber discrepancias entre ambos sistemas. Por ejemplo, Ziolkoska *et al.*, 2010 reportaron que si bien los porcentajes de células de cáncer muertas que fueron expuestas determinado fármaco fueron similares entre microdispositivos y macroescala, las células control en el microdispositivo tuvieron una mayor porcentaje de necrosis en el microdispositivo. Jastrzebska *et al.*, 2013 reportaron una buena correlación entre los cultivos en microdispositivos y a macroescala (con coeficientes de correlación de Pearson hasta 0.999). Habría que resaltar que altas concentraciones de fármaco provocaron una mayor muerte celular en el chip. Ambos autores atribuyeron estas discrepancias principalmente a las diferencias en las condiciones de cultivo entre ambos sistemas: en macroescala, las células se cultivaron en condiciones estáticas mientras que en el microdispositivo, los tratamientos son suministrados periódicamente lo cual podría causar una mayor sensibilidad en las células debido al estrés hidrodinámico producido por la perfusión. Por último, Cooksey *et al.* (2011) compararon la repetibilidad de ensayos de viabilidad en macroescala y microdispositivos. Descubrieron que los ensayos realizados en microdispositivos mostraron resultados comparables a los ensayos de cultivo macroscópico aunado a que en los ensayos por microfluídica son más sensibles para determinar la viabilidad celular.

1.7.2.4) Limitaciones actuales y aspectos a mejorar de los microdispositivos de cultivo celular

A pesar de que el número de microdispositivos desarrollados en aplicaciones relacionadas al cultivo celular se expande rápidamente, la implementación y estandarización de técnicas de análisis simples, confiables, rápidas y adaptables universalmente ha avanzado a un menor ritmo (Coluccio *et al.*, 2019). Aunado a esto, varios microdispositivos requieren de complejos sistemas de manipulación o configuraciones complicadas que pueden resultar ajenos a la mayoría de los laboratorios de cultivo celular establecidos. En consecuencia, los costos por ensayo aumentan debido a la instrumentación requerida para ejecutar el microdispositivo, los sensores integrados así como el requerimiento de personal especializado para su manejo (Coluccio *et al.*, 2019; Halldorsson *et al.*, 2015).

El desarrollo de sistemas autónomos y portátiles de cultivo celular podría ofrecer soluciones alternativas en el diagnóstico médico y en la aplicación en ensayos de toxicidad requeridos en el monitoreo ambiental (Takano *et al.*, 2012). Sin embargo, el requerimiento de factores externos (como el control de gases y humedad) puede comprometer la portabilidad del cultivo celular. Una estrategia para el desarrollo de sistemas portátiles de cultivo es el uso de disoluciones amortiguadores que permita el control de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono e inclusive mantener cultivos en condiciones de baja oxigenación (Takano *et al.*, 2014, 2012), la cual se presenta a continuación.

1.7.2.5) Microdispositivos portátiles de cultivo celular con el control de gases

La concentración de oxígeno en sistemas *in vivo* varía del 1 al 11%, dependiendo de su ubicación corporal, siendo menor que la del nivel atmosférico (20.9%) (Carreau *et al.*, 2011). Durante muchas décadas, el cultivo de células se ha llevado a cabo en condiciones de oxigenación atmosféricas debido a la ineficiencia para lograr un ambiente de bajo oxígeno. Los sistemas de incubación convencional mantienen una concentración de CO₂ al 5% que mantiene el pH constante y 95% de aire, con lo cual no reduce sustancialmente la concentración de oxígeno del ambiente. El estudio de las células en condiciones de baja oxigenación (hipoxia) puede dar lugar a diferentes respuestas celulares de interés biológico o médico ya que al igual que el estrés oxidativo, este factor está involucrado en diferentes

estados patológicos como enfermedad cardiovascular, inflamación, tumorigénesis, así como la generación de especies reactivas de oxígeno (Calahorra *et al.*, 2018).

Para estudiar la respuesta celular bajo condiciones controladas se utilizan sistemas de incubación multigases como las incubadoras de gases múltiples y las cámaras de incubación) que suelen ser caras, voluminosas y requieren de un suministro continuo de gases. El costo y el tamaño de estos dispositivos son particularmente problemáticos cuando uno está interesado en examinar el grado de respuestas celulares bajo diferentes concentraciones de oxígeno (Takano *et al.*, 2014).

Takano *et al.* (2014) desarrollaron un microdispositivo sencillo para el cultivo de células en monocapa en condiciones controladas de dióxido de carbono (5%) y baja concentración de oxígeno basándose en un sistema amortiguador de carbonato/ bicarbonato el cual contiene ascorbato de sodio como eliminador de oxígeno del medio ambiente segmentado con tubo cilíndrico de PDMS que permite el intercambio de gases entre el amortiguador y el cultivo, eliminando el O_2 y suministrando CO_2 al sistema (Figura 1-13) (Takano *et al.*, 2014). Este dispositivo fue implementado en cultivos en monocapa disminuyendo la concentración de O_2 al 5%. No obstante, este enfoque no ha sido implementado en cultivos tridimensionales.

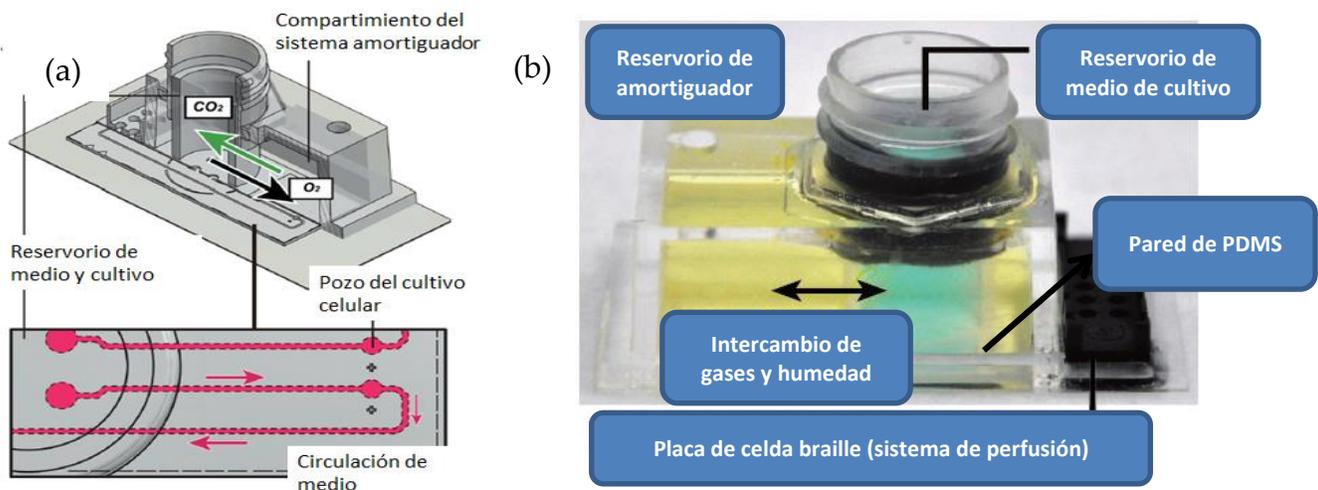


Figura 1-13. Dispositivo de cultivo celular con control de oxígeno y dióxido de carbono (a) Esquema del microdispositivo. (b) Chip ensamblado. El reservorio de medio de cultivo se llenó con agua teñida con colorante verde y el reservorio de la disolución amortiguadora se llenó con solución amortiguadora teñida de amarillo. Ambos depósitos están divididos con tubo de PDMS que facilita el intercambio de gases y humedad. Tomado de Takano *et al.*, 2014 .

El cultivo celular en hipoxia se ha utilizado para facilitar la formación y el desarrollo de redes vasculares formadas por células endoteliales (Krock *et al.*,

2011). La estrategia de vascularización espontánea *in vitro* en construcciones 3D resulta de interés para un intercambio más eficiente de oxígeno y nutrientes en cultivos de organoides (*organ on a chip*) con el fin de desarrollar modelos con una mejor funcionalidad y mayor similitud a los sistemas *in vivo*.

Debido a las diferencias entre los cultivos a macro y microescala, y a la potencial capacidad de portabilidad de estos últimos, se requiere del desarrollo de sistemas miniaturizados de configuración sencilla y una cuidadosa evaluación entre los datos obtenidos en experimentos a macroescala y los datos obtenidos en microdispositivos.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

La investigación con cultivos celulares es una herramienta ampliamente utilizada tanto en ciencia básica como aplicada. Asimismo, la investigación con antioxidantes tiene gran impacto en la ciencia básica, en la industria de alimentos y en las ciencias de la salud. Considerando la complejidad de los mecanismos de acción antioxidante *in vivo*, los métodos químicos *in vitro* no son suficientes para evaluar y comparar las propiedades antioxidantes de productos naturales. Es por ello que es importante realizar la evaluación de antioxidantes en cultivos celulares como un método intermedio entre los ensayos químicos y los ensayos *in vivo* (López-Alarcón & Denicola, 2013). Tradicionalmente, el cultivo celular se ha mantenido sin cambios en el último siglo (Mehling & Tay, 2014), realizándose en cajas Petri, placas de 6 hasta 96 pozos o en pequeños matraces de plástico. No obstante existe una nueva propuesta para el cultivo celular a microescala usando técnicas de microfluídica. Es por ello por lo que en este trabajo se desarrolló una metodología estandarizada, miniaturizada y reproducible utilizando dispositivos de microfluídica para la prospección de citotoxicidad y capacidad antioxidante de los principales antioxidantes del extracto de vainilla y del extracto natural en la línea celular LLC-PK1. El extracto de vainilla ha sido descrito con una alta capacidad antioxidante evaluada por métodos químicos, sin embargo, no ha sido descrito su efecto citotóxico o citoprotector en células LLC-PK1. Tampoco ha sido utilizada la técnica de rojo neutro para ensayos de viabilidad celular en cultivos por microfluídica siendo una técnica sencilla de implementar, accesible y reproducible.

Por otro lado, los estudios con líneas celulares son comúnmente realizados en condiciones atmosféricas de oxígeno (20.9%) y los sistemas actuales que permiten el control de oxigenación en cultivo suelen ser costosos, requieren de espacio y un suministro continuo de gases, lo cual compromete los costos por ensayo. Es por ello por lo que se proponen los microdispositivos como potenciales plataformas de suministro y eliminación de gases de manera *in situ*, generando las condiciones adecuadas para cultivos celulares portátiles, de bajo costo y con infraestructura mínima. Estas ventajas permitirían mantener cultivos tridimensionales de redes vasculares, los cuales son de importancia para el desarrollo de modelos más complejos como los sistemas de *organ-on-a-chip*.

OBJETIVO GLOBAL

Evaluar viabilidad celular en dispositivos de microfluídica y comparar los resultados con los generados a nivel macroescala, así como evaluar condiciones controladas de oxigenación en cultivos celulares miniaturizados.

METAS

- Determinar las condiciones que permitan el cultivo de la línea celular LLC-PK1 en microdispositivos de PDMS de manera reproducible.
- Implementar un método basado en análisis de imágenes para la determinación de viabilidad celular en microdispositivos utilizando el reactivo de rojo neutro.
- Comparar los resultados obtenidos por rojo neutro con los obtenidos por el ensayo de MTT para el estudio de viabilidad de compuestos fenólicos en macroescala.
- Determinar la capacidad antioxidante de los principales compuestos fenólicos en vainilla natural (vainillina, aldehído *p*-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico) y de extracto de vainilla mediante la técnica de ORAC.
- Evaluar el efecto de la exposición a compuestos fenólicos y extracto de vainilla en la viabilidad de células LLC-PK1 por el ensayo de RN en macroescala y en microdispositivos.
- Evaluar y comparar la precisión de los ensayos de viabilidad en macroescala y en microdispositivos.
- Determinar la capacidad de protección de algunos compuestos fenólicos de vainilla (vainillina, aldehído *p*-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico) y extracto de vainilla frente a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno en la línea celular LLC-PK1.
- Desarrollar un microdispositivo para cultivo celular tridimensional portátil que permita controlar la concentración de CO₂ y O₂.
- Evaluar un sistema amortiguador basado en carbonato y ascorbato de sodio para cultivo celular en condiciones controladas de CO₂ y O₂.
- Estudiar el cultivo tridimensional de células endoteliales HUVEC y formación de redes vasculares en microdispositivos.
- Estudiar el efecto de hipoxia en la estabilidad y formación de redes vasculares de células endoteliales.

- Evaluar la viabilidad celular en cultivos tridimensionales de células endoteliales en condiciones normales de oxigenación e hipoxia.

HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos con el microdispositivo para la evaluación de viabilidad de la línea celular LLC-PK1 frente a diferentes compuestos fenólicos: vainillina (VAI), aldehído *p*-hidroxi benzoico (PHB), ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (AVAI) y ácido *p*-hidroxibenzoico (APHB) serán estadísticamente iguales a los obtenidos a macroescala utilizando como método de detección MTT y RN demostrando que este último facilitará la evaluación en microfluídica.

Se demostrará que es posible desarrollar plataformas sencillas y portátiles de cultivo celular tridimensional en condiciones controladas de oxígeno y dióxido de carbono sin la necesidad de requerir sistemas externos de control de gases para el estudio del efecto de hipoxia en células endoteliales, disminuyendo la cantidad de reactivos, costos e infraestructura.

Capítulo 2
CITOTOXICIDAD Y
CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE EN
MACROESCALA.

2) CAPITULO 2: CITOTOXICIDAD Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MACROESCALA

2.1) RESUMEN

En este capítulo se describen los estudios de viabilidad celular a macroescala (placa de 96 pozos) en la línea celular de epitelio del túbulo proximal del riñón (LLC-PK1) así como, los estudios de capacidad antioxidante por el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) frente a los principales compuestos fenólicos presentes en vainilla: VAI, PHB, AVAI, APHB y el extracto etanólico de vainilla natural. Debido a que el método de viabilidad por MTT puede presentar interferencias para el estudio de antioxidantes, la viabilidad celular también se midió mediante el método de rojo neutro (RN) y ambas pruebas fueron comparadas. Se evaluó la precisión de los ensayos de RN y MTT expresada como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio. Posteriormente, se estudió la capacidad protectora de los compuestos fenólicos frente a daño oxidativo por H₂O₂ en células LLC-PK1. De este modo se estableció la relación entre la capacidad antioxidante medido por ensayos químicos y el efecto citotóxico/citoprotector de los compuestos fenólicos evaluados y extracto de vainilla.

Por último, se implementó una metodología basada en el análisis de imágenes por Image J para medir viabilidad celular usando los indicadores de rojo neutro y MTT, y se comparó con el procedimiento convencional de extracción y medición espectrofotométrica del colorante. Este método basado en imágenes fue propuesto con la finalidad de ser utilizado en los estudios posteriores de viabilidad con microdispositivos.

2.2) OBJETIVO

Determinar el efecto de VAI, PHB, AVAI, APHB y un extracto natural de vainilla en la viabilidad de línea celular LLC-PK1 cultivada a macroescala.

2.2.1) OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar la capacidad antioxidante de VAI, PHB, AVAI, APHB y extracto de vainilla mediante la técnica de ORAC
- Evaluar la estabilidad de los compuestos fenólicos en medio de cultivo DMEM.

- Evaluar el efecto de compuestos fenólicos y extracto de vainilla en la viabilidad de la línea celular LLC-PK1 a diferentes concentraciones y tiempos de exposición por los ensayos de rojo neutro y MTT.
- Comparar los resultados obtenidos por el ensayo de MTT con los obtenidos por rojo neutro.
- Determinar la repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad.
- Determinar la capacidad protectora de los compuestos fenólicos y extracto de vainilla frente a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno en la línea celular LLC-PK1.
- Implementar un método basado en el análisis de imágenes por Image J para la determinación de viabilidad celular y comparar esta metodología con el método espectrofotométrico para los ensayos de rojo neutro y MTT.

2.3) HIPÓTESIS.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos por rojo neutro serán estadísticamente diferentes a los obtenidos por MTT además de que el método de rojo neutro reducirá costos y permitirá evaluar a las células sin perder su integridad. Además, la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos y extracto de vainilla será diferente al grado de citoprotección en células frente a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno.

2.4) METODOLOGIA

2.4.1) Reactivos, disoluciones y equipos

Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico: vainillina, aldehído *p*-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (ácido vanílico, pureza del 97%) y ácido *p*-hidroxibenzoico, los cuales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para obtener los extractos de vainilla, se adquirió vainas de vainilla en polvo de Papantla, Veracruz (México).

En las pruebas ORAC se utilizaron fluoresceína, cloruro de 2,2'-azobis (2-metil-propionamida) dihidratado (AAPH) y ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox), todos de Sigma-Aldrich.

Para el cultivo celular y los ensayos de viabilidad, se utilizaron el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino y penicilina /

estreptomycin los cuales fueron adquiridos de Biowest (Riverside, MO). Las tabletas de solución salina tamponada con fosfato (PBS), tripsina-EDTA, cloruro de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (rojo neutro), formaldehído y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazo (MTT) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El ácido acético glacial, el 2-propanol y el ácido clorhídrico fueron de JT Baker (Center Valley, PA). El cloruro de calcio era de Reasol (México, México). El etanol era de Emplura (Darmstadt, Alemania). El peróxido de hidrógeno era de Macron (Center Valley, PA).

Líneas celulares

Se utilizó la línea celular LLC-PK1 (células epiteliales derivadas del túbulo proximal de riñón porcino) la cual se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) y se cultivó en placas Petri de 100 mm (Corning) en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%) estreptomycin 0,1 mg / ml, penicilina 100 U / ml hasta que alcanzaron una confluencia entre 80-90%. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humificada de 5% de CO₂ a 37 ° C. Se utilizó el número de subcultivos (pases) del número 15 al 30. Para implementar el método de análisis de viabilidad por Image J se empleó, además, la línea celular de cáncer de vejiga T24 (ATCC, Rockville, MD, EUA), cultivada de la misma manera que para LLC-PK1 y cuyos pases oscilaron entre el 10 al 15. Esta línea celular fue utilizada en la implementación del método de análisis de imágenes por Image J. Este programa permite realizar el procesamiento de imágenes digitales, es de dominio público y fue desarrollado por los Institutos Nacionales de salud (NIH, por sus siglas en inglés) (Collins, 2007).

Equipos

Para el manejo de las células se utilizó una campana de seguridad biológica clase II y una incubadora humidificada control de CO₂ y aire 95% (Nuair, Plymouth, MN, USA). y un microscopio invertido (TS100, Nikon) En los ensayos de ORAC así como para los ensayos de viabilidad celular, se usó un lector de microplacas Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, EE. UU.), una celda de flujo en forma de Z, una bomba peristáltica (ISMATEC Modelo RS-232, Wertheim, Alemania), tubería de teflón y Tygon, fibras ópticas de 400 μm (Ocean Optics, Largo, FL), una fuente de luz UV-Vis (Ocean Optics, Modelo DT-MINI-2-GS, Largo, FL) y un detector UV-Vis (Ocean Optics, USB 4000, Largo, FL). Todo

esto se utilizó para determinar la concentración y la estabilidad de los compuestos fenólicos en DMEM. Para acelerar el proceso de obtención de extractos de vainilla se utilizó un equipo de microondas focalizado Microdigest de 300W (Prolabo, Francia) como fuente de energía. Se usó un microevaporador rotatorio (Heidolph, Alemania) para concentrar el extracto y evaporar el etanol presente. Para ajustar el pH de las disoluciones de los compuestos fenólicos y extracto en DMEM se utilizó un potenciómetro (Oakton).

2.4.2) Capacidad antioxidante por el método ORAC

Este ensayo se basa en la generación de radicales peroxilo por calentamiento del compuesto AAPH en presencia de oxígeno; este radical oxida a la fluoresceína y provoca un decaimiento de la fluorescencia emitida (Prior *et al.*, 2003). Se mezclaron 25 μ L de estándar (ácido gálico, ácido cafeico, vainillina y trolox que es el reactivo comúnmente utilizado para esta prueba) o muestra, 25 μ L de AAPH 153 mM y 150 μ L de fluoresceína 50nM en cada pozo de una placa oscura de 96 pozos e incubada a 37°C en un lector de placas. Se realizaron lecturas de fluorescencia automáticamente cada minuto durante 90 minutos. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

Los datos obtenidos se procesaron para el cálculo del área bajo la curva cinética (ABC) y el área bajo la curva neta (ABC neta) y a partir de estos datos se construyeron las curvas de calibración. Se calcularon los equivalentes de ácido cafeico, ácido gálico y vainillina para cada polifenol y extracto a partir la curva de calibración de cada estándar.

Para calcular el ABC se utilizó el método de los trapecios (Rojas & Cañizares, 2013) con la siguiente formula:

$$ABC = \left(\frac{(y_0 + y_1)}{2} \times 1 \right) + \left(\frac{(y_1 + y_2)}{2} \times 1 \right) + \dots + \left(\frac{(y_{89} + y_{90})}{2} \times 1 \right)$$

Donde y_0 es la lectura de fluorescencia inicial, $y_1, y_2 \dots y_{90}$ corresponde a la lectura de fluorescencia a los diferentes tiempos de incubación de 1,2,..., hasta 90 minutos.

2.4.3) Ensayos de viabilidad en la línea celular LLC-PK1 expuesta a compuestos fenólicos y extracto de vainilla

A continuación se describen los ensayos de viabilidad en células. Como primer paso se determinó la estabilidad de los compuestos fenólicos en medio

DMEM y se describen los ensayos de viabilidad con RN y MTT para evaluar el efecto de los mismos y el extracto de vainilla en la viabilidad de la línea LLC-PK1. Posteriormente se describen los ensayos para evaluar protección de las células frente a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno.

2.4.3.1) Estabilidad de los compuestos fenólicos en el medio de cultivo

Con el fin de asegurar la estabilidad de los compuestos fenólicos en los experimentos con cultivos celulares, se evaluó la concentración de cada uno de ellos en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) a los mismos tiempos y concentraciones que se expusieron a las células. La determinación se hizo a la longitud de onda de máxima absorción de cada compuesto en medio alcalino (pH= 10) utilizando las curvas de calibración correspondientes. Para determinar la concentración de cada una de las disoluciones estándar de los compuestos fenólicos en DMEM se midió la absorbancia a la longitud de onda correspondiente. Se midió un blanco de DMEM para eliminar la interferencia debida al medio de cultivo. Cada determinación se realizó por triplicado. Se midió un blanco de DMEM para eliminar la interferencia debida al medio de cultivo. Para calcular el porcentaje de recuperación, las concentraciones calculadas de cada compuesto fenólico a las 72 h de incubación se dividieron por la concentración calculada en el tiempo cero.

2.4.3.2) Ensayos de viabilidad

Se cultivaron células epiteliales de riñón de cerdo LLC-PK1 en medio DMEM conteniendo 0.1 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera que consiste en 5% CO₂ y 95% aire a 37°C. Una vez cultivadas hasta una confluencia entre 80-90 %, se despegaron de su superficie de cultivo con una disolución de tripsina-EDTA y se contaron en cámara de newbauer. Se sembraron aproximadamente 10000 células por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron durante 24h previo a la exposición de los compuestos fenólicos.

Al mismo tiempo, se prepararon las siguientes disoluciones estándar de en medio DMEM sin suero: VAI (0.06 - 6.57mM), PHB (0.08 - 8.19 mM), AVAI (0.06 - 5.95 mM), APHB (0.07 a 7.24 mM) y de extracto de vainilla (0.05 – 1.5 mM expresado como [VAI]) (la elaboración del extracto se describe en el ANEXO 1). Se retiró el medio de cultivo de los pozos y se expusieron a las células 100µL de cada uno de los estándares de los compuestos fenólicos y del extracto de vainilla por

triplicado y se incubaron durante 24, 48 y 72h. Posteriormente se midió la viabilidad usando el método de RN y MTT.

El método de RN se realizó de la siguiente manera: transcurrido el tiempo de incubación con los compuestos evaluados, se retiró el medio con los tratamientos de las células, se lavaron con PBS y se les adicionó 100µL de medio DMEM con rojo neutro 50 µg/mL. Se incubó la placa de 96 pozos a 37°C durante 3 h y después se retiró el rojo neutro. Después, se agregaron 100 µL de disolución de formolcalcio (0.5% de formaldehído, 1.0% de CaCl₂) y se retiraron aproximadamente 10 segundos después. Posteriormente, se agregaron 150 µL de una disolución acético-etanol (1% ácido acético, 50% etanol) a cada pozo y se agitó la placa manualmente durante 15 min. La solución resultante de cada pozo fue transferida a una microplaca de 96 pozos vacía y se leyó en un lector de placas a 540 nm.

El porcentaje de células viables en la población celular a cada una de las diferentes concentraciones de los estándares de ensayo y extracto (respecto a las células control), se calculó por medio de la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia promedio de células tratadas}}{\text{Absorbancia promedio de las células control}} \times 100$$

El ensayo de MTT se realizó de la siguiente manera: transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio a las células, se lavaron con PBS y se les adicionó 100µL de medio DMEM con MTT 1mg/mL (dilución 1:10 en DMEM a partir de la disolución madre de MTT 10mg/mL en PBS). Se incubó la microplaca a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se retiró el medio de los pozos y los cristales de formazán precipitados fueron disueltos con HCl 0.04N en isopropanol y se midió la absorbancia en un lector de placas a 570nm. Los datos se expresaron como porcentaje de reducción del MTT generado por las células tratadas respecto a las células sin tratar (control).

Los valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) se calcularon mediante una regresión no lineal de 4 parámetros (ANEXO 4) utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.01)

2.4.3.2.1) Repetibilidad y reproducibilidad del ensayo de viabilidad en macroescala

Se evaluó la precisión de los ensayos de viabilidad por rojo neutro y MTT con base en la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio. Para ello se evaluó la citotoxicidad de VAI y PHB por triplicado en 4 experimentos independientes durante 24, 48 y 72h por los métodos de RN y MTT. La repetibilidad y reproducibilidad se determinó por cada concentración estudiada de polifenol mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (Miller, J. N., & Miller, 2002) se calculó la precisión de la metodología. En el ANEXO 6 se muestra un ejemplo del cálculo de estos valores.

2.4.4) Estudios de protección antioxidante por compuestos fenólicos y extracto de vainilla en células LLC-PK1 sometidas a daño oxidativo por H₂O₂

2.4.4.1) Estudio de la estabilidad de H₂O₂ en medio DMEM

Para determinar la capacidad de protección de los compuestos fenólicos y extracto de vainilla en células tratadas por H₂O₂, primero se evaluó la estabilidad de H₂O₂ en medio DMEM utilizando el ensayo de Fe³⁺-naranja de xilenol (FOX). Este ensayo se basa en la reacción entre: el peróxido de hidrógeno y el ion ferroso (Fe²⁺) oxidándolo a la forma férrica (Fe³⁺) la cual se une al “Naranja de xilenol”, formando un complejo colorido con absorción máxima a 560 nm (Long et al., 1999). Para este ensayo se prepararon los siguientes reactivos: 100mL de 2,6-bis (1,1-dimetil)-4-metilfenol (BHT) 4 mM en metanol grado HPLC (reactivo 1) y 25 mL de disolución de naranja de xilenol 1mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM en ácido sulfúrico 250 mM (reactivo 2). El reactivo de trabajo se preparó mezclando 9 volúmenes del reactivo 1 con un volumen de reactivo 2.

Se construyó una curva de calibración de H₂O₂ a partir reactivo comercial cuya concentración (10.218M) fue normalizada mediante titulaciones con permanganato de potasio. Se preparó una disolución madre 1 mM y a partir de esta disolución se prepararon estándares en un intervalo de concentraciones de 2.5 hasta 600 µM de H₂O₂. Se colocaron 90 µL de cada uno de los estándares y un blanco con agua destilada, 10µL de metanol grado HPLC y 900 µL del reactivo de trabajo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se agitaron los tubos por 5 segundos, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a

15000 rpm durante 10 min. Se depositaron 200µL de cada tubo Eppendorf en una placa de 96 pozos y se leyó la placa a 560nm en un lector de placas.

Se prepararon disoluciones de peróxido en un intervalo de 200-2000 µM, en DMEM y se introdujeron en un baño de agua a 37°C. Se determinó el contenido de peróxido desde el tiempo 0, hasta 4h de incubación.

2.4.4.2) Evaluación de la protección celular por compuestos fenólicos y extracto de vainilla frente a daño oxidativo por H₂O₂

Previo a evaluar el efecto de los compuestos fenólicos y extracto en células, primero se estudió la muerte celular inducida únicamente por H₂O₂. Para ello se sembraron células LLC-PK1 en placa de 96 pozos y se incubaron durante 24h. Se retiró el medio y a cada pozo se añadió 100µL de medio DMEM sin suero y se incubaron nuevamente por 24h. Se prepararon disoluciones de H₂O₂ en medio DMEM en un intervalo de 250 a 2500 µM tomando las alícuotas necesarias del peróxido de hidrógeno normalizado. Se expuso 100µL por pozo de cada disolución de H₂O₂ en las células; se incubó la placa durante 0.5, 1, 2 ,4 y 24h evaluando la viabilidad celular con rojo neutro por cada tiempo de exposición

La evaluación del efecto protector en células se llevó a cabo mediante modelos de incubación preliminar e incubación simultánea. En el modelo de incubación preliminar, los compuestos fenólicos están expuestos en las células antes del agente oxidante, es decir, los reactivos no están en contacto directo. En contraste, en el modelo de incubación simultánea es cuando el oxidante y los compuestos fenólicos están expuestos en las células al mismo tiempo. En el modelo de incubación preliminar se promueve la activación del mecanismo antioxidante intracelular inducido por los compuestos fenólicos, mientras que en el modelo de incubación simultánea se evalúa la eliminación directa de especies reactivas y / o la actividad quelante de metales (Ávila *et al.*, 2017).

Para ello se sembraron las células LLC-PK1 en placas de 96 pozos y se incubaron durante 24h. Se prepararon disoluciones de VAI y PHB (0.1-2 mmol / L), AVAI y APHB (0.01-8 mmol / L) y de extracto de vainilla (0.05-1 mmol / L) en medio DMEM. Así, se evaluó: a) la viabilidad de las células tratadas con los compuestos fenólicos y H₂O₂, b) la viabilidad de las células tratadas solo con el agente oxidante y c) la viabilidad de las células tratadas solo con los fenoles. Se realizaron dos experimentos diferentes y se utilizaron tres controles:

Experimento 1 (incubación preliminar): se incubaron las células en medio DMEM sin SFB con los compuestos fenólicos y extracto de vainilla durante 24h. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con 200 μ L de PBS, y se añadieron 100 μ L de H₂O₂ 0.75 mmol /L en DMEM incubando la placa durante 4h.

Experimento 2 (incubación simultánea): se expusieron los compuestos fenólicos y extracto en las células por 24h, se adicionaron 100 μ L de H₂O₂ 1.5 mmol /L sin retirar el medio con los fenoles y luego las células se incubaron por 4h. Posteriormente en ambos experimentos se retiró el medio con H₂O₂ y se determinó la viabilidad mediante el método de rojo neutro.

Para estos estudios fue necesario utilizar:

Control 1 (control de experimento 1): las células se incubaron con 100 μ L de DMEM sin SFB durante 24 h, se eliminó el medio y las células se expusieron a 100 μ L de 0.78 mmol / L de H₂O₂ durante 4 h y luego se midió la viabilidad celular.

Control 2 (control de experimento 2): después de 24 h de incubación de las células en 100 μ L de DMEM sin SFB, se agregaron 100 μ L de 1.59 mmol / L H₂O₂ en DMEM sin eliminar el medio y se incubaron durante 4 h. Después de eso, se desechó el medio y se midió la viabilidad celular.

Control 3 (Control del efecto de compuestos fenólicos): las células se expusieron a DMEM que contenía los compuestos fenólicos (VAI, PHB, AVAI o APHB) o en concentraciones de 0.1 mol/L a 2.0 mmol / L y de extracto de vainilla en concentraciones de 0.05 a 1 mmol / L durante 24 h. Después se descartó el medio y se midió la viabilidad celular.

2.4.5) Implementación del análisis de imágenes por Image J para evaluar viabilidad

Se implementó un método de análisis de imágenes de células evaluadas por NR y MTT mediante Image J como una alternativa al uso de espectrofotometría para medir la viabilidad celular. Para comparar los resultados obtenidos con Image J con los obtenidos con el método espectrofotométrico, estas evaluaciones se hicieron en macroescala. Para ello se sembraron células LLC-PK1 y T24 en placas de 96 pozos y se preincubaron durante 24h. Posteriormente, se expusieron a vainillina (0.07- 6.57mM) y se incubaron las células durante 24h. Luego se les retiró el medio con los tratamientos, se les administró el medio con el rojo neutro o MTT, según el caso, y se incubó la placa por 3h. Luego, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS y nuevamente se adicionó 100 μ L de PBS

para tomar las imágenes de las células en cada pozo. Las imágenes de los pozos se tomaron mediante una cámara acoplada a un microscopio (Nikon) utilizando el software *NIS elements F.230* (Nikon) para el registro de imágenes. Los resultados de las imágenes teñidas con el rojo neutro o con MTT se compararon con imágenes de células no expuestas a vainillina, para evaluar viabilidad.

Las imágenes de cada pozo se analizaron con el software Image J. Este programa analizó las imágenes con base en la proporción de células teñidas con rojo neutro o al formazán producido. Como blanco se utilizaron pozos con los reactivos sin células. Cada imagen se convirtió a escala de grises y se ajustó el umbral (*Threshold*) para resaltar el área de las células, excluyendo el fondo de la imagen. Se crea una versión binaria de la imagen mostrando en negro las zonas que se resaltaron y en blanco el fondo de la imagen y se determina el área total que ocupan las células. Posteriormente, se comparó el área de la imagen teñida correspondiente a cada tratamiento con el área teñida de las imágenes de las células control (sin tratamiento). El porcentaje de viabilidad se determinó con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Área resaltada promedio de células tratadas}}{\text{Área resaltada promedio de las células control}} \times 100$$

2.5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS A MACROESCALA

2.5.1) Capacidad antioxidante por el método ORAC

En el ANEXO 2 se muestran las curvas de calibración realizadas para este ensayo. El ácido cafeico tuvo mayor sensibilidad, seguido del ácido gálico y de vainillina. El compuesto que tuvo la menor sensibilidad fue trolox. No obstante, este compuesto es ampliamente utilizado como estándar en este tipo de ensayos, posiblemente por su mayor intervalo lineal.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se expresó como μmol de equivalentes de trolox / μmol de polifenol; mientras que la del extracto de vainilla se expresó en μmol equivalentes de trolox / g de vaina (Tabla 1). Los resultados mostraron que VAI tiene la mayor capacidad antioxidante siendo 11 veces mayor que AVAI; mientras que APHB fue 3 veces mayor que PHB. En conclusión, el PHB tiene la menor capacidad antioxidante. Por otro lado, la capacidad antioxidante del extracto de vainilla fue mayor que la de cada uno de los

compuestos por separado. Fue casi el doble que VAI y 22.30 veces más que AVAI (el segundo polifenol con mayor capacidad antioxidante).

Tabla 1. Resultados de capacidad antioxidante mediante el método de ORAC

Compuesto	Capacidad antioxidante*(μmol de equivalentes Trolox / μmol de compuesto o g. de vaina)
VAI	3179.71 \pm 279.05
AVAI	276.68 \pm 24.67
PHB	12.74 \pm 0.95
APHB	37.76 \pm 8.55
Extracto de vainilla	6172.17 \pm 487.62

* Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos diferentes

2.5.2) Estudios del efecto de compuestos fenolicos y extracto de vainilla en células LLC-PK1 cultivadas a macroescala

2.5.2.1) Estabilidad de compuestos fenólicos en medio de cultivo DMEM (control sin células)

En el ANEXO 3 se presentan las curvas de calibración de compuestos fenólicos a sus respectivas longitudes de onda de máxima absorción, las cuales fueron empleadas para la cuantificación de los compuestos en DMEM.

En la Tabla 2 se presentan las concentraciones obtenidas de las disoluciones de cada estándar en medio DMEM. Se muestra que los porcentajes de recuperación de los compuestos fenólicos a las 72h de almacenamiento fue de $100.93 \pm 3.85\%$ (valores asociados a la incertidumbre del método). Por lo tanto, los compuestos mantuvieron estabilidad en el medio de cultivo a los tiempos y concentraciones estudiadas con células. Es importante comprobar la estabilidad de los compuestos en estudio ya que se ha reportado que ciertos compuestos polifenólicos pueden ser citotóxicos en líneas celulares debido a la generación de H_2O_2 subsecuente a la oxidación de estos compuestos por iones metálicos como Fe^{3+} , presentes en el medio de cultivo (Halliwell, 2014).

Tabla 2. Estabilidad de disoluciones de VAI, PHB, AVAI y APHB en DMEM al tiempo 0 y después de 72h

Compuesto	Concentración teórica(mM)	Concentración experimental (h)		% de recuperación
		0 h	72 h	
VAI	0.07	$0.07 \pm 3 \times 10^{-3}$	$0.073 \pm 3 \times 10^{-3}$	97.1%
	0.66	0.64 ± 0.02	$0.67 \pm 5 \times 10^{-3}$	104%
	6.57	6.57 ± 0.03	6.58 ± 0.04	100%
PHB	0.08	$0.09 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0.09 \pm 1 \times 10^{-3}$	106%
	0.82	$0.84 \pm 6 \times 10^{-3}$	$0.880 \pm 4 \times 10^{-3}$	104%
	8.19	8.76 ± 0.05	8.93 ± 0.02	102%
AVAI	0.06	$0.05 \pm 4 \times 10^{-3}$	$0.049 \pm 3 \times 10^{-3}$	91.4%
	0.59	$0.57 \pm 2 \times 10^{-3}$	$0.57 \pm 1 \times 10^{-3}$	101%
	5.95	5.72 ± 0.07	5.79 ± 0.01	101%
APHB	0.36	$0.33 \pm 3 \times 10^{-3}$	$0.337 \pm 4 \times 10^{-3}$	101%
	0.72	$0.68 \pm 9 \times 10^{-3}$	$0.71 \pm 4 \times 10^{-3}$	104%
	3.37	$3.38 \pm 8 \times 10^{-3}$	3.37 ± 0.07	99.7%

2.5.2.2) Evaluación de la viabilidad celular en macroescala

De la Figura 2-1 a la Figura 2-4 se muestran los datos de viabilidad de la línea celular LLC-PK1, en función de la concentración de compuestos fenólicos. Los datos fueron obtenidos por el método de rojo neutro y MTT. Los aldehídos (VAI y PHB) mostraron una citotoxicidad más alta que los ácidos AVAI y APHB. Los ácidos fenólicos, particularmente AVAI, mostraron citotoxicidad a altas concentraciones y largos tiempos de exposición (48 h y 72 h). Sin embargo, la viabilidad no disminuyó más del 50% (Figura 2-3). De manera general, los resultados obtenidos por el ensayo de RN fueron comparables a los obtenidos por el ensayo MTT, aunque en ciertos casos, hubo discrepancias entre ambos métodos. Por ejemplo, al evaluar APHB (7.24 mM) se determinó un 66% de viabilidad por RN mientras que por MTT el valor fue 88%. Posiblemente estas variaciones sean debido a factores intrínsecos de las células, variaciones en el número de células sembradas por pozo debido a variaciones en el pipeteo y/o conteo celular, y al

error asociado al instrumento analítico (lector de placas), entre otros (Petersen *et al.*, 2019).

La Tabla 3 muestra los valores de IC₅₀ para VAI y PHB expuestos durante 24, 48 y 72 h de acuerdo con los porcentajes de viabilidad en ambas líneas celulares usando los métodos rojo neutro y MTT. Para determinar la IC₅₀ de VAI y PHB a 24h de exposición se tomó en cuenta los datos de una nueva serie de experimentos aumentando el intervalo de concentraciones estudiado (ANEXO 5). Los resultados muestran que no hubo diferencia significativa entre métodos para la estimación de la citotoxicidad de VAI y PHB. Por otro lado, para AVAI y APHB no fue posible determinar los valores de IC₅₀ correspondientes porque la viabilidad celular era superior al 50% en el intervalo de concentraciones estudiadas.

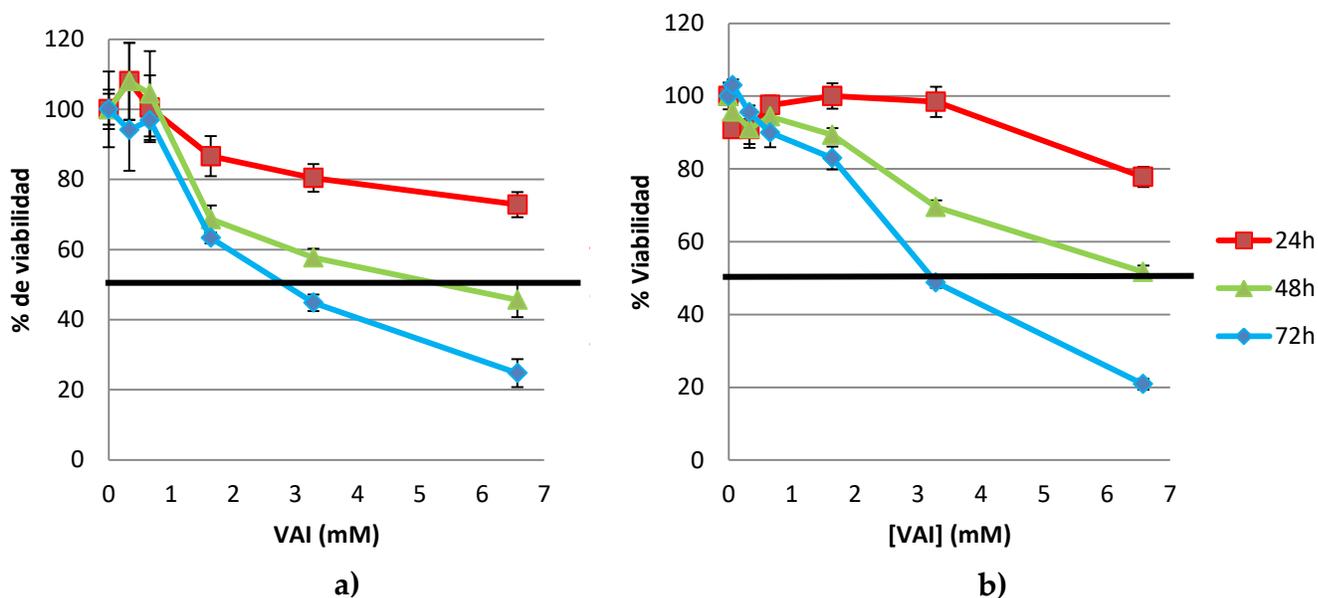
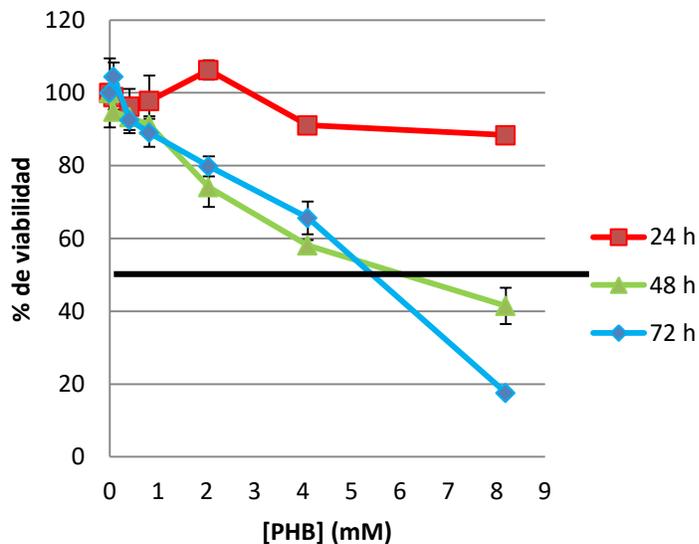
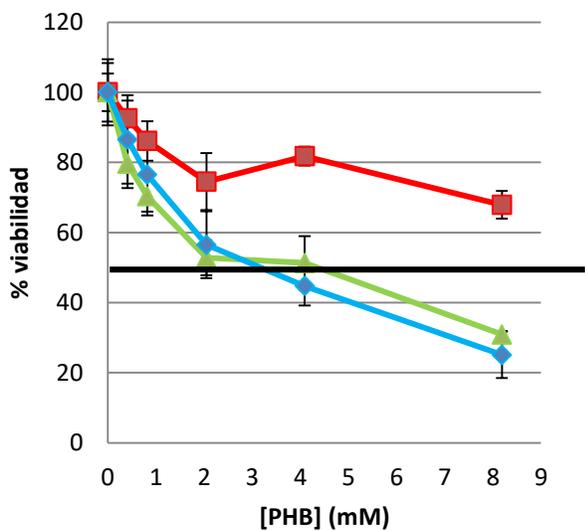


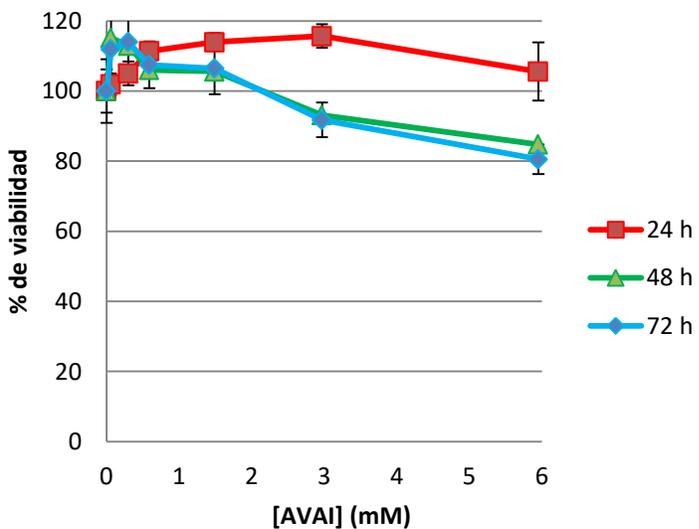
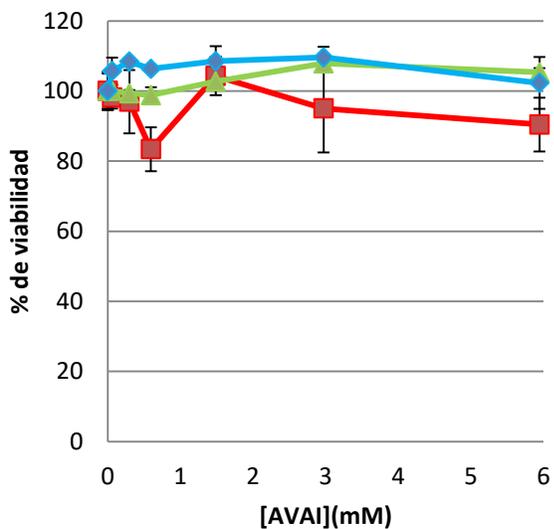
Figura 2-1. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de VAI durante 24, 48 y 72h de exposición: a) ensayo NR; b) ensayo MTT



a)

b)

Figura 2-2. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de PHB durante 24, 48 y 72h de exposición: a) ensayo NR; b) ensayo MTT.



a)

b)

Figura 2-3. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de AVAI durante 24, 48 y 72h de exposición: a) ensayo NR; b) ensayo MTT.

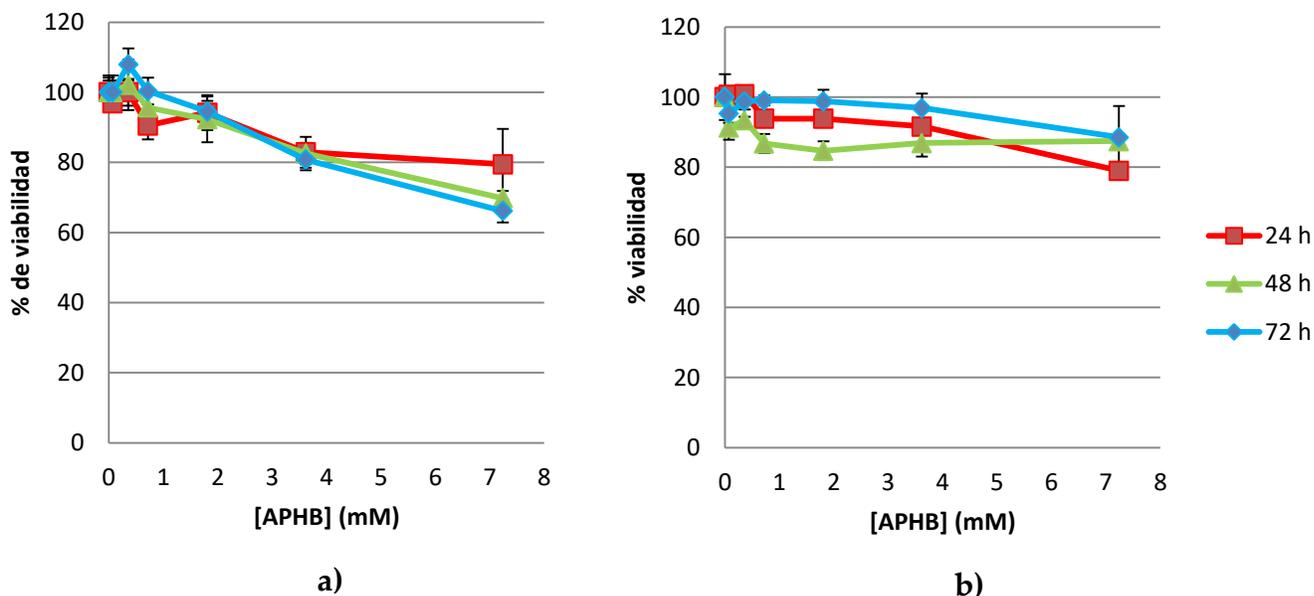


Figura 2-4. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de APHB durante 24, 48 y 72h de exposición: a) ensayo NR; b) ensayo MTT

Tabla 3. Valores de concentración media inhibitoria (IC_{50}) de VAI y PHB en función del tiempo de exposición, en la línea celular LLC-PK1 con los métodos rojo neutro y MTT.

Tiempo de exposición(h)	Ensayo	Compuesto	
		VAI	PHB
24	NR	9.29 ± 3.04	8.96 ± 1.65
	MTT	7.35 ± 1.02	9.22 ± 2.34
48	NR	3.29 ± 0.86	4.09 ± 0.97
	MTT	6.04 ± 1.10	5.53 ± 1.04
72	NR	2.45 ± 0.35	2.69 ± 0.22
	MTT	4.17 ± 0.50	3.83 ± 0.40

Por otra parte, la Figura 2-5 muestra los datos de viabilidad celular en función de la concentración de VAI (en el extracto de vainilla), para comparar estos resultados con los del estándar de vainillina. La Tabla 4 muestra los valores de IC_{50} para el extracto mediante los ensayos de RN y MTT. En términos generales, la citotoxicidad del extracto es mayor que la del estándar VAI. En las primeras 24 h de exposición, la viabilidad celular fue de 33.17% al ser expuestas al extracto de

vainilla 1.5 mM [VAI], mientras que para el estándar de VAI 1.64 mM fue de 86.64%. Por lo tanto, la citotoxicidad en el extracto fue mayor que para el estándar de VAI, quizá porque en el extracto se encuentran cientos de compuestos además de VAI que contribuyen al sabor y aroma, los cuales en altas concentraciones podrían resultar tóxicos para las células (Bezerra *et al.*, 2016). Entre los compuestos no volátiles reportados para el extracto se encuentran: taninos, compuestos fenólicos, aminoácidos libres y resinas. Entre los compuestos volátiles se encuentran: alcoholes carbonilaromáticos y alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, fenoles, lactonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, terpenoides, etc., que aumentan la capacidad antioxidante (Rojas-López & Cañizares-Macías, 2013).

Los resultados obtenidos dan sustento a lo reportado para vainillina ya que ha sido descrita como un agente citotóxico en las líneas celulares de fibroblastos de ratón 3T3, células A2780-SC1 (de cáncer de ovario), HT-29 y SW480 (cáncer colorrectal), HepG2 (cáncer de hígado) y HeLa (cáncer de cuello uterino). No obstante, su potencial como agente citotóxico en las células cancerosas requiere de altas concentraciones añadidas del compuesto (rango de mmol / L) (Bezerra *et al.*, 2016). Se ha propuesto que puede mejorar la eficacia de los compuestos quimioterapéuticos como el tamoxifen o la doxorubicina, ya que estos en combinación con VAI aumentan el efecto citotóxico en las células cancerosas causando menos daño en las células sanas (Elsherbiny *et al.*, 2016; Pedroso *et al.*, 2013).

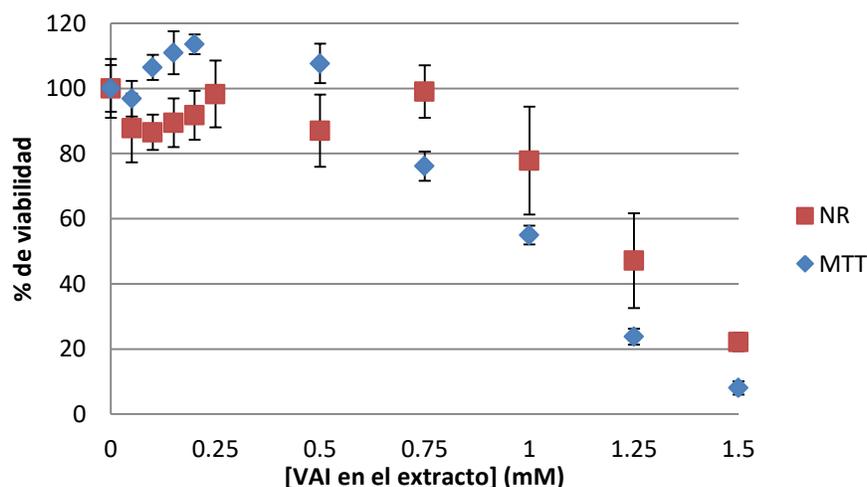


Figura 2-5. Viabilidad de las células LLC-PK1 en función de la concentración de VAI en el extracto de vainilla

Tabla 4. Valores de IC₅₀ del extracto de vainilla (24h de exposición)

Ensayo	IC₅₀ (mmol /L)
Rojo neutro	1.211 ± 0.03
MTT	1.016 ± 0.04

Estos datos fueron estadísticamente similares con base a la prueba t de student (P<0.05)

2.5.2.3) Repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad celular

En este trabajo se evaluó la variación, dentro de un mismo día, del porcentaje de viabilidad obtenido por el mismo analista e instrumento (repetibilidad) así como la variación de los porcentajes de viabilidad obtenidos en diferentes días (reproducibilidad intralaboratorio).

La Tabla 5 presenta los valores de repetibilidad y reproducibilidad para los estudios con VAI y PHB en función de la concentración y tiempo de exposición empleando los ensayos de RN y MTT. En el ANEXO 4 se muestra un ejemplo de cálculo de estos valores. Cabe mencionar que la viabilidad, en ciertos casos, es aproximadamente del 110%. Sin embargo, teniendo en cuenta que la reproducibilidad en los ensayos de viabilidad era de alrededor del 15%, los valores mostrados se encuentran dentro de la incertidumbre del método. Los resultados muestran, en la mayoría de casos, que a mayores tiempos de exposición (72h) disminuye la precisión; debido a que a las 72 h la citotoxicidad de los compuestos aumenta y la población es menor, aumentando la variabilidad y disminuyendo la sensibilidad. Con los datos de la Tabla 5 se realizó un análisis de varianza para comparar de precisión de los métodos de RN y MTT en ambas líneas células. Con esta prueba se demostró que no hay diferencia significativa entre los valores de repetibilidad y reproducibilidad de cada método.

Tabla 5. Repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad con vainillina usando rojo neutro y MTT

[VAI] (mM)	Tiempo (h)	LLCPK1			
		Repetibilidad (%)		Reproducibilidad (%)	
		NR	MTT	NR	MTT
0.33	24	7.97	8.54	10.31	9.58
	48	10.04	10.54	12.61	12.05
	72	10.81	14.95	10.69	16.93
0.66	24	9.31	6.96	11.28	7.12
	48	8.55	9.46	10.97	14.64
	72	9.15	6.76	10.18	9.74
1.64	24	5.49	5.93	14.04	11.22
	48	7.14	11.31	16.68	17.33
	72	11.18	3.62	14.13	9.77
3.29	24	5.02	5.76	10.93	8.85
	48	3.55	7.88	19.24	20.73
	72	7.50	7.37	18.59	22.19
6.57	24	5.96	6.91	17.70	15.68
	48	8.93	10.03	37.55	30.35
	72	15.39	11.10	36.92	31.79

2.5.2.4) Protección de compuestos fenólicos y extracto de vainilla frente a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno en células LLC-PK1

Teniendo en cuenta el resultado de la capacidad antioxidante de los monofenoles y extracto de vainilla, se estudió su efecto protector en la línea celular LLC-PK1 expuesta a peróxido de hidrógeno. Este compuesto es utilizado como oxidante en los ensayos basados en células debido a su ubicuidad en los sistemas biológicos, su solubilidad, y la capacidad que tiene de inducir muerte celular (Nascimento da Silva *et al.*, 2016).

El parámetro utilizado para evaluar la capacidad citoprotectora fue la viabilidad celular. Algunos compuestos pueden no tener la capacidad de captación de radicales libres, pero pueden tener un efecto positivo en la defensa contra oxidantes a nivel intracelular (Nascimento da Silva *et al.*, 2016). Una consecuencia de esto es el aumento de la viabilidad celular en función de la concentración de antioxidante. El estudio de la capacidad protectora contra el daño celular inducido por oxidación puede llevarse a cabo a través de los modelos de incubación preliminar e incubación simultánea.

El peróxido de hidrógeno es un compuesto que se degrada fácilmente, lo cual puede influir en su citotoxicidad. Por lo que se estudió la estabilidad de H₂O₂ a diferentes concentraciones en el medio de cultivo utilizando el método FOX. En el ANEXO 7 se muestra la curva de calibración para este ensayo. La Figura 2-6 muestra la concentración de final de peróxido con respecto a su concentración inicial en medio DMEM a diferentes tiempos de incubación (37 °C). En todas las concentraciones estudiadas, el decaimiento de la concentración de peróxido se da en los primeros 25 minutos, y después se mantiene relativamente estable. A partir de estos resultados, se determinó un tiempo de estabilización de los estándares de H₂O₂ de 30 minutos para evaluar su citotoxicidad.

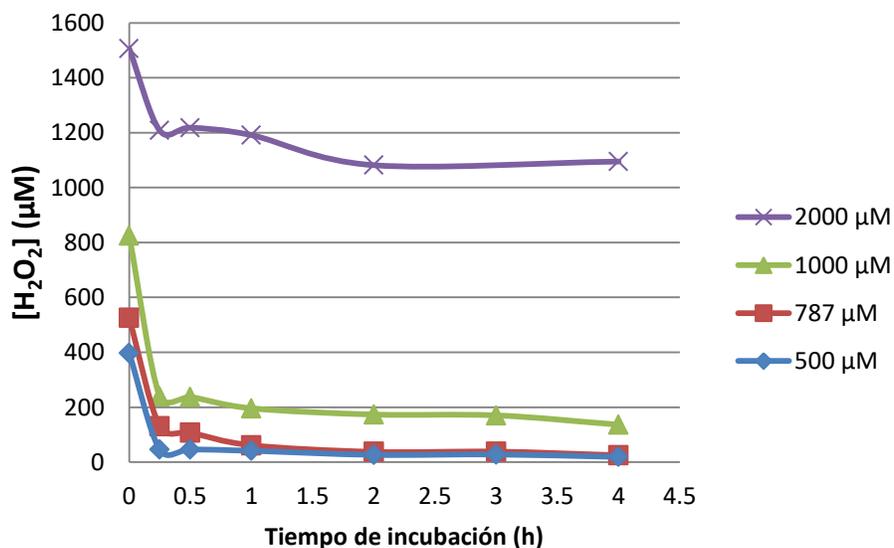


Figura 2-6. Concentración de peróxido en medio DMEM en función del tiempo

La Figura 2-7 presenta la viabilidad celular (medida por rojo neutro) de LLC-PK1 expuesta a H₂O₂ a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Se observa que al aumentar el tiempo de exposición se incrementa la muerte celular.

A una concentración de H_2O_2 de $2500 \mu\text{M}$ la viabilidad a los 30 minutos es del 70% y disminuye al 50% 30 minutos después (1 hora). A las 2h la IC_{50} fue de $750\mu\text{M}$, mientras que a las 4h fue de $500\mu\text{M}$. Entre 4 y 24h ya no hubo variación en la IC_{50} , indicando que el máximo daño en las células se logra dentro de las primeras 4 h.

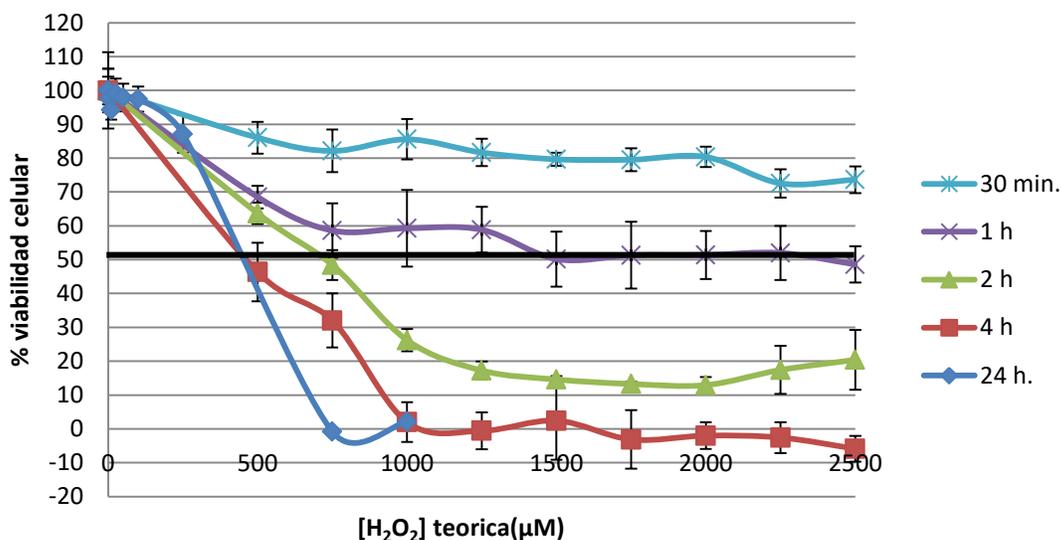


Figura 2-7. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración y el tiempo de exposición de peróxido de hidrógeno

La Tabla 6 muestra los datos de viabilidad de la línea celular LLC-PK1 sometida a los tratamientos con H_2O_2 y los compuestos fenólicos los cuales fueron descritos en la sección 2.4.4.2 (Pág 53). En los experimentos de incubación preliminar y de incubación simultánea con VAI, PHB (0.1 a 1.0 mmol / L) y el oxidante, la viabilidad celular disminuyó a valores similares a los controles. Cuando las células se incubaron con VAI o PHB (2 mM) y peróxido de hidrógeno, la viabilidad disminuyó significativamente con respecto a sus respectivos controles, aumentando la citotoxicidad del oxidante. Por lo tanto, se concluyó que los aldehídos VAI y PHB no protegieron a las células.

Por otro lado, los ácidos presentaron un efecto protector solamente en las condiciones de incubación simultánea. AVAI y APHB (2 mM , 2.67 veces mayor respecto a la concentración de H_2O_2 utilizada) mostraron una viabilidad de $57.48 \pm 3.86 \%$ y $51.39 \pm 7.07 \%$, respectivamente. Lo que significó un incremento del 22% y 16% en comparación con el control de incubación simultánea ($35.30 \pm 5.9\%$). Se probaron concentraciones más altas de ambos compuestos con el fin determinar la concentración máxima de los ácidos con efecto citoprotector. En la Figura 2-8 se muestra que para AVAI el efecto protector se mantuvo hasta una concentración

2mM (2.67 veces respecto a [H₂O₂]), mientras que a concentraciones mayores la viabilidad celular disminuye. Esto posiblemente es debido a que en altas concentraciones, AVAI sea citotóxico en combinación con H₂O₂. En el caso de APHB, la viabilidad se mantuvo constante en un intervalo de 6-8mM (8 y 10.67 veces mayor respecto a [H₂O₂]). Con base en esto se concluye que el AVAI y APHB tienen un efecto citoprotector en células dañadas con peróxido de hidrógeno.

Tabla 6. Viabilidad de la línea celular LLC-PK1 expuesta a los diferentes compuestos fenólicos y H₂O₂ usando rojo neutro como método de ensayo

Tratamiento	Concentración (mM)			
	0.1	0.5	1	2
VAI^a	99.18 ± 4.70	95.91 ± 5.31	94.79 ± 3.41	79.14 ± 4.52
Incubación preliminar ^a	42.51 ± 2.54	50.37 ± 2.20	51.31 ± 3.52	36.65 ± 3.64
Incubación simultánea ^b	39.75 ± 3.56	34.91 ± 5.99	26.06 ± 3.36	25.33 ± 3.92
PHB^a	100.51 ± 2.57	95.81 ± 2.55	100.31 ± 3.48	79.35 ± 5.96
Incubación preliminar ^a	38.53 ± 3.85	48.80 ± 5.33	43.87 ± 6.97	49.34 ± 4.45
Incubación simultánea ^b	43.15 ± 1.45	43.03 ± 11.85	33.33 ± 2.38	28.85 ± 4.52
AVAI^a	100.87 ± 5.60	101.65 ± 1.41	96.22 ± 3.45	96.51 ± 3.30
Incubación preliminar ^a	43.36 ± 2.57	46.98 ± 2.96	45.88 ± 2.19	47.89 ± 2.64
Incubación simultánea ^b	33.09 ± 0.60	35.49 ± 6.03	48.30 ± 3.03	57.48 ± 3.86
APHB^a	100.19 ± 0.92	99.03 ± 3.70	99.13 ± 1.91	92.83 ± 2.42
Incubación preliminar ^a	51.01 ± 6.67	41.35 ± 2.70	40.44 ± 2.92	48.29 ± 5.74
Incubación simultánea ^b	35.37 ± 4.64	39.29 ± 2.21	45.68 ± 3.66	51.39 ± 7.07

* Los valores en negrita son estadísticamente diferentes a sus respectivos controles (p<0.05).

^a Valor del control 1 (Incubación preliminar) = 49.09 ± 3.62 %

^b Valor del control 2 (Incubación simultánea) = 35.30 ± 5.9%

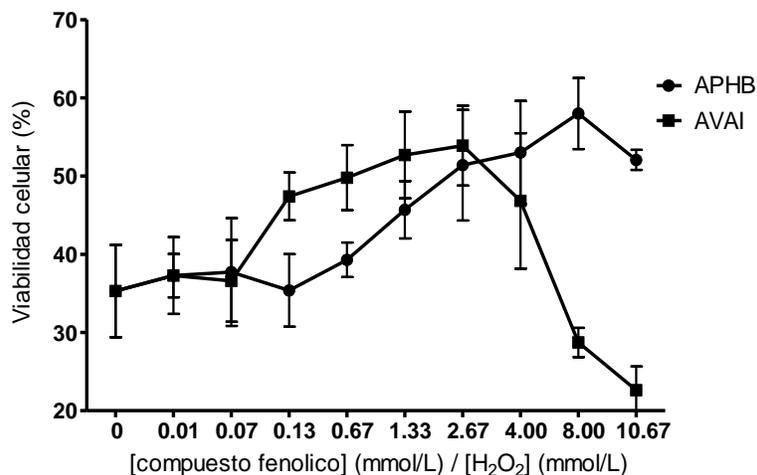


Figura 2-8. Efecto de los ácidos fenólicos APHB y AVAI en la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a H₂O₂ (Condiciones de incubación simultánea).

La Figura 2-9 muestra la viabilidad de las células tratadas con H₂O₂ en función de la concentración del extracto de vainilla en condiciones de incubación preliminar e incubación simultánea. Las células tratadas únicamente con el agente oxidante (sin extracto) tuvieron una viabilidad de $37.42 \pm 7.24\%$ y $31.17 \pm 9.84\%$, respectivamente. Tanto en el experimento de incubación preliminar como el de incubación simultánea, las células fueron protegidas en un 30% indicando que no es necesario que el extracto esté en contacto directo con el agente oxidante para que haya un efecto protector en las células, lo que sugiere un mecanismo indirecto de acción antioxidante. En ambos casos, a mayores concentraciones (mayor a [VAI] 0.6 mM, mayor a 0.8 veces respecto a [H₂O₂]) la viabilidad disminuyó debido a la citotoxicidad del extracto.

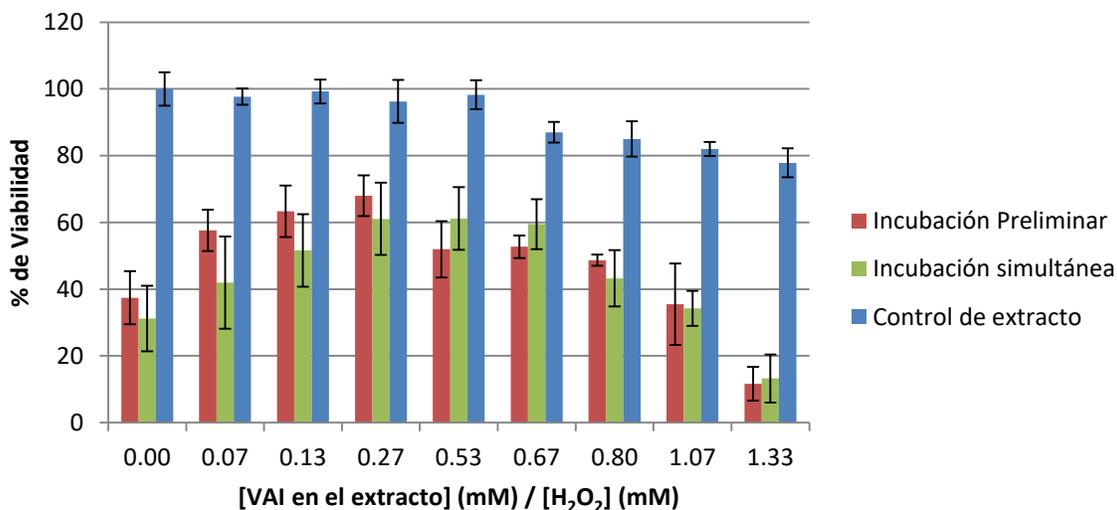


Figura 2-9. % de viabilidad de células LLC-PK1 tratadas con peróxido de hidrógeno y diferentes concentraciones del extracto de vainilla (incubación preliminar y simultánea).

2.5.3) Determinación de viabilidad celular por análisis de imágenes con Image J

Debido al uso de pequeños volúmenes de fluido en los microcanales de los dispositivos de microfluídica resulta difícil realizar mediciones de absorbancia para determinar viabilidad celular. Por esa razón se implementó un método alternativo basado en el análisis de imágenes para determinar viabilidad con los indicadores de RN y MTT en placa de 96 pozos y este método se comparó con el método estándar basado en mediciones de espectrofotométricas. Para evaluar la robustez del método de análisis por Image J se emplearon 2 tipos de líneas celulares, una sana (LLC-PK1) y una cancerosa (T24) cultivadas en placas de 96 pozos. Ambas con diferente sensibilidad a los compuestos fenólicos (Khan *et al.*, 2014). La Figura 2-10 muestra imágenes de células tratadas con y sin VAI durante 24 horas. Se analizaron aproximadamente 385 células por cada imagen correspondiente a las células control. Cualitativamente se confirma que el efecto de VAI fue mayor en la línea T24, ya que a las concentraciones de 3.29 mM hubo un menor número de células viables en comparación con LLC-PK1.

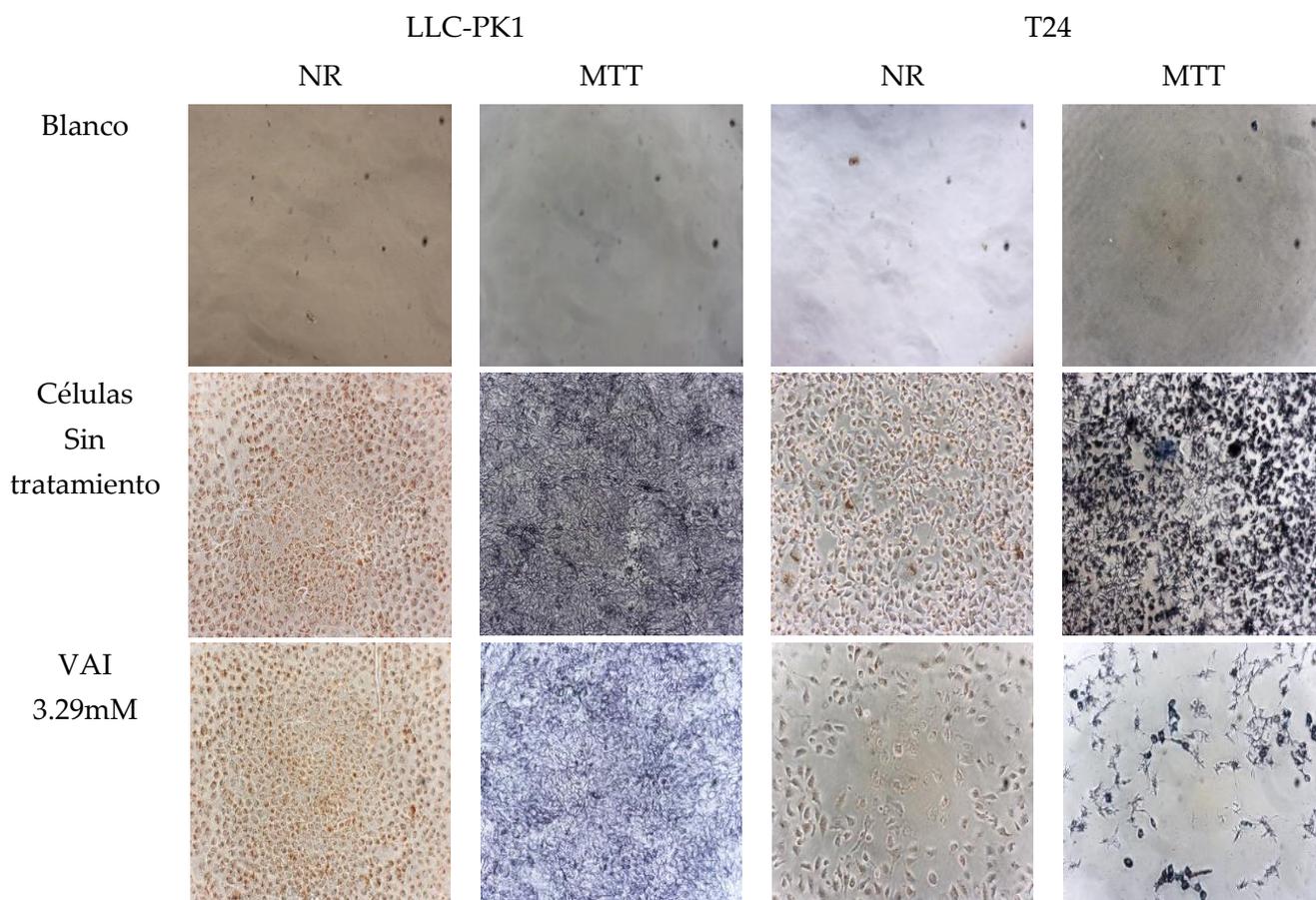


Figura 2-10. Imágenes representativas de células teñidas por RN y MTT empleadas para la determinación de viabilidad por Image J

Los resultados de viabilidad calculados por el método de análisis de imágenes fueron similares a los obtenidos por el método espectrofotométrico utilizando RN (Figura 2-11) y MTT (Figura 2-12). Al analizar estos resultados con la prueba de ANOVA se determinó que no hubo diferencia significativa entre los resultados obtenidos por Image J y espectrofotometría en la línea LLC-PK1. Asimismo, los valores de IC_{50} calculados para la línea T24 fueron similares entre ambos métodos (Tabla 7). Por lo tanto, se concluyó que independientemente de la línea celular utilizada, el análisis de imágenes por Image J puede utilizarse como un método alternativo a la espectrofotometría para medir la viabilidad celular de células cultivadas en los microdispositivos.

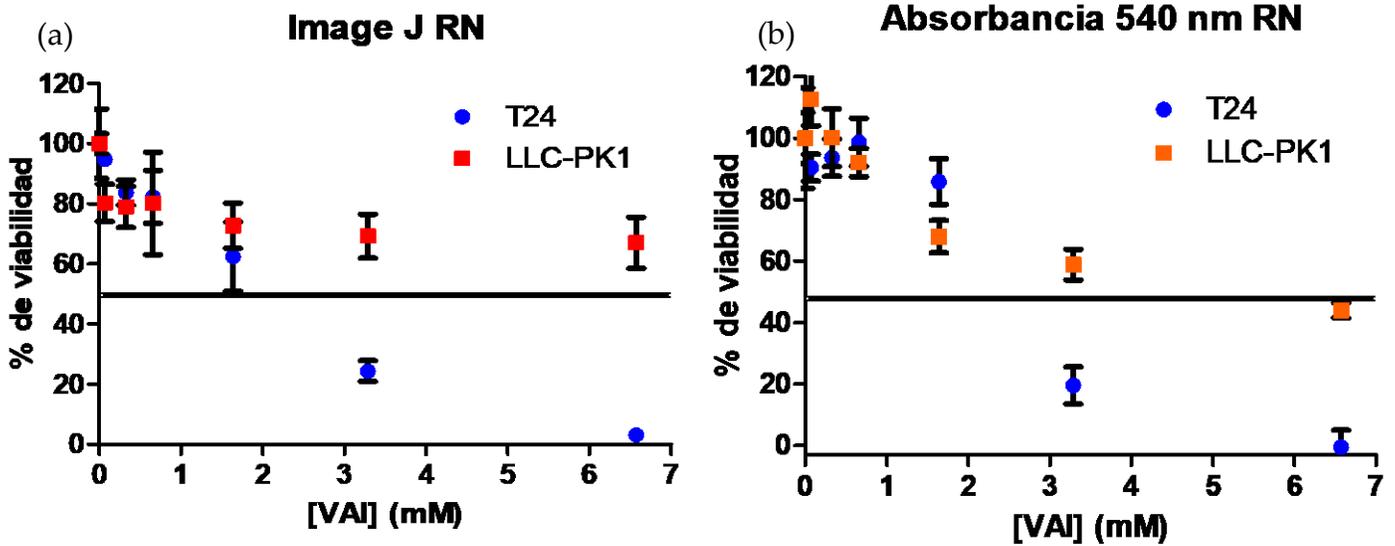


Figura 2-11. Comparación entre el método por Image J (a) y espectrofotométrico (b) para la evaluación de viabilidad de células T24 y LLC-PK1 expuestas a VAI por el método de RN.

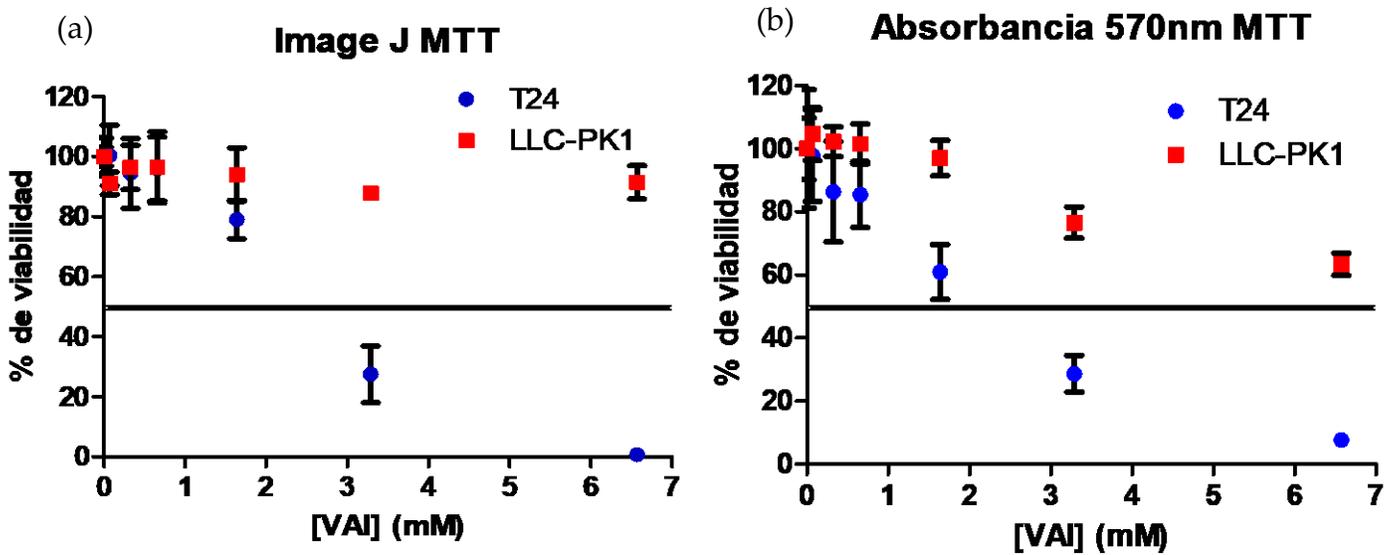


Figura 2-12. Comparación entre el método por Image J (a) y espectrofotométrico (b) para la evaluación de viabilidad de células T24 y LLC-PK1 expuestas a VAI por MTT.

Tabla 7. Valores de IC_{50} de vainillina en células T24 obtenidas mediante Image J y espectrofotometría en los ensayos de rojo neutro y MTT

	Image J	Espectrofotometría
Método	IC_{50} (mM)	IC_{50} (mM)
Rojo Neutro	2.52	2.54
MTT	2.57	2.66

2.6) CONCLUSIONES

Los ensayos químicos para medir capacidad antioxidante permiten clasificar un compuesto en función de su capacidad para proteger una molécula blanco contra un oxidante. Sin embargo, estas pruebas no consideran factores como la biodisponibilidad o la toxicidad celular. Es por ello que los ensayos basados en células son una herramienta complementaria para estudio de antioxidantes, para conocer la capacidad de protección contra el daño oxidativo en un entorno fisiológicamente significativo donde intervienen varias reacciones en la célula. Se ha descrito en la literatura que los compuestos fenólicos presentes en la vainilla natural presentan capacidad antioxidante, pero no había información sobre los efectos que este parámetro tiene en células. En este trabajo se demostró que, aunque VAI tiene más capacidad antioxidante que AVAI en el ensayo químico de ORAC, esto no necesariamente le confiere una mayor capacidad protectora de las células LLC-PK1 cuando se someten a un estrés oxidativo; sino por el contrario, este compuesto era fue más citotóxico. Es decir, los aldehídos fenólicos tienen más efecto citotóxico que su contraparte ácida. La explicación no está del todo clara, pero posiblemente el grupo electronegativo presente en los ácidos polifenólicos disminuye su reactividad en células. El extracto de vainilla natural tiene una citotoxicidad más alta que los compuestos fenólicos, lo cual es muy interesante ya que estos extractos podrían utilizarse para aumentar la toxicidad de compuestos utilizados en la quimioterapia (por ejemplo, cisplatino, doxorubicina, etc.) elevando así su eficacia.

Para evaluar el potencial antioxidante de los compuestos fenolicos en un entorno celular, se puso a prueba el efecto protector contra el daño oxidativo inducido por H_2O_2 . Para ello se midió la viabilidad celular como parámetro de protección. El orden de exposición de los compuestos fenólicos y el H_2O_2 tiene un efecto en la mortalidad de las células. Prueba de esto es el hecho de que los compuestos aldehídos, con una mayor capacidad citotóxica, no protegieron a la línea celular LLC-PK1 contra el daño oxidativo ocasionado por H_2O_2 . En contraste a los ácidos, cuya protección es dependiente de la concentración. Con base a los resultados presentados, es evidente que los extractos naturales de vainilla tienen una mayor prospección como antioxidante en las células.

Finalmente, los resultados obtenidos con el ensayo de rojo neutro fueron similares a los resultados obtenidos con el ensayo MTT, uno de los más frecuentemente empleados. Sin embargo, el ensayo NR tiene la ventaja de ser más

barato, más rápido y puede acoplarse a otros ensayos ya que las células se mantienen intactas. Asimismo, el análisis de imágenes por Image J es un método complementario a la espectrofotometría para medir viabilidad celular lo cual trae ventajas para el análisis de células en microdispositivos.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos a macroescala servirán como referencia para comparar con los resultados obtenidos en sistemas miniaturizados. En el siguiente capítulo se presentan los estudios realizados en microdispositivos de microfluidica y los ensayos de viabilidad por el método de rojo neutro.

Capítulo 3
MICRODISPOSITIVOS
DE CULTIVO Y
EVALUACIÓN DE LA
VIABILIDAD CELULAR

3) CAPITULO 3. MICRODISPOSITIVOS DE CULTIVO Y EVALUACION DE LA VIABILIDAD CELULAR

3.1) RESUMEN

En este capítulo se describen microdispositivos de polidimetilsiloxano (PDMS) como un sistema miniaturizado para el cultivo de la línea celular LLC-PK1. En la primera parte se describe la construcción de los microdispositivos y los parámetros de cultivo que permitieron la adherencia y mantenimiento de las células: ancho de microcanales, el pretratamiento con plasma-poli-L-lisina y la densidad de células sembradas. El efecto de los compuestos fenólicos y extracto de vainilla en la viabilidad de las células cultivadas en estos microsistemas se evaluó utilizando rojo neutro como indicador de viabilidad. Debido al manejo de bajos volúmenes de medio y reactivos en los microdispositivos, se utilizó un método basado en análisis de imágenes para determinar la viabilidad celular. Los resultados obtenidos con los microdispositivos y análisis de imágenes se compararon con los resultados obtenidos a macroescala, comparando la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) de ambos sistemas. Por último, se evaluó el estrés oxidativo en las células cultivadas en placa de 96 pozos y en el microdispositivo con el ensayo de 2-7-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Con este ensayo se evaluó, además, el efecto de peróxido de hidrógeno y el extracto de vainilla en la producción de especies reactivas de oxígeno de las células cultivadas en el microdispositivo haciendo una comparación con los resultados de citoprotección obtenidos a macroescala para el extracto de vainilla. Dado que ya se tenía evidencia suficiente para pensar que los resultados en placa de 96 pozos y en el microdispositivo proporcionan resultados equivalentes, se decidió tomar la IC₅₀ de H₂O₂ a macroescala.

3.2) OBJETIVO GENERAL

Construir e implementar microdispositivos de PDMS para el cultivo y evaluación de viabilidad de la línea LLC-PK1 expuesta a compuestos fenólicos y extracto natural de vainilla.

3.2.1) OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los parámetros de cultivo de la línea celular LLC-PK1 en microdispositivos.
- Desarrollar un protocolo para determinar viabilidad celular en microdispositivos mediante la técnica de rojo neutro.
- Determinar la repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad en microdispositivos.
- Comparar los resultados de viabilidad celular en micro y macroescala.
- Evaluar el estrés oxidativo entre las células cultivadas en microdispositivos y macroescala
- Evaluar el efecto protector del extracto de vainilla en los microdispositivos.

3.3) HIPÓTESIS

Los microdispositivos de cultivo celular permitirán el cultivo y evaluación de viabilidad en la línea LLC-PK1 expuesta a compuestos fenólicos y extracto de vainilla utilizando el indicador de rojo neutro de manera reproducible y con resultados comparables a los obtenidos en macroescala.

3.4) METODOLOGIA.

3.4.1) Reactivos, equipos y disoluciones

Los reactivos y equipos usados en la construcción de microdispositivos fueron los siguientes: Un Spin coater (WS-650MZ-23NPPB, Laurell Technologies), una lámpara UV (Blackray B-100 AP, UVP), un generador de plasma (BD-20AC, Electrotechnic-Products), obleas de silicio (3 pulgadas de diámetro; espesor 381 ± 25 μm), un horno (DHP-9032, Heating Incubator Prolab), resina SU-8 3035 (Microchem), kit de elastómero de silicona (PDMS, Sylgard 8084), Propilenglicol monometil éter acetato (99.5%, Sigma-Aldrich), 2-Propanol (99.8%, J.T Baker) y portaobjetos de vidrio (Corning). El diseño de los microcanales se realizó con el software Adobe Illustrator CS6, el cual es un procedimiento de rutina para el desarrollo de sistemas microfabricados.

Los reactivos y materiales usados para el cultivo y los experimentos con células fueron: Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino y penicilina / estreptomina los cuales fueron adquiridos de Biowest (Riverside, MO), tabletas de solución salina tamponada con fosfato (PBS), tripsina-EDTA, cloruro de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (rojo neutro), formaldehído y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazo (MTT), y poli-L-Lisina todos ellos de Sigma-Aldrich. Se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico: vainillina, p-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico (pureza del 97%), ácido p-hidroxibenzoico y cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II, CDDP), los cuales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los extractos de vainilla se obtuvieron a partir de vainilla en polvo de Papantla, Veracruz (México) (ANEXO 1). Para introducir el medio a los microdispositivos se utilizaron jeringas estériles de 1mL (Sensimedical) y tubería de teflón.

Se utilizó la línea celular de epitelio de riñón de cerdo LLC-PK1 (ATCC, Rockville, MD, EUA). Las células fueron cultivadas en DMEM utilizando cajas Petri (Corning) de 100 mm en una incubadora con control de CO₂ al 5% y 95% de aire, los pases oscilaron desde 10 al 30.

Los equipos usados para los ensayos con células fueron una campana de seguridad biológica clase II, una incubadora humidificada con control de CO₂ (5%) (Nuair, Plymouth, MN, USA), un lector multimodal de microplacas Synergy HT (BioTek; Winooski, VT EUA) y una bomba de jeringa NE-300 (New era Pump Systems).

3.4.2) Construcción y caracterización del microdispositivo

La Figura 3-1 muestra el esquema de construcción del microdispositivo, el cual consiste en un microcanal de 15 mm de largo, 1 mm de ancho y 210 μm de profundidad moldeado por fotolitografía y litografía suave (procedimiento descrito en el ANEXO 8). Las dimensiones de los microcanales se corroboraron midiéndolos por triplicado utilizando el software Image J y calibrando el programa con la imagen de un portaobjetos graduado. Se hicieron los orificios en los extremos del microcanal con un horador de 1.5mm. El microcanal de PDMS se adhirió a una superficie limpia de vidrio con descarga de plasma. Posteriormente los chips se incubaron a 60°C durante al menos 24 h previo a su uso para asegurar

que el microcanal se mantenga adherido a la superficie de vidrio. Se pasó etanol al 70% a los microcanales para verificar que no hubiera fugas.

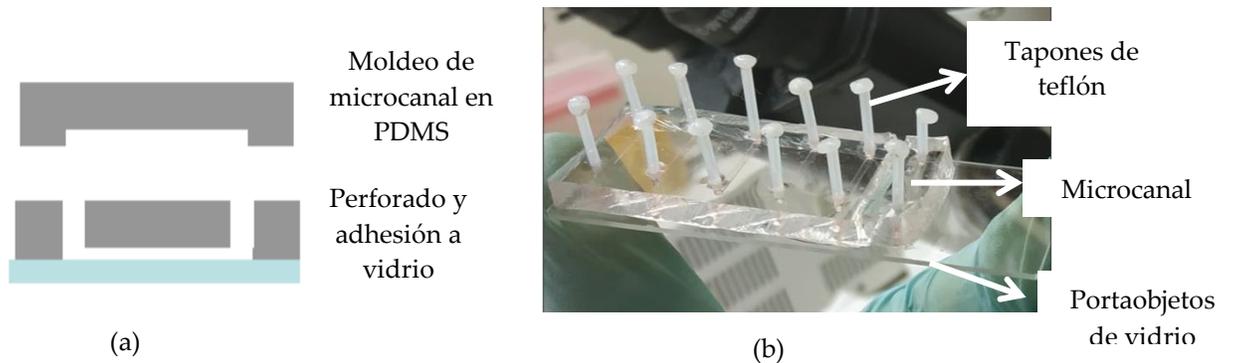


Figura 3-1. Representación del microdispositivo de PDMS para cultivo celular. (a) Esquema de construcción. (b) Imagen de los microdispositivos con tapones de teflón adheridos a vidrio.

3.4.3) Evaluación de parámetros de cultivo en los microdispositivos

Para evaluar el cultivo celular en el microcanal se estudiaron los siguientes parámetros:

1) Ancho de microcanal: Se sembraron células LLC-PK1 a una densidad de 1×10^6 células/mL en microcanales de diferentes anchos (100, 250, 500 y 1000 μm) por triplicado y se analizaron las células después de 24h de incubación.

2) Pretratamiento: Se evaluó el efecto de plasma y poly-L-lisina en la adherencia y crecimiento de células en los microcanales. Para ello se realizaron 2 experimentos: 1) se introdujeron 10 μL de una disolución de poli-L-Lisina (0.01% en agua desionizada estéril) y se incubaron durante 180 min a temperatura ambiente; 2) se irradió la superficie de PDMS de los microcanales con plasma durante 1 min e inmediatamente se introdujo la disolución de poli-L-lisina durante 5 min. Posteriormente, en ambos casos se retiró la poli-L-Lys y se lavaron los canales con 20 μL de agua Milli Q, la cual se aspiró mediante vacío. Los microdispositivos se esterilizaron en la campana de flujo laminar empleando luz UV (λ 254nm) durante 25 min y se incubaron a 37°C durante 3h para secar los canales. Se sembraron células LLC-PK1 a una densidad de 1×10^6 células/mL y se analizaron a las 6 y 21h posteriores al sembrado. Para evitar la evaporación del medio de cultivo se fabricaron tapones manualmente cortando fragmentos de tubería de teflón y sellando uno de los extremos de cada fragmento con calor.

3) Densidad de sembrado: Se estudió el efecto de la densidad de sembrado de células LLC-PK1 para ello se prepararon suspensiones de células en un intervalo

de $0.25-2 \times 10^6$ células/mL y se sembraron en los microdispositivos por triplicado. A las 24h de sembrado, se evaluó la morfología y el área que ocupan las células mediante análisis por Image J.

Para determinar la población de células LLC-PK1 que podían ser analizadas en el microdispositivo, se midió el largo y el ancho de 10 células captadas con un objetivo de 40x utilizando el programa Image J. Se determinó un área aproximada por célula y cada uno de estos valores se promedió.

3.4.4) Evaluación del efecto de compuestos fenólicos y del extracto de vainilla en la viabilidad de LLC-PK1 cultivadas en los microdispositivos de PDMS.

Una vez que las células LLC-PK1 cultivadas en cajas Petri llegaron a una confluencia entre 80-90%, se tripsinizaron y contaron en la cámara de Neubauer. Se preparó 1mL de una suspensión de aproximadamente $1 \pm 0.3 \times 10^6$ células /mL y se tomaron 10-12 μ L de esta suspensión para colocarse en los microcanales (utilizando una micropipeta) evitando introducir burbujas. Se coloraron los tapones de teflón en las entradas y salidas del microcanal y colocaron los microchips en la incubadora (CO_2 al 5% y aire 95%) a 37°C durante 16 h.

Para evaluar el efecto de los compuestos evaluados y el extracto de vainilla, se prepararon disoluciones estándar de VAI, PHB, AVAI, APHB, extracto de vainilla así como cis-platino (cis-diaminodicloroplatino II, CDDP) en medio DMEM, sin suero, a las concentraciones mostradas en Tabla 8. Cada una de las disoluciones estándar se introdujeron en los microcanales utilizando una bomba de jeringa (1mL), a un caudal de $6\mu\text{L}/\text{min}$ durante 1 minuto. Los tratamientos se aplicaron cada 12 horas durante 24 h manteniendo los microdispositivos en la incubadora con control de CO_2 (5%) y aire (95%) a 37°C entre cada tratamiento. Para medir la viabilidad celular se preparó 1mL de una disolución de rojo neutro ($50\mu\text{g}/\text{mL}$ en DMEM) y se introdujo a los chips a un caudal de $10\mu\text{L}/\text{min}$ durante 1 minuto. Posteriormente se introdujeron los chips en la incubadora durante 3 horas. Las imágenes de microscopia de campo claro se obtuvieron con una cámara acoplada al microscopio (Nikon) con un objetivo 10x Para reducir el efecto del ruido en el análisis de imágenes con imageJ, primero se analizaron imágenes de microcanales sin células con rojo neutro, así como imágenes de canales que solamente tenían PBS.

Cada uno de los estándares de los compuestos se evaluaron en los microdispositivos por triplicado en 3 experimentos independientes. Por cada

microcanal se tomaron 3 imágenes. Para poder comparar con su contraparte a macroescala, se realizaron una nueva serie de experimentos en placa de 96 pozos seleccionando el mismo intervalo de concentración utilizado en los experimentos con microdispositivos. Se compararon los datos de viabilidad y de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) por ambas metodologías.

Tabla 8. Concentraciones de VAI, PHB, AVAI, APHB, extracto de vainilla y CDDP evaluadas en células LLC-PK1 cultivadas en microdispositivos.

Compuestos evaluados	Concentraciones estudiadas (mmol / L)
VAI, PHB, APHB	0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20
AVAI*	0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15
Extracto de vainilla (expresado como [VAI])	0.2 0.5 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0
CDDP (μ M)	5, 10, 20, 30,40, 50, 75, 100

*Intervalo de concentración limitado por la solubilidad del compuesto

3.4.5) Evaluación del estrés oxidativo en células LLC-PK1 cultivadas en microdispositivos y a macroescala

Para comparar el cultivo en el microdispositivo con el cultivo a macroescala, se midió la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de células cultivadas en ambos sistemas empleando diacetato de 2-7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como sonda de fluorescencia. Para evaluar las células en macroescala, las células se cultivaron en placa de 96 pozos, en medio sin compuestos fenólicos durante 24h, se lavaron con 200 μ L de PBS y se añadieron 100 μ L de una disolución 10 μ M de DCFH-DA preparada en PBS a cada pozo. Se incubaron las células durante 30 minutos protegidas de la luz. Posteriormente se retiró la disolución de trabajo, se lavaron las células nuevamente con PBS y se analizaron con un microscopio de fluorescencia.

Para evaluar la proporción de las células con estrés oxidativo en los chips, las células se sembraron y cultivaron en DMEM por 24h como se describió en 3.4.4, (pág. 78). A continuación, se introdujo el reactivo DCFH-DA en el microcanal a un caudal de 10 μ L/min durante 1 min, y se incubaron los chips a 37°C durante 30 min. Posteriormente se lavaron las células haciendo pasar PBS por los microcanales a un

caudal de 30 μ L/min durante 1min. Se analizaron las células por microscopia de fluorescencia.

Posteriormente, se evaluó el efecto de peróxido de hidrógeno y del extracto de vainilla en el estrés oxidativo de las células LLC-PK1 cultivadas en los microdispositivos. Para ello se incubaron las células con extracto de vainilla (0.4 mM) durante 24 h, para después introducir una disolución de H₂O₂ 0.5 mM en DMEM e incubar los microdispositivos durante 4 h. A continuación, se introdujo el reactivo DCFH-DA en el microcanal a un caudal de 10 μ L/min durante 1 min, y se incubaron los chips a 37°C. Posteriormente se lavaron las células haciendo pasar PBS por los microcanales a un caudal de 30 μ L/min durante 1min. Las células se analizaron en el microscopio obteniendo imágenes en campo claro y de fluorescencia que se procesaron en Image J y se contaron manualmente.

3.5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS A MICROESCALA

3.5.1) Caracterización del microdispositivo

Los microdispositivos (Figura 3-2) consisten en un microcanal con dimensiones de 973.39 \pm 11.50 μ m de ancho, 10 mm de largo y 210.46 \pm 7.46 μ m de altura; lo que da un volumen de 2.1 μ L y un área de cultivo de 10 mm². En comparación, un pozo de una placa de 96 pozos tiene un área de 32mm² sobre la que se depositan usualmente volúmenes entre 100-200 μ L de medio. La relación de área/volumen es de 4.76 mm⁻¹ y 0.32 mm⁻¹ para el microcanal y el pozo, respectivamente.

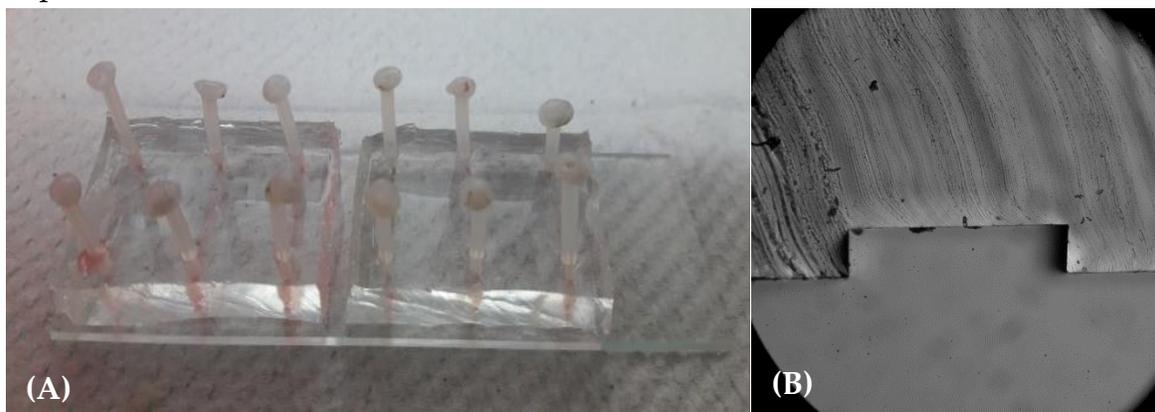


Figura 3-2. Microdispositivos de cultivo celular en monocapa. (A) Aspecto exterior de los microdispositivos para cultivo de células LLC-PK1. (B) Corte transversal del microcanal para cultivo celular.

3.5.2) Estudio de los parámetros de cultivo en microdispositivos

3.5.2.1) Ancho de microcanal

La Figura 3-3 muestra imágenes de microcanales de diferente ancho con células LLC-PK1. Se pensó en la reducción de los canales para lograr mayor confluencia de células a tiempos cortos; sin embargo, en los canales de 100 y 250 μm de ancho las células no se distribuyeron homogéneamente a lo largo del microcanal, manteniéndose en los extremos. Posiblemente el estrés hidrodinámico el cual es mayor en canales de menor ancho disminuye el tiempo en que las células interactúan con la poly L-lisina y por lo tanto no se adhieren. A diferencia de lo observado en canales de 500 y 1000 μm de ancho, los cuales permitieron una mejor distribución de células.

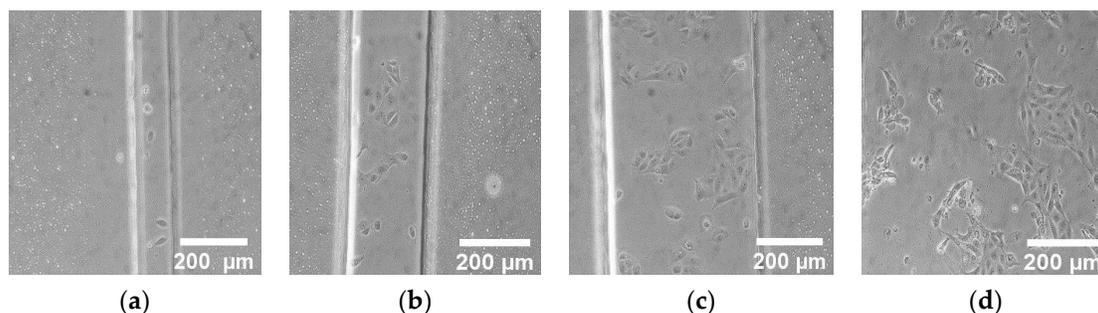


Figura 3-3. Distribución celular en microdispositivos de diferente ancho. (A) 100 μm ; (B) 250 μm ; (C) 500 μm ; (D) 1000 μm

3.5.2.2) Evaluación de la densidad de células sembradas en la confluencia y morfología

Las células sembradas a las densidades de 0.5 y 1×10^6 células / mL mostraron una morfología redondeada (similar a los cultivos en macroescala), mientras que a altas densidades (2×10^6 células / mL), mantienen una morfología alargada, y se compactaban en cúmulos separados (Figura 3-4). Una alta densidad de sembrado altera la morfología posiblemente por la inhibición por contacto el cual puede influir en el metabolismo celular (Hirsch and Schildknecht, 2019). Se observó una mayor confluencia y una menor variabilidad del número de células utilizando 1×10^6 células/mL, por lo tanto se decidió utilizar esta densidad en los estudios de viabilidad.

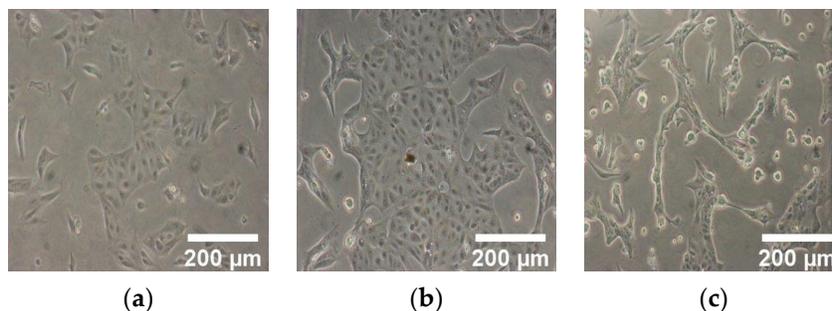


Figura 3-4. Células LLC-PK1 en microchip después de 24h de cultivo, densidades probadas: a) 0.5×10^6 , b) 1×10^6 y c) 2×10^6 células / mL.

3.5.2.3) Efecto del pretratamiento con plasma y Poli-L-Lisina en la adherencia celular al microchip

La poli-L-Lisina es un polímero que coadyuva la interacción electrostática entre los iones cargados negativamente de la membrana celular y la superficie de cultivo. Las fuerzas de unión entre esta proteína y la superficie de cultivo son principalmente interacciones débiles, por lo que, la proteína es adsorbida puede desprenderse fácilmente de la superficie donde se adhiere. Como resultado, la adsorción física de proteínas solo es válida por una duración limitada (Bodas and Khan-Malek, 2007). En este trabajo se propone el tratamiento combinado de plasma y poli-L-lisina para mejorar la adhesión entre la poli-L-Lisina y la superficie de cultivo (vidrio) y, por ende, mejorar la adherencia celular.

La Figura 3-5 muestra imágenes de las células LLC-PK1 en los microcanales con los tratamientos descritos de irradiación y poli-L-lisina. Después de 6 horas del sembrado, no hay diferencia aparente entre los tratamientos. Sin embargo, después de 21 h, se observó un número mayor de células en los microchips tratados con plasma y poli-L-lisina, en comparación con los canales tratados solamente con poli-L-lisina. Además, no hubo diferencia entre exponer poli-L-Lys durante tiempos prolongados (180 min) y entre usar plasma y poli-L-Lys durante tiempos cortos (5 min). Por lo tanto, el pretratamiento con plasma y poli-L-lisina era efectivo para la adherencia celular, disminuyendo los tiempos de funcionalización de poli-L-lisina.

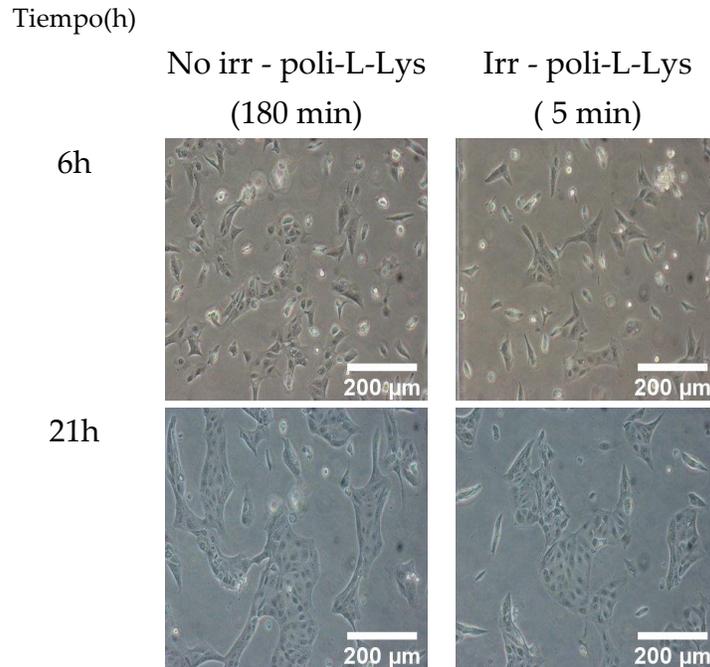


Figura 3-5. Células adheridas a los microdispositivos comparando los tratamientos de irradiación con plasma-poli-L-Lisina. No irr: No irradiación con plasma, Irr : Irradiación con plasma

3.5.3) Análisis de las células en microdispositivos y comparación con macroescala.

La Figura 3-6 muestra imágenes de las células LLC-PK1 con una amplificación de 10, 20 y 40x. En promedio, las dimensiones de la célula son de $34.28 \pm 6.25 \mu\text{m}$ de largo, $38.41 \pm 5.17 \mu\text{m}$ de ancho y un área promedio de $1118 \pm 246 \mu\text{m}^2$. Considerando el área promedio de las células y las dimensiones del microcanal y del pozo, se estima que el número células confluentes en el microdispositivo es aproximadamente de 8941 ± 1970 , mientras que en un pozo es de 28611 ± 6302 células, es decir, una reducción de 3.2 veces de la población celular en los chips. Considerando las dimensiones de una imagen ampliada 10x ($648 \times 618 \mu\text{m}$), el número estimado de células que pueden ser captadas por cada imagen es de 379 ± 83 , mientras en un pozo se analiza una población estimada de 29000 células, cuando se cuantificó el rojo neutro extraído de la población total. Esto implica que la población analizada en los microchips es 75 veces menor.

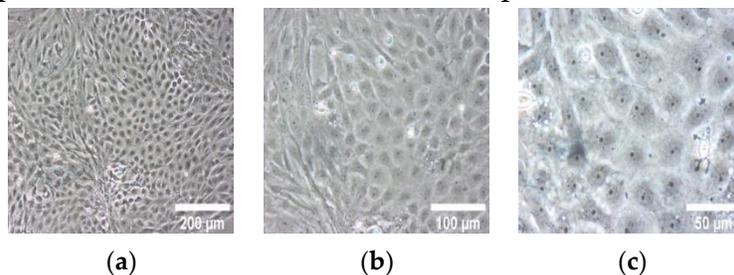
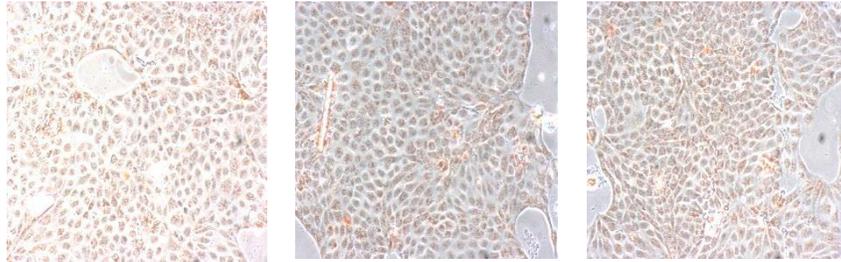


Figura 3-6. Células LLC-PK1 a diferentes ampliaciones: (a) 10x, (b) 20x, (c) 40x

La Figura 3-7 muestra las células LLC-PK1 tratadas con los indicadores de RN y MTT. La captación de RN por las células no modifica su morfología. En cambio, utilizando el MTT la morfología celular no se distingue debido a los cristales de formazán producidos. Este resultado es muy importante ya que se demuestra que, a diferencia de MTT, el indicador de RN mantiene a las células integras. Si las células se mantienen viables después de culminado el ensayo de viabilidad, esto abre la posibilidad de poder seguir utilizando las células para otro tipo de pruebas dentro del microdispositivo como por ejemplo hacer una determinación de proteínas (Arranz & Festing, 1990) o posibles ensayos genéticos en donde se requieren células vivas y funcionales. Además, la integridad de célula es muy importante ya que puede ayudar a determinar el mecanismo de muerte celular (apoptosis) (Doonan & Cotter, 2008) . Por lo tanto, con el método de rojo neutro el microdispositivo de cultivo fungiría como elemento integrador para al menos 2 tipos de ensayos o procesos, lo cual es deseable en los sistemas *lab on a chip* .

Rojo neutro



MTT

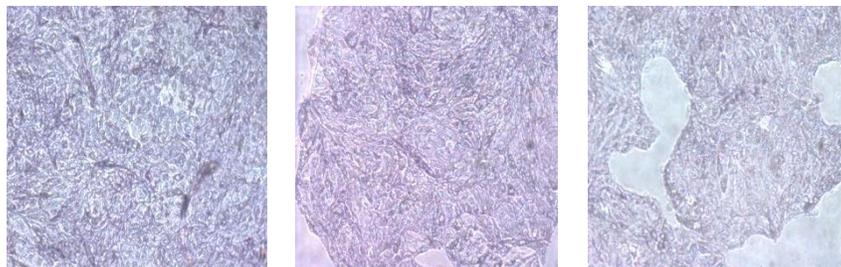


Figura 3-7. Imágenes representativas de células LLC-PK1 tratadas con rojo neutro y MTT en el microdispositivo

3.5.4) Ensayos de viabilidad en los microdispositivos

3.5.4.1) Efecto de los compuestos fenólicos VAI, PHB, AVAI, APHB y extracto de vainilla en la viabilidad celular de LLC-PK1

De la Figura 3-8 a la Figura 3-10 se muestra la viabilidad de células LLC-PK1 cultivadas en pozos y en el microdispositivo y expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos (VAI, PHB, AVAI o APHB) y extracto de vainilla. En la Tabla 9 se muestran los valores de IC_{50} calculados en pozos y con el microdispositivo. En el ANEXO 9 se muestran imágenes representativas de las células en el microdispositivo tratadas con vainillina evaluadas por rojo neutro y MTT.

Se determinó que no hubo diferencia significativa entre las medias de los porcentajes de viabilidad para cada concentración de polifenol entre pozos (macroescala) y microescala.

Para el estándar de vainillina, la IC_{50} fue de 5.73 ± 1.16 mM, mientras que la del extracto fue de 1.32 ± 0.03 mM (expresado como [VAI]), por lo tanto la IC_{50} del extracto de vainilla aumentó 4.34 veces con respecto a VAI, lo que indica que el extracto tiene mayor citotoxicidad. En macroescala el cociente entre el extracto y VAI fue de 4.59 veces, lo cual demuestra que con ambas metodologías se llegaron a resultados similares. De manera general, los microdispositivos permitieron obtener resultados comparables a los obtenidos en macroescala, pesar de que en los primeros se emplea un menor número de células y otro método de detección con respecto a los ensayos en macroescala basados en un método espectrofotométrico. En el microdispositivo se detecta la captación de rojo neutro a nivel intracelular sin necesidad de realizar extracciones (siendo un paso necesario para determinaciones espectrofotométricas), por lo tanto el método miniaturizado no requiere de disolventes tóxicos para la extracción.

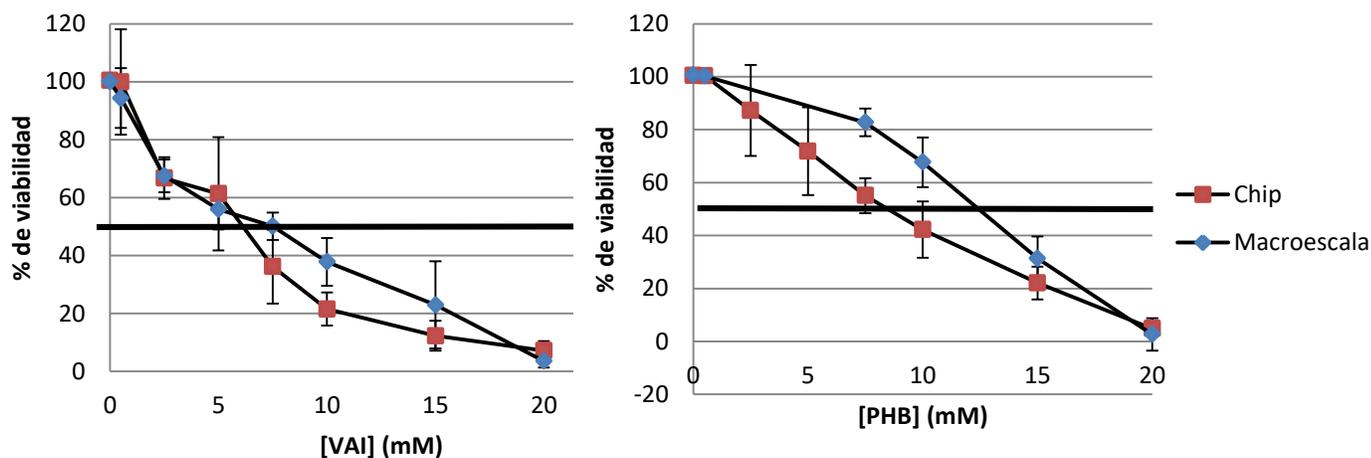


Figura 3-8. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de VAI y PHB. Comparación del cultivo en microdispositivo y pozos mediante el ensayo de rojo neutro

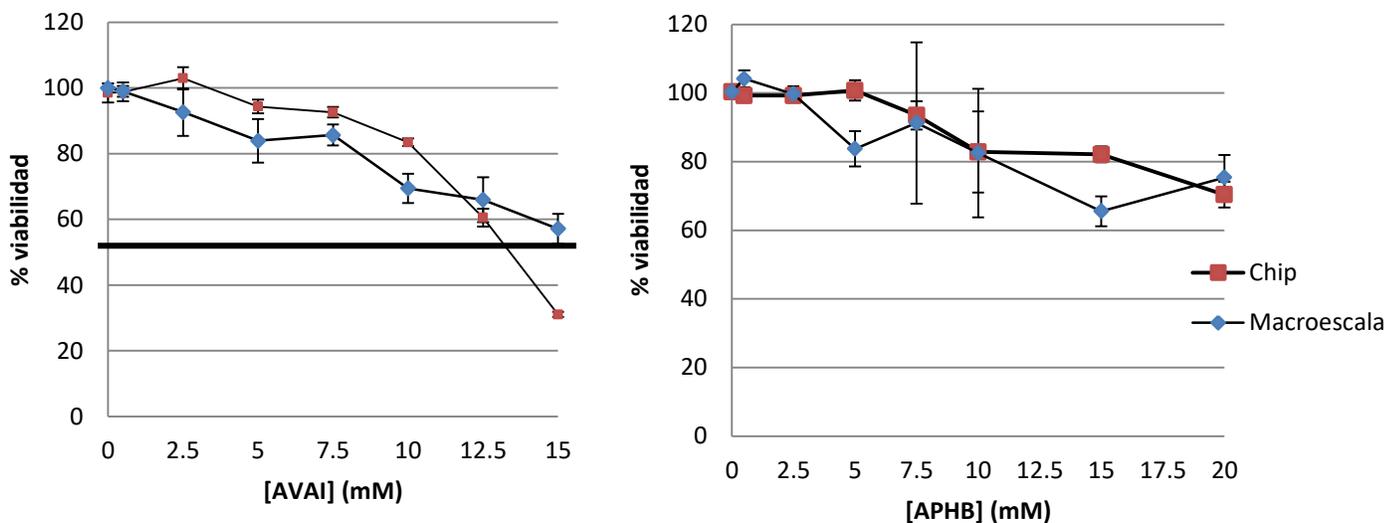


Figura 3-9. Viabilidad de células LLC-PK1 en función de la concentración de AVAI y APHB. Comparación del cultivo en chip y pozos mediante el ensayo de rojo neutro

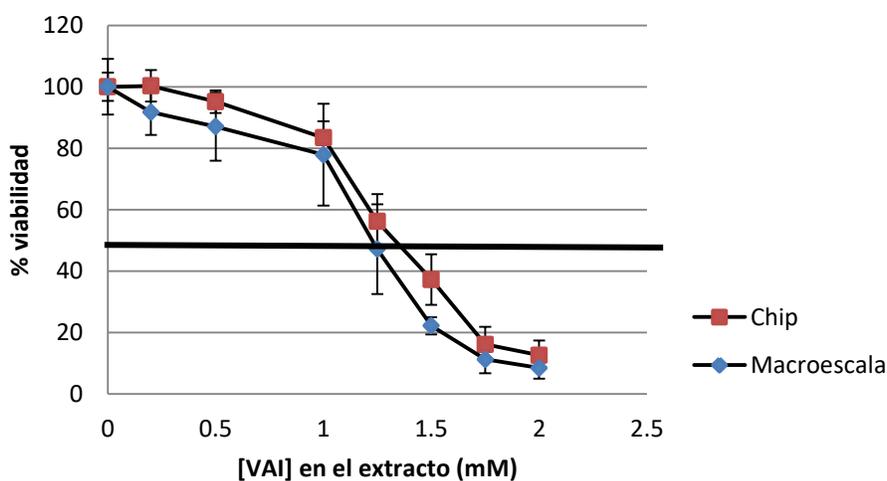


Figura 3-10 Viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a extracto de vainilla (expresado como concentración de vainillina) en chip y pozos mediante el ensayo de NR

Tabla 9. Valores de IC_{50} de compuestos fenólicos y extracto de vainilla a partir de los datos obtenidos en micro y macroescala

Polifenol	Microdispositivo		Macroescala(placa 96 pozos)	
	IC_{50} (mM)	R^2	IC_{50} (mM)	R^2
VAI	5.73 ± 1.16	0.9252	5.57 ± 1.16	0.8862
PHB	9.71 ± 0.43	0.9743	11.80 ± 1.65	0.9088
AVAI	13.25 ± 0.12	0.9552	~15	---
APHB	> 20	---	> 20	---
Extracto	1.321 ± 0.03	0.9737	1.211 ± 0.03	0.8578

En la Figura 3-11 se muestra la gráfica de correlación entre los datos de viabilidad obtenidos en el chip y los obtenidos en la placa de 96 pozos para el caso de VAI. Los valores de viabilidad se ajustan a una ecuación lineal con pendiente cercana a uno y un coeficiente de correlación de 0.98. Para los demás compuestos fenólicos evaluados, también se encontró una relación lineal entre macroescala y microescala con coeficientes de correlación entre 0.96 y 0.99.

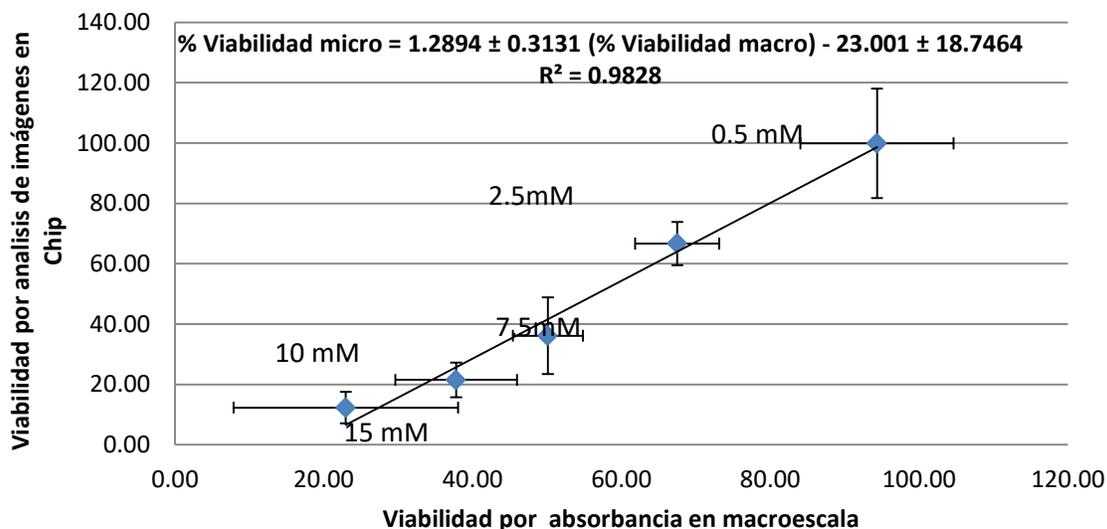


Figura 3-11. Correlación de la viabilidad medida en microdispositivo y en macroescala para cultivos con VAI

3.5.4.2) Evaluación del efecto de CDDP en la viabilidad de células LLC-PK1 en microdispositivo y macroescala

El CDDP es un fármaco usado en quimioterapia debido a su alta citotoxicidad en líneas celulares de cáncer, al igual que en células renales. En la Figura 3-12 se muestran los resultados de evaluación de CDDP, el cual fue utilizado como control positivo. El valor de IC_{50} obtenido experimentalmente a macroescala fue de $39.98 \pm 0.60 \mu\text{M}$ y el valor reportado en la literatura es de $30 \mu\text{M}$ (Reyes-Fermín et al., 2019). En el microchip se determinó un valor de 26.79 ± 1.79 , un valor bastante aproximado a pesar de las diferencias entre los sistemas de cultivo en chip y macroescala.

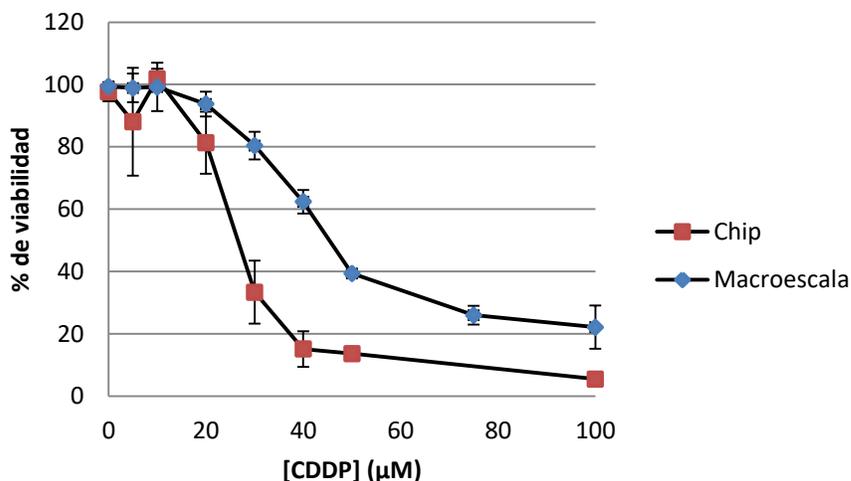


Figura 3-12. Viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a CDDP en chip y pozos mediante el ensayo de rojo neutro

3.5.4.3) Repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de viabilidad en el microdispositivo

La repetibilidad es un parámetro estadístico que se refiere a la variación, dentro de días de los porcentajes de viabilidad, mientras que la reproducibilidad se refiere a la variación entre diferentes días. De la Figura 3-13 a la Figura 3-16 se muestra la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio de cada concentración de los compuestos fenólicos en microdispositivos y en macroescala.

De manera general, los valores de repetibilidad y reproducibilidad son inversamente proporcionales a la citotoxicidad del compuestos fenólicos evaluados; esto se observó tanto en macroescala como en microescala. Por ejemplo, en concentraciones menores a 10mM de los aldehídos VAI y PHB, analizados a macroescala, se obtuvieron los valores de repetibilidad y reproducibilidad en el intervalo de 4.03-20.49% y de 4.23-37.84%, respectivamente. A concentraciones mayores (15 y 20 mM) los valores aumentaron a valores considerablemente altos (entre 20 y 75%) disminuyendo la precisión del método. Por otro lado, en los ensayos con AVAI y APHB, se obtuvo una repetibilidad en un intervalo de 3.27-11.78% y una reproducibilidad y de 4.11-24.66% en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

La precisión de los datos de procesamiento de imágenes está relacionada con la fracción del área de cultivo que se puede detectar. Cuanto mayor sea la fracción, menor será el error que se origina en las mediciones de área (Coluccio *et*

al., 2019; Jaccard *et al.*, 2014). Si comparamos los valores de precisión con sus respectivas concentraciones inhibitorias medias, se determinó que en concentraciones menores a la IC_{50} , los valores de precisión disminuyen y a concentraciones mayores a este valor, aumentan. Esto indica que la precisión está en función de la población celular analizada, siendo mayor cuando se estudian poblaciones con una viabilidad alta (mayor al 50%). Es por ello que la precisión fue mayor para el estudio de los ácidos, los cuales mantuvieron una viabilidad celular alta en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

De manera general, la repetibilidad y reproducibilidad obtenidas de los ensayos a microescala fue menor que en macroescala, por lo tanto, la precisión disminuyó al utilizar los microdispositivos. Esto es de esperarse debido a que en el microdispositivo se estudia una menor población celular. A partir de estos resultados concluimos que a medida que disminuye la viabilidad celular, disminuye la precisión del ensayo. No obstante, los resultados obtenidos con microdispositivos fueron buenos considerando las errores asociadas al conteo celular que es una de las principales fuentes de variación en los ensayos con células (Hirsch y Schildknecht, 2019). Se ha reportado que el uso cámara de Neubauer (método de conteo celular más utilizado) puede tener variaciones de hasta 20-30% (Bastidas, 2013). Por lo cual, el número de células sembradas por cada microcanal está asociado a una desviación estándar y por lo tanto la cantidad de células sembradas en los microcanales es variable. Ciertas imágenes de los microcanales mostraron zonas donde no hubo crecimiento celular (Figura 3-7), posiblemente porque no se adhirió satisfactoriamente la poli-L-lisina o el número de células no fue suficiente para lograr la confluencia en esa zona, y esto puede ocasionar variaciones en el área medida total. A medida que aumentamos la resolución espacial (hacemos un acercamiento a áreas más pequeñas de cultivo), estas variaciones en el número de células son más evidentes. Otro factor que influye en la variabilidad de los resultados es la heterogeneidad celular (diferencias de célula a célula dentro de una población). Esta heterogeneidad está presente en cierta medida en todas las poblaciones celulares, e incluso de aquellas que provienen de una sola célula o clona (Hoffman *et al.*, 2020). Aunque la heterogeneidad a veces es denominada como “ruido” (Gough *et al.*, 2017), es un factor que tiene influencia en la respuesta de células e incluso es de importancia en la resistencia a fármacos usados en tratamientos contra el cáncer (Stulpinas *et al.*, 2019). En ese sentido, la

respuesta promedio de una población de células no representa la respuesta de células individuales (Yeh & Hsu, 2019).

El análisis de las imágenes en el microdispositivo, implica una mayor resolución de análisis (reducción del área estudiada) y permite evaluar la contribución individual de cada célula en el área total de una población reducida. Al reducir el área analizada en la imagen (aproximadamente 0.42 mm²) en comparación con el área que comprende un pozo (32 mm²), podría ser más probable hallar la contribución individual de células o grupos de células que den una respuesta diferente a la predominante. A macroescala, se analiza el colorante extraído de una población celular mayor y no distingue la contribución de los efectos individuales. Por lo cual, esta fuente de variación es más acentuada en el microchip (Halldorsson *et al.*, 2015). Además, uno de los factores que puede influir en la heterogeneidad es el microambiente celular (Gough *et al.*, 2017; Huang, 2009), planteando la pregunta de si el cambio en el microambiente dentro del microdispositivo podría influir fuertemente en la variabilidad de las células en cultivo.

Así, nuestra investigación constituye un método intermedio entre los estudios a macroescala y los estudios en células individuales (*single cell*). Este nuevo método trae la ventaja de evaluar las respuestas en células individuales en un conjunto menor de células, de manera no invasiva evitando procedimientos de extracción de analitos, aumentando la resolución espacial y temporal.

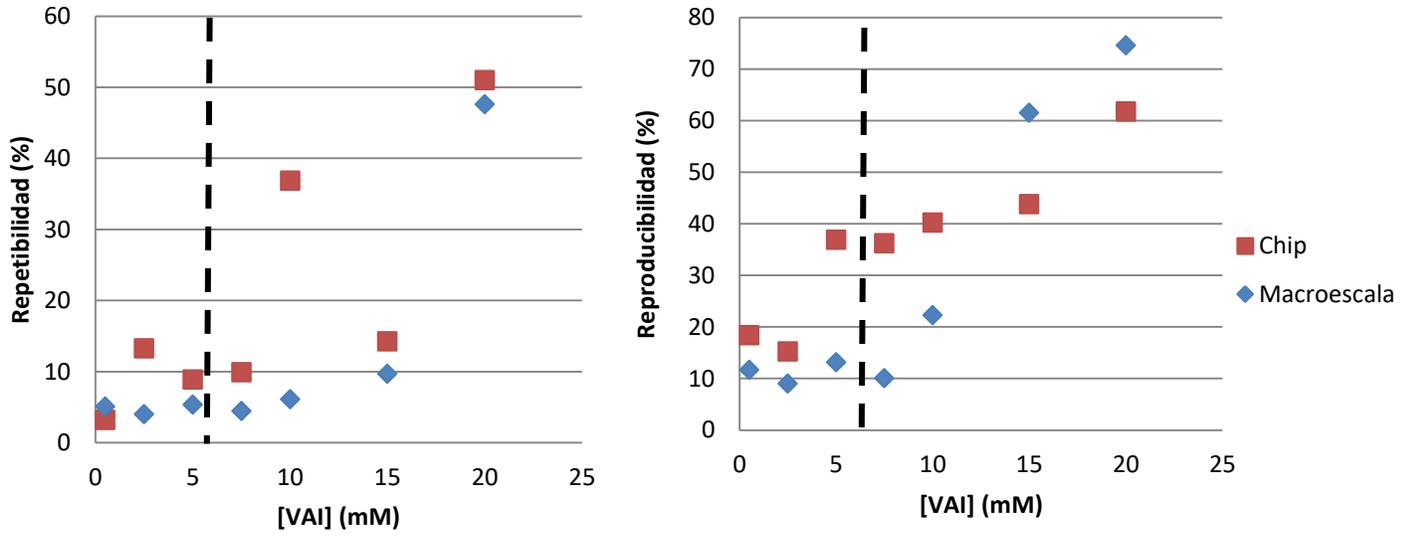


Figura 3-13. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a vainillina en micro y macroescala. La línea punteada representa la IC_{50} del compuesto

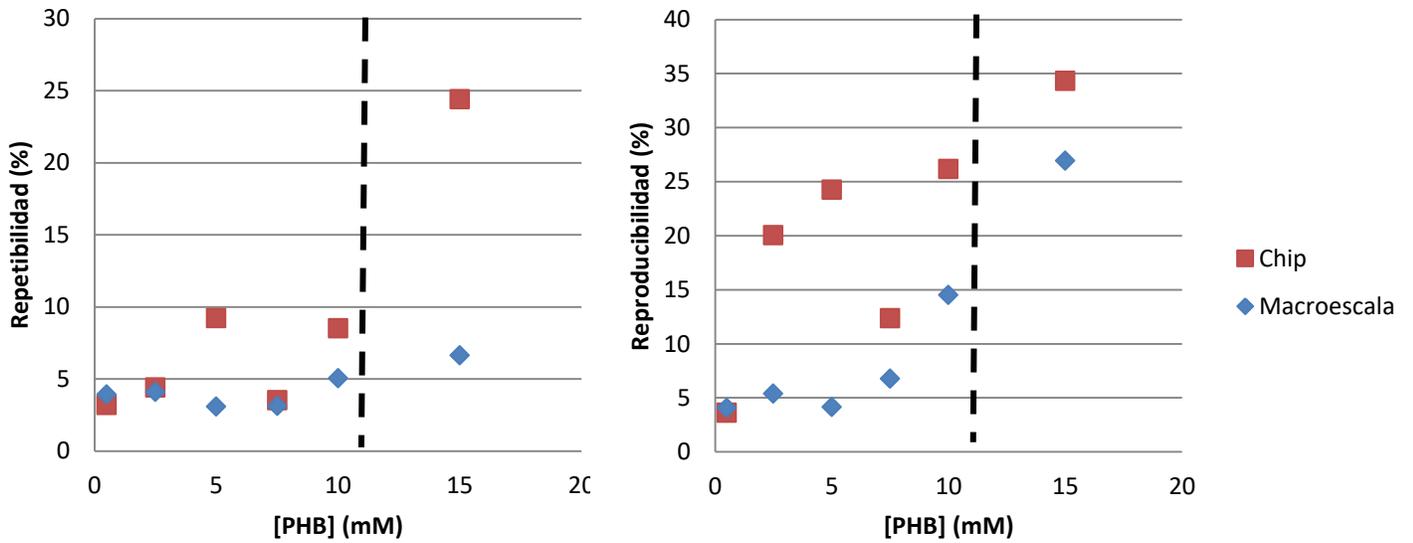


Figura 3-14. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a PHB en micro y macroescala. La línea punteada representa la IC_{50} del compuesto

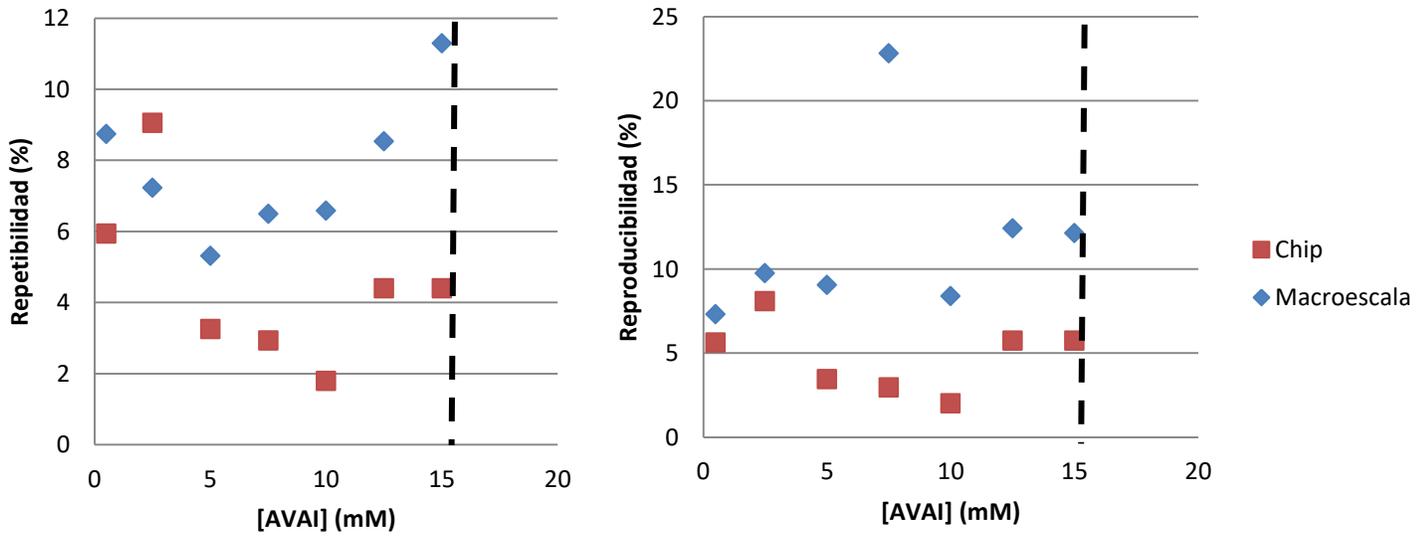


Figura 3-15. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a AVAI en micro y macroescala. La línea punteada representa la IC₅₀ del compuesto

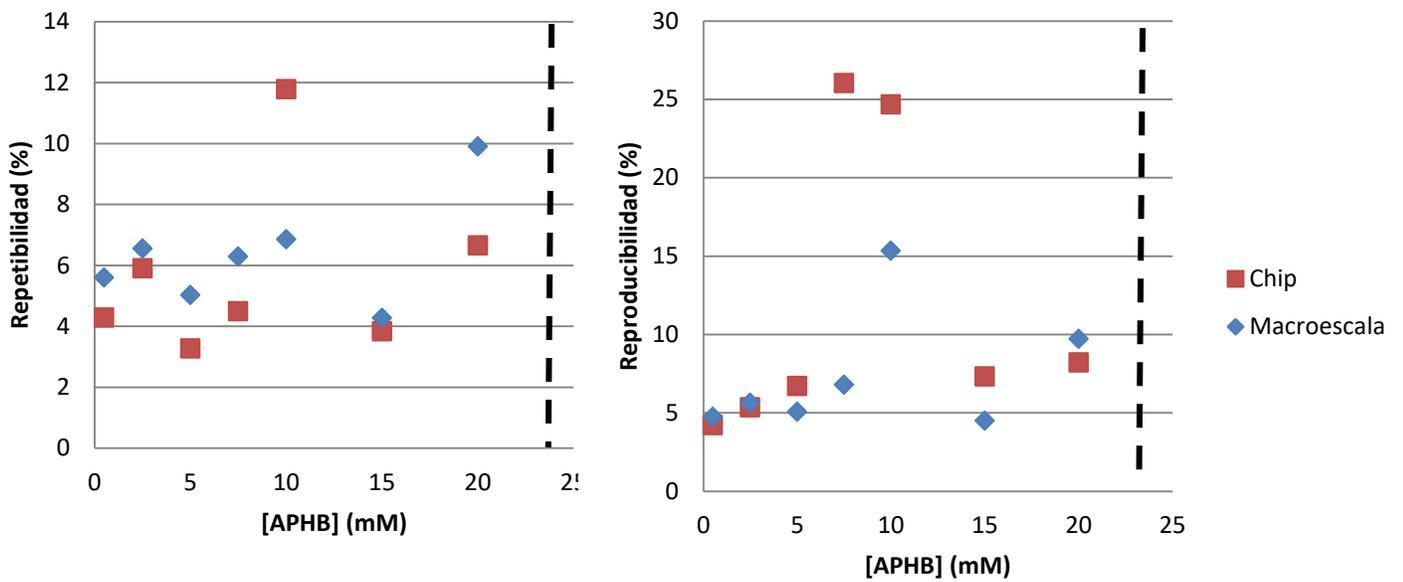


Figura 3-16. Repetibilidad y reproducibilidad de la viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a APHB en micro y macroescala. La línea punteada representa la IC₅₀ del compuesto

3.5.5) Comparación del estrés oxidativo en células LLC-PK1 cultivadas en microdispositivo y macroescala.

La captación intracelular de rojo neutro permite evaluar la integridad y estimar el metabolismo lisosomal de las células. En este sentido, un parámetro adicional que permite comparar el metabolismo de los cultivos en microchip con su contraparte en macroescala es la generación de especies reactivas de oxígeno en las células LLC-PK1. Se utilizó el ensayo DCFH-DA que consiste en la reacción entre el diacetato de 2-7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) y las especies reactivas de oxígeno intracelulares produciendo diclorofluoresceína (DCF), compuesto altamente fluorescente. La Figura 3-17 muestra imágenes de fluorescencia de las células en macroescala y en el microdispositivo. Las células teñidas en verde fluorescente indican estrés oxidativo. La Tabla 10 muestra la proporción entre el número de células totales y fluorescentes en placa de 96 pozos y a microescala. Los resultados mostraron que el porcentaje de células fluorescentes respecto al total en el microdispositivo y macroescala fueron similares, aunque en el microdispositivo hubo una mayor variabilidad de los resultados. Estos resultados confirman que aunque las células en el microdispositivo se encontraban confinadas y sometidas a un estrés debido al suministro de medio y tratamientos por un caudal (1 min a 10 μ L/min), el estrés oxidativo no fue significativamente diferente a lo observado a macroescala. Posiblemente esto se debe a que los flujos de recambio de medio en los chips fueron cortos (1min) y el cultivo se mantuvo estático en la incubadora de manera similar a macroescala (24h).

Tabla 10. Proporción de células fluorescentes respecto al total

	Número de células totales	Número de células fluorescentes	% células fluorescentes respecto al total
Macroescala	167.± 24	8.00 ± 1.73	4.89 ± 1.42
Microdispositivo	156 ± 13	16.17 ±7.01	10.36 ±4.32

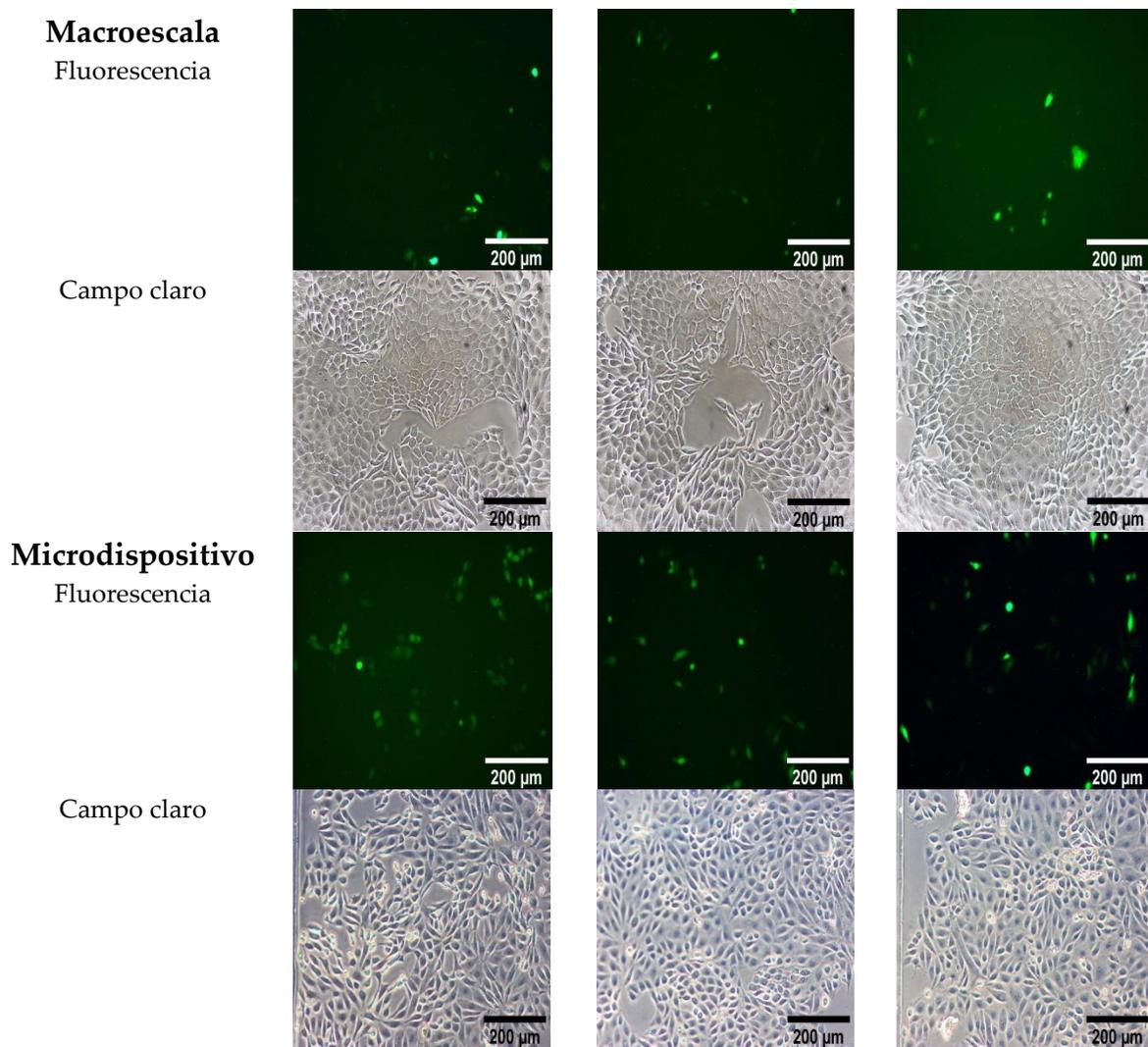


Figura 3-17. Células LLC-PK1 cultivadas en medio DMEM en macroescala y microdispositivos, evaluadas con el ensayo DCFH-DA

Dado que ya se tenía evidencia suficiente para pensar que los resultados en placa de 96 pozos y en el microdispositivo proporcionan resultados equivalentes, se decidió tomar la IC_{50} de H_2O_2 a macroescala (sección 2.5.2.4, Página 63) para evaluar el efecto protector del extracto de vainilla en el microdispositivo. En macroescala se determinó que el extracto de vainilla tuvo mayor capacidad de protección en células frente a daño oxidativo por H_2O_2 en comparación con los fenoles aislados. Por ello se utilizó el ensayo DCFH-DA para evaluar en el microchip la generación de especies reactivas de oxígeno de células tratadas con peróxido de hidrógeno y tratadas con extracto de vainilla (0.4mM, expresado como [VAI]) y posteriormente con H_2O_2 . La Figura 3-18 muestra imágenes de fluorescencia y campo claro de las células con cada uno de los tratamientos. La

fluorescencia de las células tratadas solamente con H_2O_2 fue 6 veces mayor que en las células tratadas únicamente en DMEM (control). Por el contrario, en las células tratadas preliminarmente con el extracto, la intensidad de la fluorescencia fue similar la observada en las células control. Esto indica que el extracto de vainilla disminuyó la generación de especies reactivas de oxígeno y por ende protege a las células del daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, confirmando los resultados obtenidos a macroescala.

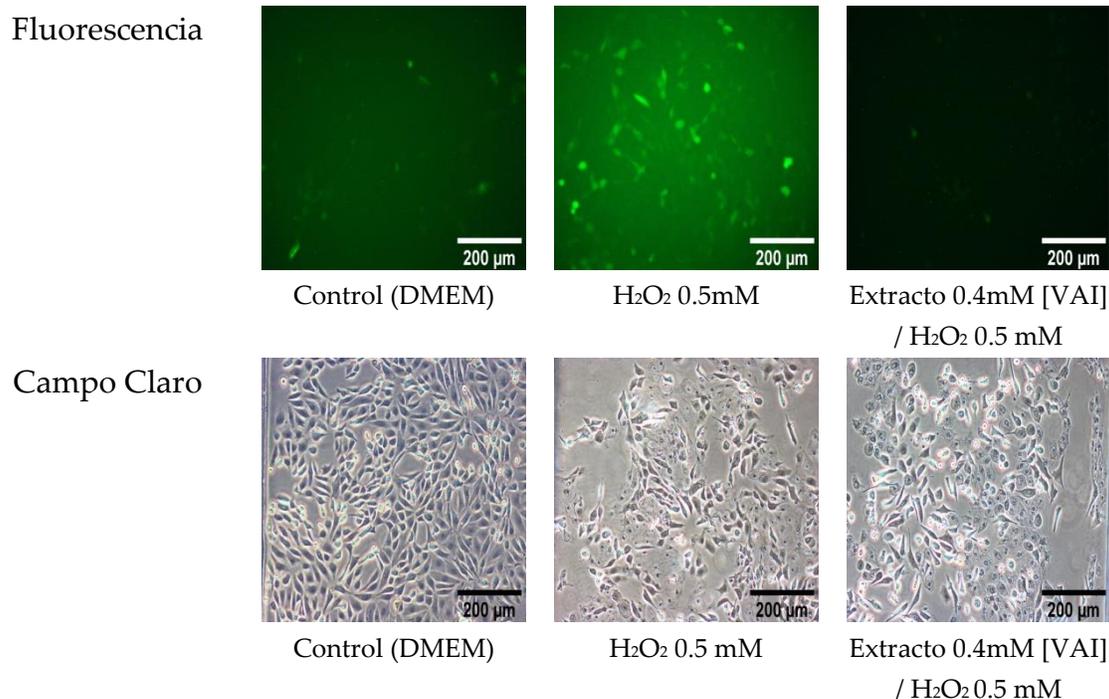


Figura 3-18. Células LLC-PK1 cultivadas con H_2O_2 y extracto de vainilla; evaluadas con el ensayo DCFH-DA.

3.6) CONCLUSIONES

El cultivo celular en microdispositivos abre numerosas oportunidades a la investigación y a la industria, por ejemplo, para el descubrimiento de fármacos o la evaluación de toxicidad en células. Para ello es necesario el desarrollo de microdispositivos sencillos que permitan la obtención de resultados repetibles, y reproducibles. El microdispositivo desarrollado en esta tesis permite la implementación por primera vez de los ensayos de rojo neutro en microescala para determinar la viabilidad de células expuestas a compuestos fenólicos y extracto de vainilla, con resultados comparables a los obtenidos a macroescala (placa de 96 pozos). El microdispositivo permitió realizar una determinación rápida de la viabilidad celular, de manera sencilla y disminuyendo la cantidad de reactivos y

medio de cultivo requerido, por lo tanto aumenta la eficiencia del ensayo de viabilidad por rojo neutro.

El cultivo de las células LLC-PK1 en el microdispositivo redujo 75 veces el número total de células estudiadas, y se disminuyó el volumen de medio de cultivo aproximadamente 10 veces en comparación a una placa de 96 pozos.

El análisis de imágenes fue un método comparable a la espectrofotometría para medir la viabilidad, con la ventaja de eliminar los pasos requeridos para la extracción de analitos y el uso de disolventes tóxicos o corrosivos. Además, se puede evaluar la morfología y la captación directa de rojo neutro dentro de la célula y por lo tanto aumenta la resolución espacial de análisis (disminuye el área analizada de células en comparación con el área de un pozo de una placa de 96 pozos).

Nuestra investigación se sitúa como un método intermedio entre los estudios a macroescala y los estudios en células individuales (single cell). El uso de rojo neutro como marcador tiene la ventaja de que éste, preserva la integridad celular, con lo que se abre la posibilidad de acoplar simultáneamente otros ensayos en las células cultivadas dentro del mismo chip (como determinación de proteínas). El ensayo de rojo neutro a realizado por macroescala permite distinguir entre células vivas y muertas, sin embargo no puede distinguir diferencias entre células vivas, sin embargo es posible evaluar las diferencias morfológicas entre células viables y posteriormente determinar qué mecanismos están asociados a esas diferencias. La implementación del método de rojo neutro permite la disminución de costos por ensayo con resultados similares a los obtenidos en macroescala, a pesar de que, como consecuencia de la miniaturización de los ensayos, la precisión de estos disminuye. No obstante el error de estos ensayos no es demasiado considerando las variaciones asociadas al conteo celular por cámara de Neubauer (20-30%), el cual es un factor que influye en la precisión de los ensayos de viabilidad.

En este capítulo se demostró la capacidad de los microdispositivos de canal sencillo para el mantenimiento de cultivos celulares en monocapa y ensayos de viabilidad celular. Posteriormente se evaluó un microsistema para el mantenimiento de cultivos celulares 3D en condiciones controladas de gases, el cual se presenta en el siguiente capítulo.

Capítulo 4
MICRODISPOSITIVOS
PARA CULTIVO
CELULAR
TRIDIMENSIONAL EN
CONDICIONES DE
HIPOXIA.

4) CAPITULO 4. MICRODISPOSITIVOS DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL EN CONDICIONES DE HIPOXIA

4.1) RESUMEN

En este capítulo se describe un microdispositivo para el control de oxígeno y dióxido de carbono en cultivos celulares tridimensionales. Este microdispositivo de polidimetilsiloxano (PDMS) / polimetilmetacrilato (PMMA) utiliza un sistema amortiguador de carbonato y L-ascorbato de sodio que permite el intercambio de gases entre éste y el medio de cultivo a través de una membrana permeable de PDMS. El amortiguador de carbonato genera CO₂ y el ascorbato capta el oxígeno disminuyendo su concentración en el medio de cultivo. Este microdispositivo se utilizó para el cultivo tridimensional (3D) de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y el estudio de la formación de redes vasculares en condiciones normales (normoxia) y de baja oxigenación (hipoxia). Se evaluó la concentración de oxígeno y dióxido de carbono en función de las concentraciones de L-ascorbato, carbonato y bicarbonato de la disolución amortiguadora. Se cultivaron las células HUVEC y se estudió la formación y estabilidad de redes vasculares bajo diferentes transiciones de normoxia / hipoxia. Analizando diferentes parámetros de la red formada (número de mallas, número de ramificaciones, longitud total), se hizo una correlación con las condiciones de oxigenación. Por último, se implementó el ensayo LIVE/DEAD para determinar la viabilidad de las células HUVEC bajo diferentes condiciones de normoxia / hipoxia.

El microdispositivo permitió realizar el cultivo celular 3D con mayor portabilidad y accesibilidad óptica. Además, se desarrolló un protocolo sencillo para la formación de redes vasculares, lo que es de importancia para cultivos organoides.

4.2) OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un microdispositivo portátil para el cultivo tridimensional y formación de redes vasculares de células endoteliales HUVEC en condiciones de hipoxia.

4.2.1) OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la concentración de oxígeno y dióxido de carbono en el microdispositivo en función de la concentración de ascorbato en la disolución amortiguadora.
- Evaluar la viabilidad de células HUVEC bajo diferentes transiciones de normoxia e hipoxia.

- Realizar el cultivo 3D de células HUVEC en un hidrogel de fibrina-colágeno y evaluar la formación y estabilidad de redes vasculares en condiciones de normoxia y de transición entre normoxia e hipoxia.
- Determinar la relación entre el tiempo de incubación en normoxia e hipoxia y los parámetros asociados a la red vascular (número de mallas, número de ramificaciones, longitud total).

4.3) HIPOTESIS

El sistema amortiguador de carbonato y ascorbato permitirá generar y mantener las condiciones adecuadas para el cultivo 3D en condiciones de hipoxia sin requerir de sistemas de incubación multigases. Asimismo el microdispositivo permitirá ser una herramienta sencilla para determinar el efecto de normoxia e hipoxia en la formación y estabilidad de redes vasculares de células HUVEC.

4.4) METODOLOGÍA

4.4.1) Reactivos, equipos y disoluciones

Para la construcción de microdispositivos se utilizaron las siguientes piezas, adhesivos y equipos:

Un reservorio de PMMA moldeado por inyección (Proto Labs G.K., Kanagawa, Japan), un tubo de PDMS (12 mm de diámetro exterior, 10 mm de diámetro interior, 15 mm de altura) (Kyowa Kogyo, Saitama, Japan), un pozo de PDMS (4 mm de diámetro interno, 3.3 mm de altura) fabricado por litografía suave utilizando un molde impreso en 3D, un cubreobjetos de vidrio, un portaobjetos de vidrio; adhesivo de silicio KE-42 (BMA, Ho Chi Minh, Vietnam), adhesivo de silicona Polyca-Seal (Sharp Chemical Ind., Osaka, Japan) y una cámara de plasma de aire (SC-708, Sanyu Electron, Tokyo, Japan).

Para evaluar la concentración de O₂ y CO₂ se emplearon las siguientes disoluciones preparadas en agua desionizada: disolución de sulfito de sodio (37285-00, Kanto Kagaku, Tokyo, Japan) 1 M, disoluciones de L- ascorbato de sodio (58049-17, Kanto Kagaku, Tokyo, Japan) (0.001- 1 M) preparadas en una disolución amortiguadora de bicarbonato de sodio (37116-00, Kanto) 0.8M y carbonato de sodio (196-01595, Wako, Osaka, Japan) 65mM, disolución de bicarbonato de sodio 10mM. Los equipos utilizados fueron: una sonda de oxígeno basada en fluorescencia con compensación de temperatura (FOSPOR-T1000-TS- NEO, Ocean

Insight, Largo, FL, EE. UU.), un fluorímetro (NeoFox-GT, Ocean Insight), y un potenciómetro con sensor de temperatura (LAQUA act, Horiba, Tokio, Japón).

Los reactivos utilizados en el cultivo celular fueron los siguientes: medio de cultivo para el crecimiento de células endoteliales (EGM-2, por sus siglas en inglés) (Lonza), solución de desprendimiento de células Accutase (AT-104, Innovative Cell Technologies, Inc., CA, USA). Para la preparación del hidrogel de fibrina-colageno para cultivo 3D se utilizaron: HBSS sin rojo de fenol (085-09355, Wako), fibrinogeno 25mg/mL (F8630, Sigma, MO, USA), colágeno tipo 1 (ASC-1-100-20, 136 Nippi, Tokyo, Japan), Trombina 50 U/mL (T4648, Sigma). Para evaluar viabilidad celular se utilizó un kit de detección LIVE / DEAD II (PK-CA707-30002, PromoKine, Heidelberg, Germany).

Se utilizó la línea de células endoteliales de vena de cordón umbilical de humano (HUVEC) (CC-2519, Lonza) y de fibroblastos humanos de pulmón (hLF) (CC-2512, Lonza). Cada línea celular se utilizó entre los pases 4 a 6 y se cultivaron en botellas para cultivo celular de 75cm² (Corning).

Los equipos utilizados en los experimentos con células fueron: un contador celular automático (Scepter™ 2.0 Cell Counter, Millipore), un microscopio invertido de campo claro (EVOS XL Core, Thermo) y un microscopio invertido de fluorescencia (DMi8, Leica, Hesse, Alemania).

4.4.2) Construcción del microdispositivo

El microdispositivo consiste en dos reservorios (Figura 4-1): 1) un reservorio interno para el cultivo celular y 2) un reservorio externo para la disolución amortiguadora. Ambos reservorios están separados por un tubo cilíndrico de PDMS donde hay intercambio y difusión de gases. El reservorio para la disolución amortiguadora está hecho de PMMA y tiene dos cuellos de rosca para cerrar cada uno de los depósitos con tapa de rosca manteniendo el dispositivo aislado del medio ambiente. El depósito interno contiene un pozo de PDMS en el fondo, en donde se realiza el cultivo celular tridimensional.

El dispositivo se construyó de manera manual uniendo cada una de las piezas con plasma y adhesivos de silicona. El tubo de PDMS y el pozo se adhirieron a un portaobjetos de vidrio con tratamiento de plasma de aire (20 mA, 20 Pa, 30 s). El tubo de PDMS se unió al cuello del reservorio de PMMA con un

adhesivo de silicio KE-42. Finalmente, el reservorio de PMMA se unió a un portaobjetos de vidrio con un adhesivo de silicona Polyca-Seal. Los chips se almacenaron al menos 24 horas antes de su uso para favorecer el secado de los adhesivos utilizados, evitando que las piezas del dispositivo se despeguen fácilmente. Se utilizaron tapas de rosca para cerrar los reservorios de cultivo y de amortiguador. Para permitir el paso óptico a través del microscopio, se hizo un orificio a la tapa utilizada en el reservorio de cultivo y se le pegó un cubreobjetos de vidrio.

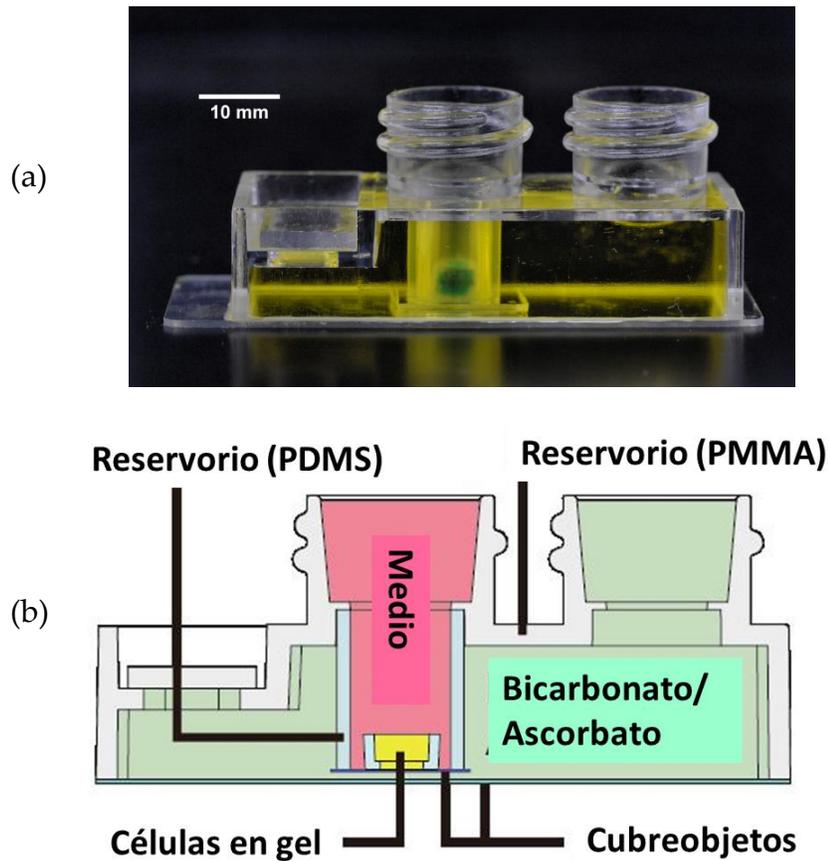


Figura 4-1. Dispositivo portátil para cultivo celular en 3D bajo niveles controlados de oxígeno y dióxido de carbono. a) Aspecto exterior del microdispositivo, b) Esquema que muestra la configuración del sistema de cultivo.

4.4.3) Caracterización de O_2 y CO_2

Para evaluar los niveles de O_2 y CO_2 en el reservorio de cultivo celular se utilizó un chip sin células. Se usó un sensor óptico de oxígeno con compensación de temperatura (FOSPOR-T1000-TS-NEO, Ocean Optics, FL, EE. UU.) acoplado a

un fluorímetro (NeoFox-GT, Ocean Optics). Para calibrar la sonda, se utilizó el método de calibración de dos puntos. Se preparó una disolución de sulfito de sodio 1 M a la cual se le asignó una concentración de oxígeno de 0% y al agua pura saturada con aire a la cual se le asignó un valor del 20.9%. Para las mediciones de oxígeno, se prepararon disoluciones de L-ascorbato de sodio (NaHAsc) (0,001 - 1 M) en una disolución amortiguadora de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (0.8 M) y carbonato de sodio (Na₂CO₃) (65 mM) en agua desionizada. Se añadieron 14 mL de cada disolución de ascorbato en el reservorio externo y se colocaron 1.5 mL de una disolución de bicarbonato de sodio (10 mM) en el reservorio de cultivo. La sonda de oxígeno se introdujo en una tapa perforada y se colocó en el fondo del reservorio de cultivo. El dispositivo se mantuvo a 37°C en una parrilla de calentamiento. La concentración de oxígeno se midió cada minuto durante 24 h. Para evaluar la estabilidad de la concentración de O₂ por más de 24h, se utilizó una solución de ascorbato 1 M en solución amortiguadora y las mediciones se realizaron durante 90 h. Como blanco se empleó una disolución amortiguadora sin ascorbato.

La presión parcial de CO₂ (pCO₂) en el microdispositivo se calculó a partir del valor de pH medido de una solución diluida de bicarbonato de sodio. El reservorio de cultivo se llenó con 1,5 ml de NaHCO₃ 10 mM diluido en agua desionizada y el reservorio de PMMA se llenó con 14 ml de la disolución amortiguadora de carbonato con y sin ascorbato. El pH y la temperatura se midieron en el reservorio de cultivo. Los valores de pH y de pCO₂ determinados empleando la disolución amortiguadora se compararon con los valores obtenidos con la disolución amortiguadora con ascorbato. El valor de pCO₂ se calculó a partir de la expresión siguiente la cual se deriva de los equilibrios químicos involucrados en un sistema de CO₂ – HCO₃³⁻ – CO₃²⁻ (Takano et al., 2014).

$$pCO_2 = \frac{10 \times 10^{-3}}{K_H \left(1 + \frac{K_1}{10^{-pH}} + \frac{K_1 K_2}{10^{-2pH}} \right)}$$

Donde:

pCO₂ = presión parcial de CO₂
 K_H = Constante de Henry para CO₂ (en fase gaseosa)
 K₁ y K₂ = Constantes de disociación para el ácido carbónico

Los valores de K_H, K₁ y K₂ se calcularon utilizando expresiones empíricas dependientes de la temperatura reportadas por Plummer & Busenberg, 1982 .

4.4.4) Cultivo celular en los microdispositivos.

Previo al sembrado, los dispositivos y las tapas se esterilizaron con luz UV ($\lambda=254$ nm) dentro de la campana de flujo laminar durante 1h. Cuando las células HUVEC alcanzaron el 80-90% de confluencia, se despegaron de la superficie de cultivo con una disolución de enzimas proteolíticas (Accutase®), se concentraron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos, y se suspendieron de nuevo en solución salina balanceada de Hank (HBSS). Se contaron las células con un contador automático (Scepter™ 2.0 Cell Counter, Millipore) ajustando la densidad celular de sembrado en un intervalo de $0.5-2 \times 10^5$ células/pozo. Posteriormente las células se suspendieron en un hidrogel de fibrina-colágeno preparado de la siguiente manera: se mezclaron 40 μ L de HBSS sin rojo de fenol con 10 μ L de fibrinógeno (25 mg / ml) , 2 μ L de colágeno tipo I y 0,5 μ L de trombina (50 U / ml). Se tomaron 50 μ L de la suspensión celular en gel y se depositaron en el fondo del pozo del microdispositivo y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la gelificación completa. Se añadieron 1.5 mL de medio EGM-2 y se incubaron a 37°C.

4.4.4.1) Evaluación de la formación de redes en condiciones de normoxia e hipoxia

Para lograr la formación de la red vascular, las células HUVEC se cultivaron con medio de cultivo EGM-2 acondicionado (medio utilizado en el cultivo de fibroblastos de pulmón (hLF)) durante al menos 24 horas. Se añadió la disolución amortiguadora de carbonato en el reservorio correspondiente y ambos reservorios se cerraron con tapas estériles. Para los experimentos en condiciones normales de oxígeno (normoxia), las células se incubaron en una solución amortiguadora sin ascorbato durante 240 h (10 días), realizando cambios a la solución amortiguadora y al medio de cultivo cada 72 h y evaluando las células diariamente al microscopio. Para los experimentos en hipoxia, las células sembradas en los dispositivos se incubaron inicialmente durante 24 h, 36 h y 72 h a 37 ° C en un tampón sin ascorbato (incubación preliminar en normoxia) y luego se realizó la transición a hipoxia cambiando a una amortiguadora con ascorbato 1 M. La solución amortiguadora se cambió cada 72 h y se mantuvieron durante 168h (7 días) evaluando diariamente las células mediante microscopía de campo claro. Las células cultivadas en condiciones de normoxia-hipoxia se compararon con células

cultivadas en normoxia durante el mismo tiempo total de cultivo (controles). El esquema de los experimentos se resume en la Figura 4-2.

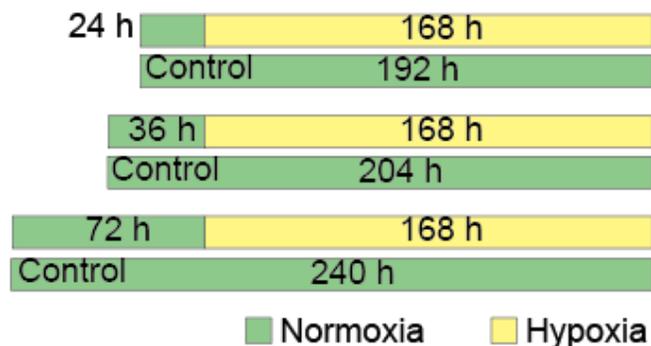


Figura 4-2. Esquema de los experimentos de transición de normoxia e hipoxia.

Las redes tridimensionales formadas se analizaron cuantitativamente mediante *Angiogenesis analyzer*. Este software es un complemento para Image J el cual detecta las redes vasculares y analiza la organización de las células endoteliales. Los parámetros de la redes (número de mallas, número de ramificaciones, longitud total) en condiciones de normoxia-hipoxia se compararon con los valores obtenidos para los controles.

Después de mantener las células en hipoxia por 168h, se midió la viabilidad celular utilizando el kit de tinción de células LIVE / DEAD II. Se preparó una solución de trabajo de calceína-AM 8 μM y de homodímero de etidio-1 (EthD-1) 16 μM en HBSS sin rojo fenol. El medio EGM-2 se retiró de los dispositivos y los cultivos se lavaron dos veces con 1.5 mL de HBSS. Se añadieron 150 μL de la solución de trabajo en el pozo. Y los dispositivos se incubaron en la oscuridad a 37 ° C durante 30 min. Posteriormente, el gel se retiró del chip y se colocó en un portaobjetos de vidrio. Se tomaron y registraron imágenes mediante un microscopio de fluorescencia invertido. Cada uno de los experimentos se realizó por duplicado.

4.5) RESULTADOS Y ANÁLISIS.

4.5.1) Evaluación de los niveles de oxígeno y dióxido de carbono.

Para lograr y mantener los diferentes niveles de hipoxia, se empleó L-ascorbato de sodio como captador de oxígeno. Este compuesto tiene baja toxicidad y transparencia óptica en comparación con otros eliminadores de oxígeno como los compuestos ferrosos o fenólicos. Estas características son ventajosas sobre otros

eliminadores, especialmente cuando el ascorbato está en contacto con los medios de cultivo celular a través de PDMS (Futai *et al.*, 2014).

En la Figura 4-3a se muestra la caracterización de las concentraciones de oxígeno en el microdispositivo en función de la concentración de ascorbato añadida en la disolución amortiguadora y en la Figura 4-3b la evaluación a diferentes días para la concentración más baja de oxígeno alcanzada. Recordando que las mediciones de oxígeno se realizaron en un microdispositivo sin células. El nivel de oxígeno disminuyó a medida que aumentó la concentración de ascorbato en la solución amortiguadora. Puede observarse que a la máxima concentración de ascorbato de sodio (1 M), se alcanzó la mínima presión parcial de O₂ siendo de $4,91 \pm 0,86\%$ de pO₂ después de las primeras 2 h de incubación. Esta concentración pudo mantenerse durante 90 h. La mínima concentración O₂ alcanzada en estos microdispositivos fue consistente con lo ya reportado en la literatura (Takano *et al.*, 2014).

Para garantizar la portabilidad del microdispositivo, además del control de oxígeno, el nivel de CO₂ es otro factor importante que ayuda a regular el nivel de pH del medio de cultivo. Es por ello por lo que los sistemas convencionales de incubación usados para el cultivo celular suministran CO₂ al 5%, lo que mantiene un equilibrio con los iones HCO₃⁻ presentes en el medio de cultivo. En el dispositivo se utilizó una disolución amortiguadora de carbonato que genera el CO₂ necesario para las células eliminando el uso de sistemas de incubación con control de gases u otro tipo de infraestructura complicada. En la Tabla 11 se muestra el pH y valores de pCO₂ calculados en condiciones de hipoxia y no hipoxia. La concentración de bicarbonato 0,8 M y carbonato 65 mM en la disolución amortiguadora fue adecuada para proporcionar una concentración de $5,19 \pm 1,70\%$ de CO₂. La adición de ascorbato de sodio a la disolución amortiguadora no afectó la concentración de CO₂ ya que en ambos casos se calcularon valores de pH equivalentes. El ascorbato de sodio (base conjugada del ácido ascórbico, no reacciona con los iones carbonato y bicarbonato de la disolución amortiguadora.

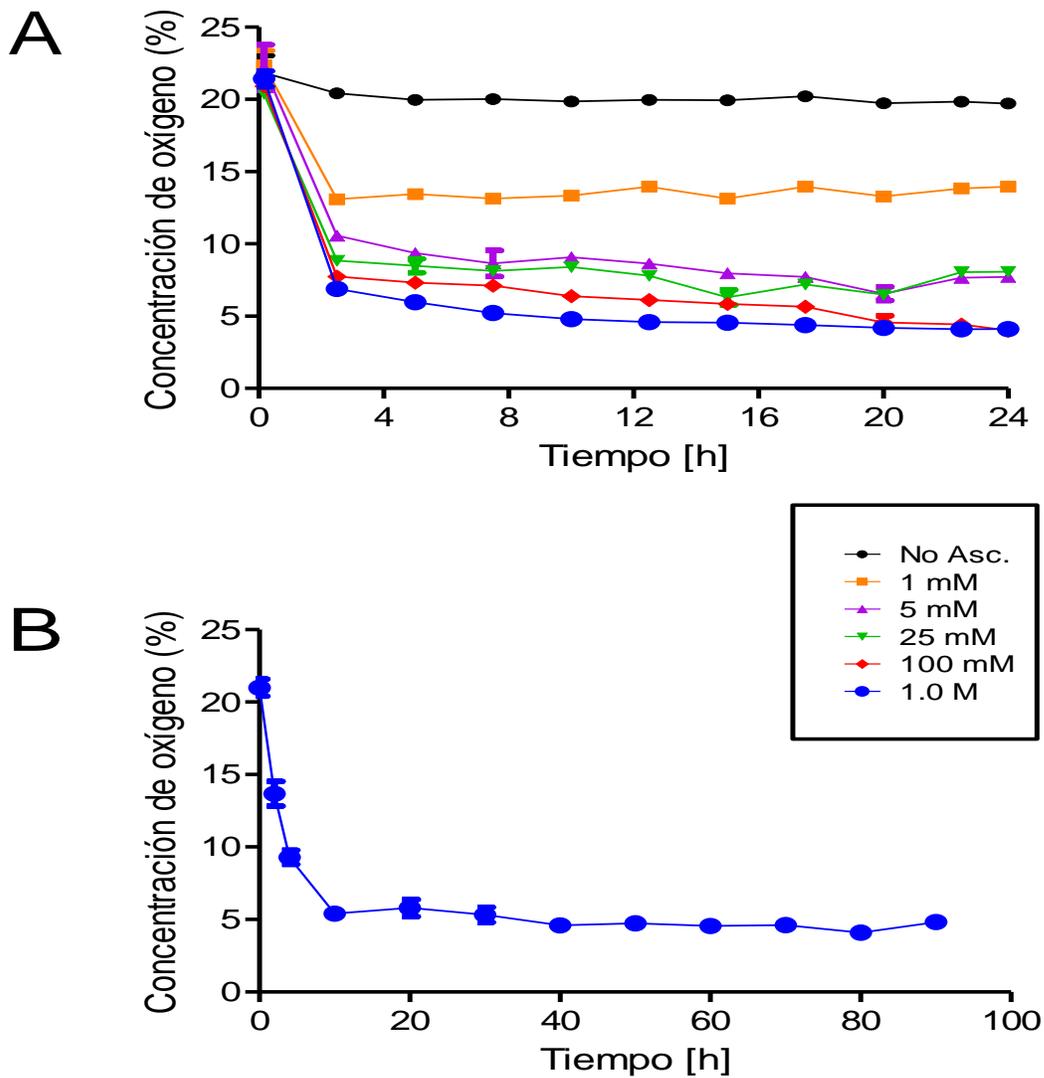


Figura 4-3. Concentración de oxígeno en el microdispositivo en función del tiempo. (a) Evaluación de ascorbato en un intervalo de 1mM a 1 M hasta 24h, (b). Evolución de la concentración de oxígeno después de 24h asociada a la máxima concentración de ascorbato.

Tabla 11. Valores de pH y de pCO₂ calculadas para las condiciones de hipoxia y no hipoxia

Condición	pH	Temperature (°C)	pCO ₂ (%)
Amortiguador sin ascorbato(Normoxia)	7.13 ± 0.18	36.8 ± 0.06	5.19 ± 1.70
Amortiguador con ascorbato (Hipoxia)	7.11 ± 0.07	36.4 ± 0.05	5.22 ± 0.72

4.5.2) Formación de redes vasculares en condiciones de normoxia

A continuación se presentan los resultados de cultivo celular en el microdispositivo. En hidrogeles 3D, las células HUVEC forman estructuras tridimensionales en forma de redes (Ver Figura 1-3, Capítulo 1, Página 19) (Li et al., 2017). Para lograr la formación de redes de células HUVEC se requirió de la presencia de fibroblastos, los cuales secretan factores de crecimiento que promueven la organización de células endoteliales (Newman, et al, 2011). En un experimento preliminar se cultivaron simultáneamente fibroblastos (hLF) y células HUVEC y se evaluó la formación de redes. Sin embargo, bajo esta configuración fue difícil observar solo la red de células HUVEC y en la mayoría de los casos solo se podían observar las células hLF. Por lo tanto, se propuso el cultivo individual de células HUVEC usando medio EGM-2 acondicionado con hLF el cual previamente se utilizó en el cultivo de estas células y por lo tanto cuenta con los metabolitos secretados que promueven la generación de redes (Santo et al., 2009). Las células HUVEC sembradas en el microdispositivo a una densidad de $2.0 \pm 0.1 \times 10^5$ células / pozo ($1.59 \pm 0.07 \times 10^4$ células / mm^2) formaron redes a partir de las 72h de incubación (Figura 4-4c). Una densidad celular superior a 2.0×10^5 células / pozo no permitió la visibilidad de redes debido a la alta confluencia celular. Por otro lado, la baja densidad celular no permitió la propagación celular y la formación de redes (Figura 4-4a y Figura 4-4b).

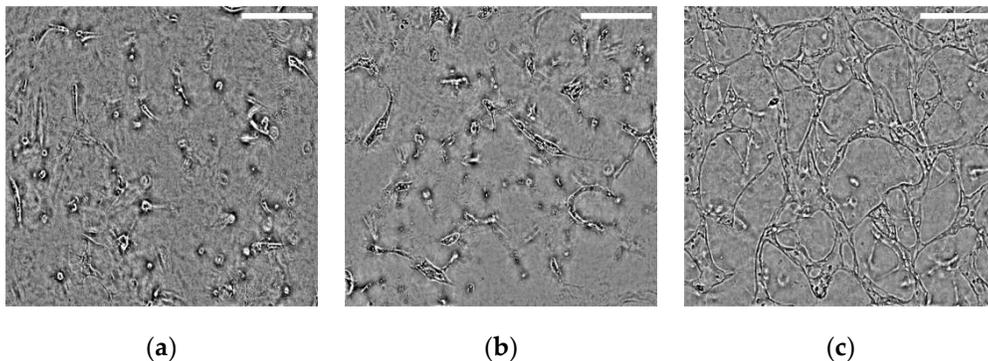


Figura 4-4. Optimización de la densidad de sembrado de HUVECs basada en la formación de redes a las 72h de cultivo: (a) 0.5×10^5 células / pozo; (b) 1×10^5 células / pozo; (c) 2×10^5 células / pozo. Barra de escala = $150 \mu\text{m}$

El desarrollo de redes vasculares en el microdispositivo se presenta en la Figura 4-5. La proliferación de las células HUVEC se observó en el día 2. Los lúmenes (espacios internos dentro de una estructura tubular) se definieron mejor

en el día 3 y se mantuvieron durante al menos 240 h (10 días) en condiciones normales de oxígeno.

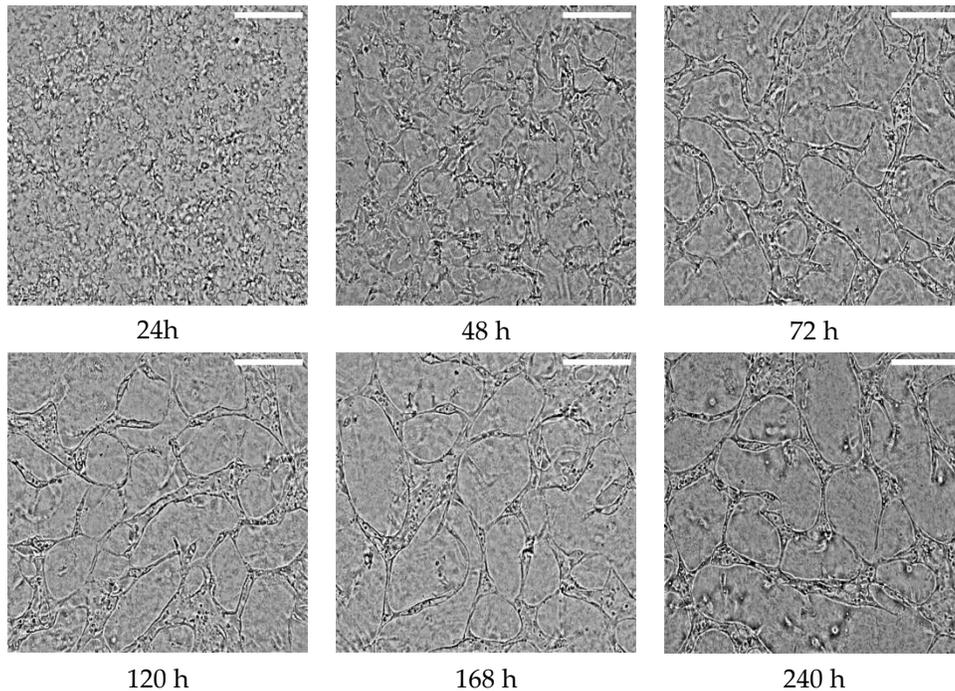


Figura 4-5. Desarrollo de redes vasculares en el microdispositivo en (condiciones de normoxia hasta por 240h. Barra de escala = 150 μm .

4.5.3) Formación de redes bajo transiciones de normoxia-hipoxia.

Después de caracterizar la formación de redes en condiciones de normoxia, se probó cultivar en condiciones de hipoxia ($4,91 \pm 0,86\%$ pO_2) utilizando la solución amortiguadora con ascorbato. En una primera prueba se sembraron las células e inmediatamente se les expuso al ambiente de hipoxia, pero esta condición no permitió la proliferación celular ni la formación de redes. Debido a ello, se propuso un modelo de transición en el cual primero se mantienen las células en normoxia (preincubación) y después se incuban en condiciones de hipoxia.

La Figura 4-6 muestra imágenes de células HUVEC bajo diferentes transiciones de normoxia/hipoxia. La incubación preliminar en normoxia durante 72h permitió un mejor desarrollo de la red vascular en comparación con la incubación preliminar normóxica durante 24 o 36 h.

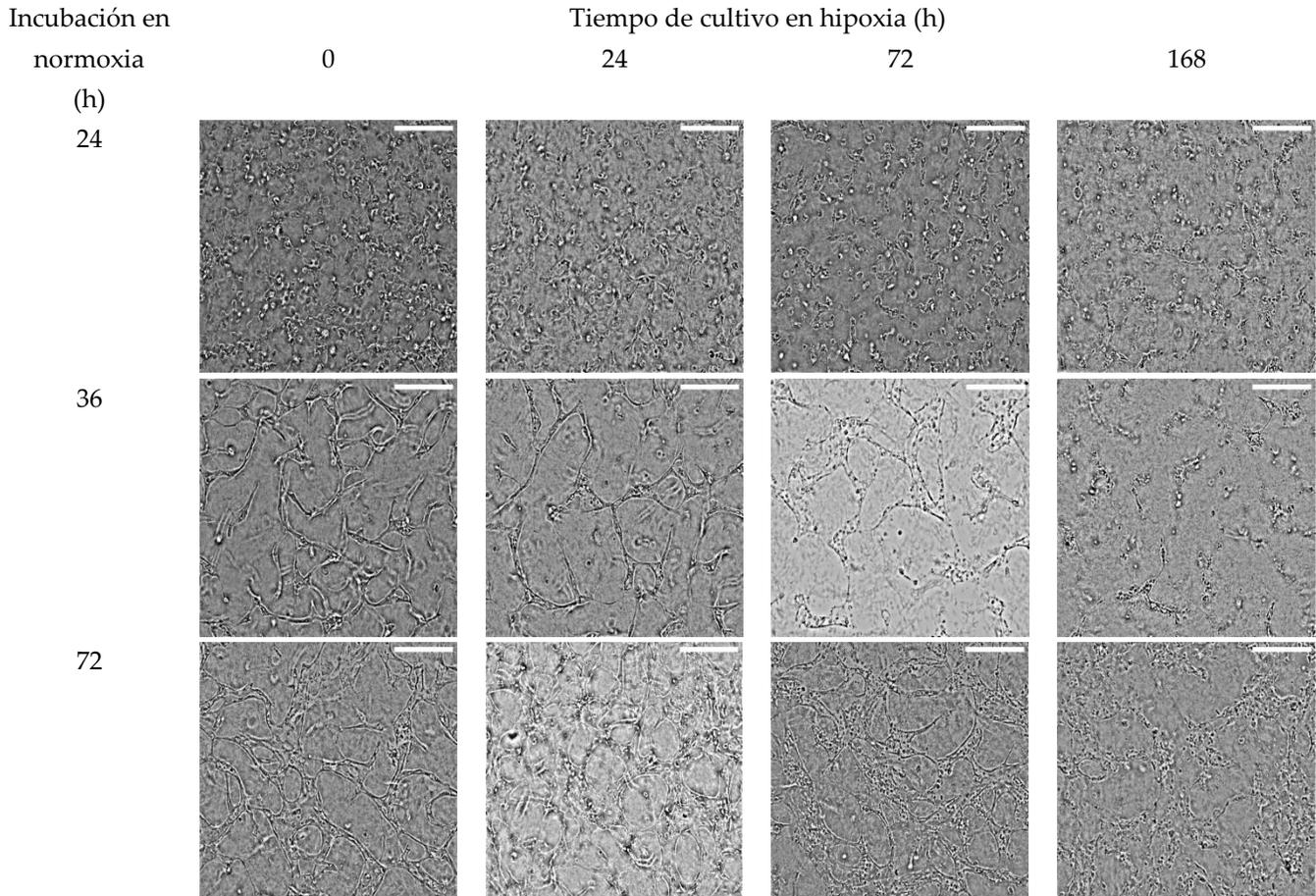


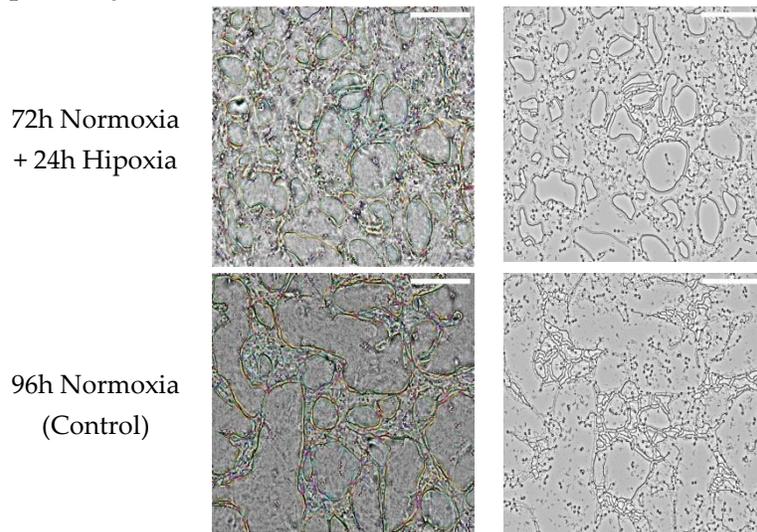
Figura 4-6. Evolución temporal de redes vasculares HUVEC bajo diferentes transiciones de normoxia / hipoxia. Barra de escala = 150 μ m

La Figura 4-7a muestra imágenes representativas de redes formadas por incubación preliminar durante 72 h en normoxia e incubadas durante 24 h en hipoxia, y las redes formadas durante 96 h de normoxia (control). En el cultivo expuesto a 24h de hipoxia aumentó el desarrollo de la red vascular y la lumenización, en comparación con la incubación con normoxia durante 96 h ya que se formaron redes con más densidad celular que las condiciones control. En la Figura 4-7b se muestra que después de 72 h de incubación preliminar en normoxia, más la hipoxia de 24 h, incrementó el área total de la malla. Aumentaron la longitud total en un 41%, los segmentos totales y la longitud de ramificación; mientras que se redujo el número de elementos aislados en comparación con las redes formadas en condiciones control.

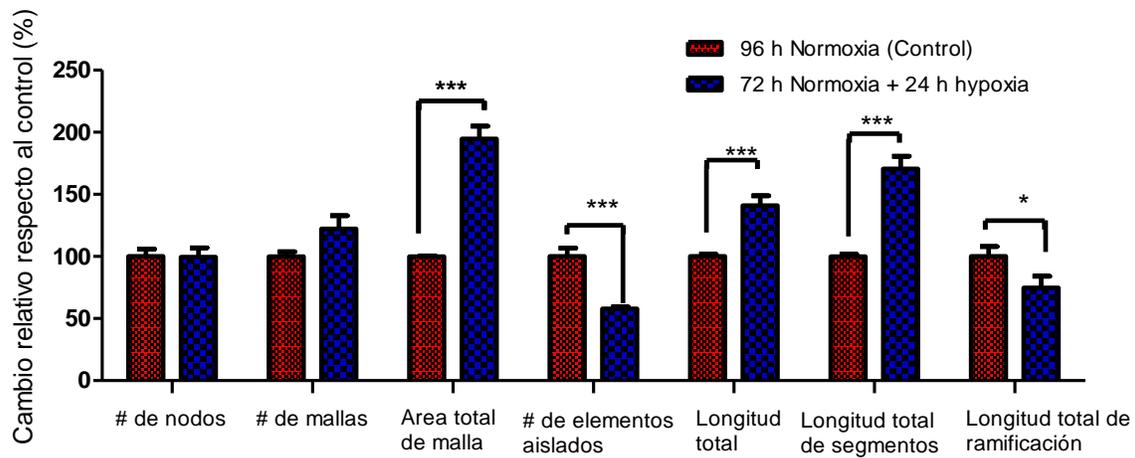
En la Figura 4-7c se muestran los parámetros a diferentes tiempos de incubación preliminar en normoxia. El tiempo de incubación preliminar en normoxia, aumentó el número de nodos, mallas y ramas. Asimismo, redujo el

número de elementos aislados, signo de una mayor estructuración de la red. En la Figura 4-7d se puede observar que el tamaño y ramificación (# segmentos, área y longitud) de la red fue proporcional al tiempo de incubación

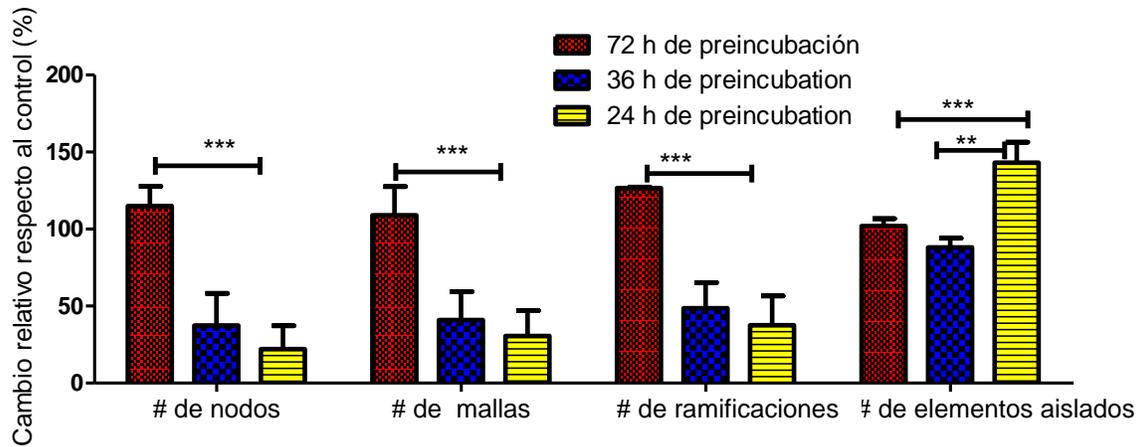
En la Figura 4-7e se presenta el número de uniones de la red en función del tiempo de incubación preliminar y de incubación en hipoxia. En condiciones de 24 y 36 h de incubación preliminar en normoxia, no permitieron el desarrollo de redes en condiciones de hipoxia. En comparación, las redes formadas por incubación preliminar durante 72h, mantuvieron la estructura hasta por 72h en condiciones de hipoxia, a tiempos mayores las redes iban desestabilizándose.



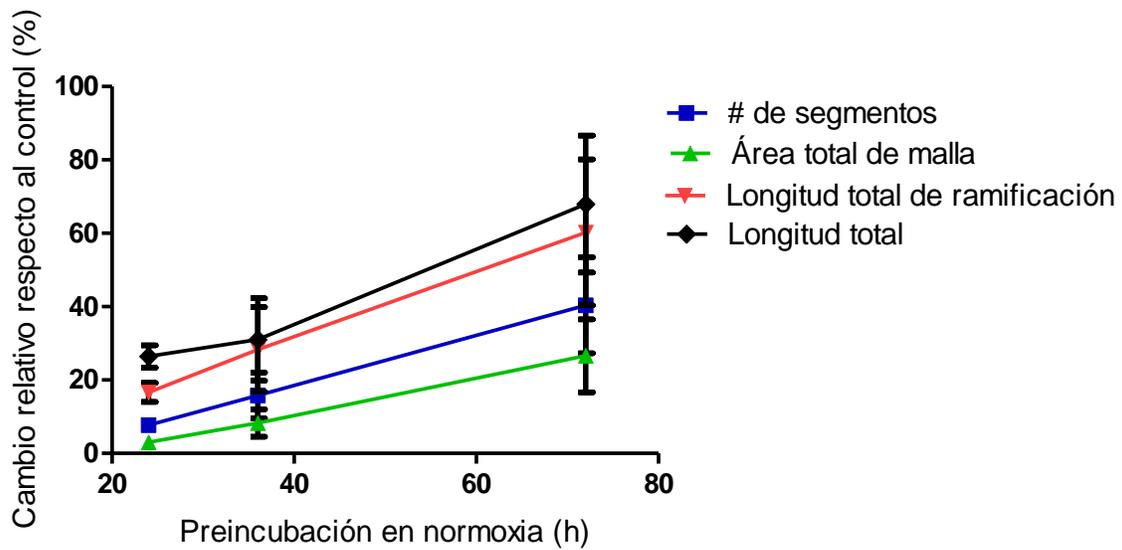
(a)



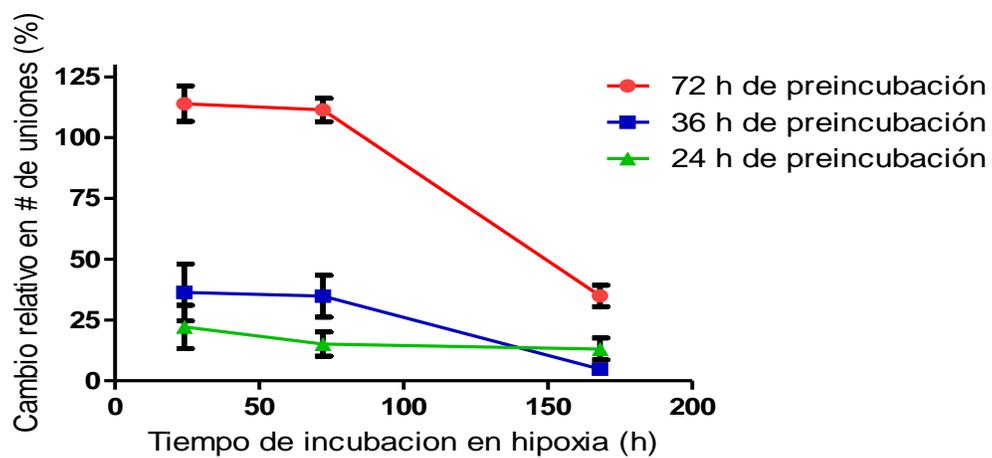
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4-7. Parámetros de las redes vasculares de células HUVEC en diferentes condiciones de normoxia e hipoxia. a) Imágenes representativas de redes (barra de escala = 150 μm); b) Parámetros angiogénicos de células cultivadas en normoxia (72 h) + hipoxia (24 h) y células control (normoxia por 96 h); c) Parámetros angiogénicos en células incubadas preliminarmente en normoxia durante 24 h, 36 y 72 h y cambiadas a hipoxia durante 24 h; d) Relación lineal entre el tiempo de preincubación en normoxia y los parámetros de la red vascular; e) Efecto de la incubación en hipoxia sobre el cambio relativo en el número de uniones.

4.5.4) Viabilidad celular

Después de mantener el cultivo de células en hipoxia durante 7 días, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de LIVE/DEAD. Este método fluorimétrico se basa en la reacción de colorantes fluorescentes con componentes celulares. La calceína-AM (CAM) penetra en las células y mediante la actividad enzimática de esterasa intracelular se convierte en calceína fluorescente que se retiene dentro de las células viables, dando como resultado una intensa fluorescencia verde uniforme. Por otro lado, la tinción de ácidos nucleicos con el homodímero de etidio-1 (EthD1) tiene una baja fluorescencia hasta que pasa a través de las membranas rotas de las células no viables, uniéndose al ADN y emitiendo una intensa fluorescencia roja (Diaz, 2015).

En la Figura 4-8a, se observan las imágenes de fluorescencia de las células HUVEC incubadas preliminarmente durante 24h, 36 y 72h y posteriormente a una prolongada incubación en normoxia e hipoxia (168 h). Para cada condición de preincubación, la población de células vivas incubadas en normoxia fue mayor que las células cultivadas en hipoxia durante 168 h. Además, como se muestra en la Figura 4-8b, la relación entre la población de células vivas / muertas fue proporcional al tiempo de incubación preliminar en normoxia.

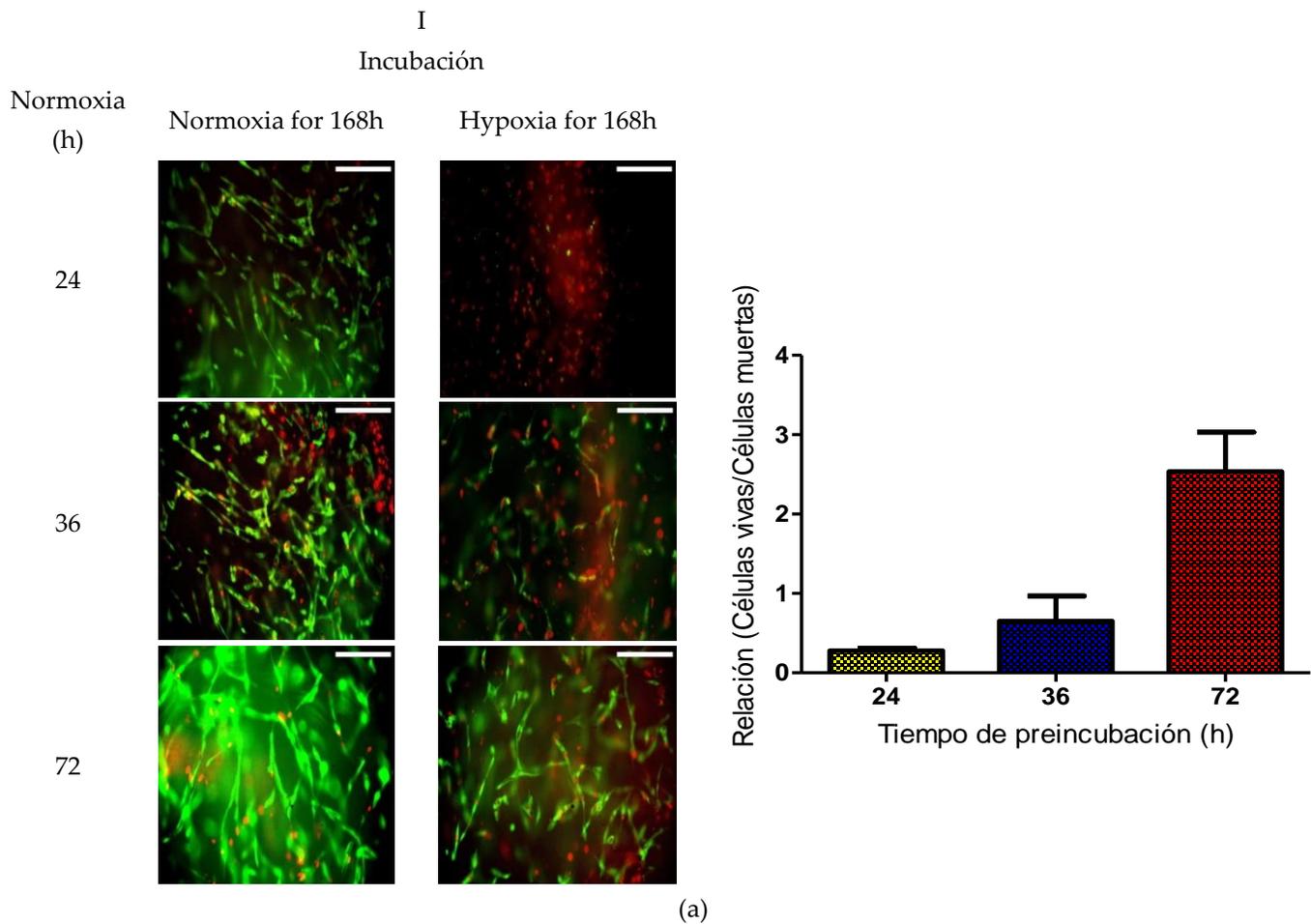


Figura 4-8. Ensayo de viabilidad en células HUVEC cultivadas en normoxia e hipoxia. a) Imágenes de fluorescencia de las células evaluadas por el ensayo LIVE / DEAD. Barra de escala = 150 μ m, b) Relación de células vivas / muertas en función del tiempo de preincubación en condiciones de normoxia.

4.6) CONCLUSIONES

Se desarrolló un microdispositivo autónomo portátil para el cultivo tridimensional de células HUVEC (gel de fibrina-colágeno) que permitió exponer a las células a transiciones de normoxia / hipoxia. El sistema amortiguador acoplado permite el control de las concentraciones de O₂ y CO₂ en esos cultivos celulares de una manera sencilla, sin requerir del uso de sistemas externos para el control de gases, lo que disminuye los costos por ensayo.

Se confirmó que el sembrado de $1.59 \pm 0.07 \times 10^4$ células / mm² y el uso de medio acondicionado con fibroblastos permite la formación de redes vasculares de una manera reproducible en el microdispositivo. Posteriormente se evaluó el tiempo de incubación preliminar en normoxia y se observó que influye en el efecto de hipoxia en el desarrollo y la estabilidad de las redes vasculares. A mayores tiempos de preincubación (72 h) aumenta el desarrollo de redes y esta condición favorece el efecto promotor vascular de hipoxia durante 24 h.

A medida que se obtenga mayor disponibilidad en el uso de estos dispositivos, será posible emplearlos para estudios de angiogénesis, biología molecular, o el estudio de antioxidantes en condiciones fisiológicas de oxígeno y conocer más acerca de los mecanismos que influyen en la formación de redes vasculares y cuál es su importancia en la resistencia de células frente a condiciones adversas como la falta de oxígeno.

Dada la importancia de la hipoxia en muchas áreas de la biología y la medicina, el desarrollo de un dispositivo simple que cree condiciones controlables de hipoxia es un paso adelante hacia el desarrollo en el cultivo de organoides u otro tipo de modelos biomiméticos. Además, la adaptación de las células endoteliales al ambiente de normoxia-hipoxia dependiente del tiempo de preincubación o madurez de las redes puede abrir una perspectiva diferente del estudio de cultivos celulares. Teniendo en cuenta que el microambiente tiene un papel importante en diversas actividades biológicas *in vivo* e influye en la respuesta celular frente a estímulos químicos. Poder integrar estas dependencias en un solo microdispositivo lo presenta como un buen modelo para la investigación biomédica.

CONCLUSIONES GLOBALES

En este trabajo se desarrollaron microdispositivos para el cultivo y estudios con líneas celulares. Se logró el cultivo 2D de células LLC-PK1 en chips de canal sencillo y la evaluación de viabilidad celular utilizando por primera vez el indicador de rojo neutro en estos microsistemas. El efecto de compuestos fenólicos y extracto natural de vainilla en células LLC-PK1 fue similar en cultivos en macro y microescala. El microdispositivo permitió la miniaturización del ensayo de viabilidad por rojo neutro, con las ventajas de la disminución del volumen de reactivos y medio, empleando técnicas sencillas basadas en análisis de imágenes de microscopia, sin requerir instrumentación adicional y manteniendo las células integra. El ensayo de Rojo Neutro se presentó como una alternativa al ensayo MTT para la evaluación de compuestos con potencial capacidad antioxidante.

Por otro lado, se desarrolló un microdispositivo para el mantenimiento de células en entornos 3D y en condiciones controladas de oxígeno y dióxido de carbono de manera autónoma y portátil, mantuvo buena accesibilidad óptica y es de fácil manipulación. Esto permitió realizar el cultivo de células endoteliales HUVEC. La adaptación de las células endoteliales a la transición de la normoxia a la hipoxia es un enfoque que permitió la formación y el mejor desarrollo de una red vascular. Esto es de importancia en el desarrollo de microdispositivos más avanzados para el cultivo celular, como el cultivo de organoides, que actualmente presentan dificultades técnicas para su mantenimiento a largo plazo ya que carecen de un sistema vascular que permita el suministro de nutrientes y excreción de metabolitos.

La concentración de oxígeno, así como el mantenimiento en entornos tridimensionales son factores relevantes en el análisis de la respuesta celular. La evaluación del efecto de los compuestos fenólicos y extracto de vainilla en los cultivos a micro y macroescala se realizó en condiciones de oxigenación estándar (5% de CO₂ y 95% aire) y empleando cultivos en monocapa, sin embargo, aún quedan varias incógnitas por responder en relación a la respuesta de las células expuestas a antioxidantes en cultivos 3D e hipoxia. Los microdispositivos desarrollados en este trabajo representan una opción sencilla y confiable para estudios futuros con antioxidantes. Y a su vez, el desarrollo de sistemas avanzados de cultivo en organoides promete ser una opción en el futuro para su futura implementación en ensayos preclínicos.

Los microdispositivos de cultivo celular son una opción simple, accesible y portátil para el mantenimiento de cultivos celulares y son un avance tecnológico que potencialmente podrían incidir en áreas de la industria química, farmacéutica, médica, alimentaria., etc., ya que disminuye los costos e infraestructura requerida para su implementación. Además, tienen mayor potencial para simular las condiciones de sistemas *in vivo* que los sistemas convencionales.

REFERENCIAS

- Arranz, M.J., Festing, M.F.W., 1990. Prior use of the neutral red assay and reduction of total protein determination in 96-well plate assays. *Toxicol. Vitro*. 4, 211–212.
- Arrebola, D.F.A., Fernández, L.A.R., Sánchez, D.L.C., 2003. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Rev. toxicológica en línea* 40–53.
- Aslantürk, Ö.S., 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, in: Larramendy, M.L., Soloneski, S. (Eds.), *Genotoxicity-A Predictable Risk to Our Actual World*. IntechOpen: Rijeka, Croatia, pp. 1–17.
- Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., Rodrigues, R.M., 2017. Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay., in: *Cell Viability Assays*. Humana Press, New York, NY., pp. 19–26.
- Ávila, F., Theoduloz, C., López-alarcón, C., Dorta, E., Schmeda-Hirschmann, G., 2017. Cytoprotective Mechanisms Mediated by Polyphenols from Chilean Native Berries against Free Radical-Induced Damage on AGS Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/9808520>
- Bastidas, O., 2013. Cell counting with Neubauer chamber. *Celeromics, Tech. Rep.*
- Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., Vaubourdoles, M., 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat. Protoc.* 2, 481–485. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>
- Bezerra, D.P., Soares, A.K.N., Sousa, D.P., 2016. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/9734816>
- Bodas, D., Khan-Malek, C., 2007. Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation. *Sensors Actuators, B Chem.* 123, 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.08.037>
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. tissue Cult. methods* 9, 7–9.
- Bouhifd, M., Bories, G., Casado, J., Coecke, S., Norlén, H., Parissis, N., Rodrigues, R.M., Whelan, M.P., 2012. Automation of an in vitro cytotoxicity assay used to estimate starting doses in acute oral systemic toxicity tests. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2084–2096. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.046>
- Boussommier-Calleja, A., Li, R., Chen, M.B., Wong, S.C., Kamm, R.D., 2016. Microfluidics: A New Tool for Modeling Cancer–Immune Interactions. *Trends in Cancer* 2, 6–19. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.12.003>
- Brajša, K., Trzun, M., Zlatar, I., Jelić, D., 2016. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period. Biol.* 118, 59–65. <https://doi.org/10.18054/pb.2016.118.1.3940>
- Byun, C.K., Abi-samra, K., Cho, Y., Takayama, S., 2014. Pumps for microfluidic cell culture. *Electrophoresis* 35, 245–257. <https://doi.org/10.1002/elps.201300205>
- Calahorra, J., Martínez-Lara, E., De Dios, C., Siles, E., 2018. Hypoxia modulates the antioxidant effect of hydroxytyrosol in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 13, 1–16.
- Çam, M., Durmaz, G., Çetin, A., Yetim, H., 2013. Antioxidant capacity of pomegranate juice and its role in biological activities, 1st ed, *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal*

- Disease. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397154-8.00008-7>
- Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. El, Matejuk, A., Grillon, C., Kieda, C., 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>
- Castor, L.R.G., Locatelli, kátia A., Ximenes, V.F., 2010. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1636–1643. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.010>
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., Noisa, P., 2019. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J. Stem Cells* 11, 1065–1084. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>
- Chang, C., Cheng, Y., Tu, M., Chen, Y., Peng, C., Liao, W., Tung, Y., 2014. Lab on a Chip microfluidic device capable of generating. *Lab Chip* 3762–3772. <https://doi.org/10.1039/C4LC00732H>
- Choi, J.R., Song, H., Sung, J.H., Kim, D., Kim, K., 2016. Microfluidic assay-based optical measurement techniques for cell analysis: A review of recent progress. *Biosens. Bioelectron.* 77, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.068>
- Collins, T.J., 2007. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43, S25–S30. <https://doi.org/10.2144/000112517>
- Coluccio, M.L., Perozziello, G., Malara, N., Parrotta, E., Zhang, P., Gentile, F., Limongi, T., Michael, P., Cuda, G., Candeloro, P., Di, E., 2019. Microelectronic Engineering Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectron. Eng.* 208, 14–28. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2019.01.004>
- de Guzman, C.C., Zara, R.R., 2012. Vanilla, in: Peter, K. V. (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition., pp. 547–589.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271–277.
- Devadas, D., & Young, E.W., 2016. Microfluidics for cell culture., in: Lu, C., Verbridge, S.S. (Eds.), *Microfluidic Methods for Molecular Biology*. Springer International Publishing., pp. 323–347.
- Diaz, L.A.C., 2015. *Designing Ionic-Complementary Hydrogels for Bone Tissue Repair*. The University of Manchester (United Kingdom).
- Domenech, M., Yu, H., Warrick, J., Badders, N. M. Meyvantsson, I. Alexander, C.M., Beebe, D.J., 2009. Cellular observations enabled by microculture: paracrine signaling and population demographics. *Integr. Biol.* 1, 267–274.
- Doonan, F., Cotter, T.G., 2008. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 44, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.006>
- Duval, K., Grover, H., Han, L.H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., Chen, Z., 2017. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* 32, 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Elsherbiny, N.M., Younis, N.N., Shaheen, M.A., Elseweidy, M.M., 2016. The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathol. -- Res. Pract.* 212, 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.06.004>

- Falconnier, B., Lapiere, C., Lesage-meessen, L., Yonnet, G., Colonna-ceccaldi, B., Corrieu, G., Asther, M., 1994. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* 1-937 : Identification of metabolic pathways. *J. Biotechnol.* 37, 123–132. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90003-5)
- Freshney, R.I., 2010. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*, 6th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>
- Fujii, H., Yokozawa, T., Kim, Y.A., Tohda, C., Nonaka, G., 2006. Protective Effect of Grape Seed Polyphenols against High Glucose-Induced Oxidative Stress Protective Effect of Grape Seed Polyphenols against. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2104–2111. <https://doi.org/10.1271/bbb.60053>
- Gärtner, C., Ungerböck, B., Schulz, I., Jahn, T., Mosig, A., Mayr, T., Becker, H., 2015. Sensor enhanced microfluidic devices for cell based assays and organs on chip. *Smart Biomed. Physiol. Sens. Technol.* 9487.
- Gerasimenko, T., Nikulin, S., Zakharova, G., Poloznikov, A., 2020. Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00474>
- Gonzalez, M.E., Jernstedt, J.A., Slaughter, D.C., Barrett, D.M., 2010. Microscopic Quantification of Cell Integrity in Raw and Processed Onion Parenchyma Cells. *J. Food Sci.* 75, 402–408. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01764.x>
- Gordon, J.L., Brown, M.A., Reynolds, M.M., 2018. Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. *Diseases* 6, 85. <https://doi.org/10.3390/diseases6040085>
- Gough, A., Stern, A.M., Maier, J., Lezon, T., Shun, T., Chennubhotla, C., Schurdak, M.E., Haney, S.A., Taylor, D.L., 2017. *Biologically Relevant Heterogeneity : Metrics and Practical Insights*. <https://doi.org/10.1177/2472555216682725>
- Grebenyuk, S., Ranga, A., 2019. Engineering organoid vascularization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00039>
- Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R., Fleming, R.M.T., 2015. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* 63, 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029>
- Halliwell, B., 2014. Cell Culture, Oxidative Stress, and Antioxidants: Avoiding Pitfalls. *Biomed. J.* 37, 99–105. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.128725>
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203–210.
- Harish, R., Divakar, S., Srivastava, A.N.U.P., Shivanandappa, T., 2005. Isolation of Antioxidant Compounds from the Methanolic Extract of the Roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight and Arn .). *J. Agric. Food Chem.* 53, 7709–7714. <https://doi.org/10.1021/jf051047c>
- Hernández-Fernández, M. Á., Rojas-Avila, A., Vazquez-Landaverde, P. A., Cornejo-Mazón, M., Dávila-Ortiz, G., 2019. Volatile compounds and fatty acids in oleoresins from *Vanilla Planifolia* Andrews

- obtained by extraction with supercritical carbon dioxide. *CYTA - J. Food* 17, 419–430.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1593247>
- Hirsch, C., Schildknecht, S., 2019. In vitro research reproducibility: Keeping up high standards. *Front. Pharmacol.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01484>
- Hoffman, J.A., Papas, B.N., Trotter, K.W., Archer, T.K., 2020. Single-cell RNA sequencing reveals a heterogeneous response to Glucocorticoids in breast cancer cells. *Commun. Biol.* 3, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0837-0>
- Huang, S., 2009. Non-genetic heterogeneity of cells in development : more than just noise 3862, 3853–3862.
<https://doi.org/10.1242/dev.035139>
- Hull, R.N., Cherry, W.R., Weaver, G.W., 1976. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK1. *In Vitro* 12, 670–677. <https://doi.org/10.1007/BF02797469>
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K., 1996. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1518-1520.
- Jaccard, N., Griffin, L.D., Keser, A., Macown, R.J., Super, A., Veraitch, F.S., Szita, N., 2014. Automated Method for the Rapid and Precise Estimation of Adherent Cell Culture Characteristics from Phase Contrast Microscopy Images 111, 504–517. <https://doi.org/10.1002/bit.25115>
- Jang, K., Sato, K., Igawa, K., 2008. Development of an osteoblast-based 3D continuous-perfusion microfluidic system for drug screening. *Anal Bioanal Chem* 825–832. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1752-7>
- Jastrzebska, E., Flis, S., Rakowska, A., Chudy, M., Jastrzebski, Z., Dybko, A., Brzozka, Z., 2013. A microfluidic system to study the cytotoxic effect of drugs: the combined effect of celecoxib and 5-fluorouracil on normal and cancer cells. *Microchim. Acta* 180, 895–901.
<https://doi.org/10.1007/s00604-013-1009-4>
- Jiménez, N., Krouwer, V.J., Post, J.A., 2013. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology* 65, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9459-9>
- Kamat, J.P., Ghosh, A., Devasagayam, T.P.A., 2000. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: Inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Mol. Cell. Biochem.* 209, 47–53. <https://doi.org/10.1023/a:1007048313556>
- Khan, H.Y., Zubair, H., Faisal, M., Ullah, M.F., Farhan, M., Sarkar, F.H., Ahmad, A., Hadi, S.M., 2014. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation : A mechanism for cancer chemopreventive action 437–446.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300417>
- Kim, S., Kim, H.J., Jeon, N.L., 2010. Biological applications of microfluidic gradient devices. *Integr. Biol.* 2, 584–603. <https://doi.org/10.1039/c0ib00055h>
- Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Volponi, A.A., Piotrowska-kempisty, H., Antosik, P., Dyszkiewicz-konwi, M., 2019. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J. Clin. Med.* 8,

1602.

- Korthou, H., Verpoorte, R. V., 2007. Vanilla., in: Berger, R.G. (Ed.), *Flavours and Fragrances*. Berlin: Springer., pp. 203–217.
- Krock, B.L., Skuli, N., Simon, M.C., 2011. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* 2, 1117–1133. <https://doi.org/10.1177/1947601911423654>
- Lee, S.H., Park, J., Kwon, D., Yoon, T.H., 2014. An Image Cytometric MTT Assay as an Alternative Assessment Method of Nanoparticle Cytotoxicity. *Bull. Korean Chem. Soc.* 35, 1933–1938.
- Li, Y., Pi, Q.M., Wang, P.C., Liu, L.J., Han, Z.G., Shao, Y., Zhai, Y., Zuo, Z.Y., Gong, Z.Y., Yang, X., Wu, Y., 2017. Functional human 3D microvascular networks on a chip to study the procoagulant effects of ambient fine particulate matter. *RSC Adv.* 7, 56108–56116. <https://doi.org/10.1039/c7ra11357a>
- Li, Z., 2011. In Vitro Micro-Tissue and -Organ Models for Toxicity Testing., in: *Comprehensive Biotechnology*. pp. 551–563.
- Lim, K.H., Park, J., Rhee, S.W., Yoon, T.H., 2012. Multiparametric assessment of Cd²⁺ cytotoxicity using MTT-based microfluidic image cytometry. *Cytom. Part A* 81, 691–697. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22079>
- Lin, J.M., 2018. Cell Analysis on Microfluidics.
- Lo, K.Y., Zhu, Y., Tsai, H.F., Sun, Y.S., 2013. Effects of shear stresses and antioxidant concentrations on the production of reactive oxygen species in lung cancer cells. *Biomicrofluidics* 7, 064108. <https://doi.org/10.1063/1.4836675>
- Long, L.H., Evans, P.J., Halliwell, B., 1999. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 605–609. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1263>
- Longares-Patrón, A., Cañizares-Macías, M.P., 2006. Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from vanilla fragans. *Talanta* 69, 882–887. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.11.030>
- López-Alarcón, C., Denicola, A., 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products : A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta* 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- Maldonado-Cubas, J., Casañas-Pimentel, R.G., Martínez-Merlín, Ivan, E., San Martín-Martínez, E., 2018. La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin-American J. Phys. Educ.* 12, 1–7.
- Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., Von Stetten, F., Zengerle, R., 2010. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1153–1182. <https://doi.org/10.1039/b820557b>
- Maurya, D.K., Adhikari, S., Nair, C.K.K., Devasagayam, T.P.A., 2007. DNA protective properties of vanillin against γ -radiation under different conditions : Possible mechanisms. *Mutat. Res.* 634, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.06.003>
- McGaw, L.J., Elgorashi, E.E., Eloff, J.N., 2014. Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal

- Animal and Human Cells, in: Toxicological Survey of African Medicinal Plants. Elsevier Inc., pp. 181–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X>
- Meenakshi Arora, 2013. Cell Culture Media : A Review 3, 175.
- Mehling, M., Tay, S., 2014. Microfluidic cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 25, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.10.005>
- Meyvantsson, I., Beebe, D.J., 2008. Cell Culture Models in Microfluidic Systems. *Annu. Rev. Anal. Chem* 1, 423–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.113042>
- Miller, J. N., & Miller, J.C., 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Educación.
- Mollica, H., Coclite, A., Miali, M.E., Pereira, R.C., Paleari, L., Manneschi, C., Decensi, A., Decuzzi, P., 2018. Deciphering the relative contribution of vascular inflammation and blood rheology in metastatic spreading. *Biomicrofluidics* 12. <https://doi.org/10.1063/1.5022879>
- Mosadegh, B., Lockett, M.R., Thu, K., Simon, K.A., Gilbert, K., Hillier, S., Newsome, D., Li, H., Hall, A.B., Boucher, D.M., Eustace, B.K., Whitesides, G.M., 2015. Biomaterials A paper-based invasion assay : Assessing chemotaxis of cancer cells in gradients of oxygen. *Biomaterials* 52, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.012>
- Motulsky, H.J., Christopoulos, A., 2003. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com.
- Nascimento da Silva, L.C., Bezerra Filho, C.M., Paula, R.A.D., Silva e Silva, C.S., Oliveira de Souza, L.I., Silva, M.V.D., Figueiredo, R.C.B.Q.D., 2016. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. *Free Radic. Res.* 50, 801–812. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1193668>
- Nemes, Z., Dietz, R., Lüth, J.B., Gomba, S., Hackenthal, E., Gross, F., 1979. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* 35, 1475–1476.
- Niles, A.L., Moravec, R.A., Riss, T.L., 2009. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Curr. Chem. Genomics* 3, 33–41.
- OCDE, 2004. Guideline 432: in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. OECD guidelines for the testing of chemicals. [WWW Document]. URL https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test_9789264071162-en (accessed 6.10.20).
- Paguirigan, A.L., Beebe, D.J., 2009. From the cellular perspective: exploring differences in the cellular baseline in macroscale and microfluidic cultures. *Integr. Biol.* 1, 182–195.
- Parish, C.R., Mollbacher, A., 1983. Automated colorimetric assay for T cell cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 58, 225–237.
- Park, H., Zhang, Y., Georgescu, S.P., Johnson, K.L., Kong, D., Galper, J.B., 2006. Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Offer New Insights Into the Relationship Between Lipid Metabolism and Angiogenesis. *Stem Cell Rev.* 2, 93–101.
- Park, J., Yoon, T.H., 2012. Microfluidic image cytometry (μ FIC) assessments of silver nanoparticle cytotoxicity. *Bull. Korean Chem. Soc* 33, 4023. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.12.4023>

- Pedroso, L.S., Fávero, G.M., De Camargo, L.E.A., Mainardes, R.M., Khalil, N.M., 2013. Effect of the o-methyl catechols apocynin, curcumin and vanillin on the cytotoxicity activity of tamoxifen vanillin on the cytotoxicity activity of tamoxifen. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28, 734–740.
<https://doi.org/10.3109/14756366.2012.680064>
- Petersen, E.J., Hirsch, C., Elliott, J.T., Krug, H.F., Aengenheister, L., Arif, A.T., Bogni, A., Kinsner-ovaskainen, A., May, S., Walser, T., Wick, P., Roesslein, M., 2019. Cause-and-effect analysis as a tool to improve the reproducibility of nanobioassays: four case studies. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 1039–1054.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00165>
- Plummer, L.N., Busenberg, E., 1982. The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO₂-H₂O solutions between 0 and 90 C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO₃-CO₂-H₂O. *Geochim. Cosmochim. Acta* 46, 1011-1040.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H., 2017. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin, in: *Cell Viability Assays*. Humana Press, New York, NY., pp. 1–17.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9>
- Primiceri, E., Chiriaco, M.S., Rinaldi, R., Maruccio, G., 2013. Cell chips as new tools for cell biology—results, perspectives and opportunities. *Lab Chip* 13, 3789–3802. <https://doi.org/10.1039/c3lc50550b>
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R., 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3273–3279. <https://doi.org/10.1021/jf0262256>
- Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Reyes-Fermín, L.M., Avila-Rojas, S.H., Aparicio-Trejo, O.E., Tapia, E., Rivero, I., Pedraza-Chaverri, J., 2019. The Protective Effect of Alpha-Mangostin against Cisplatin-Induced Cell Death in LLC-PK1 Cells is Associated to Mitochondrial Function Preservation. *Antioxidants* 8, 133.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2016. Cell viability assays., in: *Assay Guidance Manual* [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rodríguez-Hernández, C.O., Torres-García, S.E., Olvera-Sandoval, C., Ramírez-Castillo, F.Y., Loera Muro, A., Avelar-Gonzalez, F.J., Guerrero-Barrera, A.L., 2014. Cell Culture: History, Development and Prospects. *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* 2, 188–200.
- Rojas-López, A., Cañizares-Macías, M.P., 2013. Antioxidant Capacity in Vanilla Extracts Obtained by Applying Focused Microwaves. *Food Nutr. Sci.* 4, 244–253. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.48A030>
- Ruedinger, F., Lavrentieva, A., Blume, C., Pepelanova, I., Scheper, T., 2015. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 623–636.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6253-y>
- Ruzycka, M., Cimpan, M.R., Rios-Mondragon, I., Grudzinski, I.P., 2019. Microfluidics for studying metastatic patterns of lung cancer. *J. Nanobiotechnology* 17, 1–30. <https://doi.org/10.1186/s12951-019->

- Santacruz Reyes, L., Melo Jimenez, Á., Rodríguez Herrera, C., Moscoso Gama, J., 2017. Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. *Biociencias* 12, 127–140. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..2.2293>
- Santo, S. Di, Yang, Z., Ballmoos, M.W. Von, Voelzmann, J., Diehm, N., Kalka, C., 2009. Novel Cell-Free Strategy for Therapeutic Angiogenesis : In Vitro Generated Conditioned Medium Can Replace Progenitor Cell Transplantation 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005643>
- Schneider-Barthold, C., Baganz, S., Wilhelmi, M., Scheper, T., Pepelanova, I., 2016. Hydrogels based on collagen and fibrin—frontiers and applications. *BioNanoMaterials* 17, 3–12. <https://doi.org/10.1515/bnm-2015-0025>
- Skafté-Pedersen, P., Hemmingsen, M., Sabourin, D., Blaga, F.S., Bruus, H., Dufva, M., 2012. A self-contained, programmable microfluidic cell culture system with real-time microscopy access. *Biomed. Microdevices* 14, 385–399. <https://doi.org/10.1007/s10544-011-9615-6>
- Smee, D.F., Hurst, B.L., Evans, W.J., Clyde, N., Wright, S., Peterson, C., Jung, K.H., Day, C.W., 2017. Evaluation of cell viability dyes in antiviral assays with RNA viruses that exhibit different cytopathogenic properties. *J. Virol. Methods* 246, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.012>
- Song, J. Le, Choi, J.H., Seo, J.H., Kil, J.H., Park, K.Y., 2014. Antioxidative effects of fermented sesame sauce against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in LLC-PK1 porcine renal tubule cells. *Nutr. Res. Pract.* 8, 138–145. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.2.138>
- Squatrito, R.C., Connor, J.P., Buller, R.E., 1995. Comparison of a novel redox dye cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. *Gynecol. Oncol.* 58, 101–105.
- Stokes, W.S., Casati, S., Strickland, J., Paris, M., 2008. Neutral red uptake cytotoxicity tests for estimating starting doses for acute oral toxicity tests. *Curr. Protoc. Toxicol.* 36, 20–4.
- Stulpinas, A., Imbrasaitė, A., Krestnikova, N., Kalvelytė, A. V., 2019. Recent Approaches Encompassing the Phenotypic Cell Heterogeneity for Anticancer Drug Efficacy Evaluation, in: *Tumor Progression and Metastasis*. IntechOpen.
- Su, X., Young, E.W.K., Underkofler, H.A.S., Kamp, T.J., January, C.T., Beebe, D.J., 2011. Microfluidic Cell Culture and Its Application in High-Throughput Drug Screening: Cardiotoxicity Assay for hERG Channels 16, 101–111. <https://doi.org/10.1177/1087057110386218>
- Swain, P., 2014. Basic Techniques and Limitations in Establishing Cell Culture: a Mini Review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2, 1–10. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.4s.1.10>
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K.I., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93, 157–165.
- Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., Ito, H., 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim. Biophys. Acta-General Subj.* 1810, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.11.004>
- Takano, A., Tanaka, M., Futai, N., 2014. On-chip multi-gas incubation for microfluidic cell cultures under hypoxia. *Biomicrofluidics* 8, 1–5. <https://doi.org/10.1063/1.4902941>

- Takano, A., Tanaka, M., Futai, N., 2012. On-chip CO₂ incubation for pocket-sized microfluidic cell culture. *Microfluid. Nanofluidics* 12, 907–915. <https://doi.org/10.1007/s10404-011-0925-z>
- Taub, M., 1985. *Tissue culture of epithelial cells*. New York: Plenum press.
- Ulrich, A.B., Pour, P.M., 2001. Cell Lines, *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00212-6>
- van Meerlo, J., Kaspers, G.J.L., Cloos, J., Glaysher, S., Cree, I.A., Hartley, J.M., Spanswick, V.J., Hartley, J.A., 2013. Chapters: 20-22, 25, in: Cree, I.A., E. (Ed.), *Cancer Cell Culture Methods and Protocols*. Humana Press: Totowa, NJ, USA., pp. 237–259, 309–321.
- Van Tonder, A., Joubert, A.M., Cromarty, A.D., 2015. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res. Notes* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>
- Varma, S., Voldman, J., 2018. Caring for cells in microsystems: principles and practices of cell-safe device design and operation. *Lab Chip* 18, 3333–3352. <https://doi.org/10.1039/c8lc00746b>
- Vichai, V., Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112-1116.
- Weinbaum, S., Duan, Y., Thi, M.M., You, L., 2011. An integrative review of mechanotransduction in endothelial, epithelial (renal) and dendritic cells (osteocytes). *Cell. Mol. Bioeng.* 4, 510–537. <https://doi.org/10.1007/s12195-011-0179-6>
- Winckler, J., 1974. Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red. *Prog. Histochem. Cytochem.* 6, 1.
- Wu, T.H.W.J.M., 2010. Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO₂ laser 1125–1133. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0633-0>
- Yan-Chun, Z., Rong-Liang, Z., 1991. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1177–1179. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90251-Y](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90251-Y)
- Yeh, C., Hsu, C., 2019. *Microfluidic Techniques for Single-Cell Culture, Single-cell Omics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814919-5.00007-5>
- Zuchowska, A., Marciniak, K., Bazylińska, U., Jastrzebska, E., Wilk, K.A., Brzozka, Z., 2018. Different action of nanoencapsulated meso-tetraphenylporphyrin in breast spheroid co-culture and mono-culture under microfluidic conditions. *Sensors Actuators B Chem.* 275, 69–77.

ANEXOS.

ANEXO 1. Elaboración del extracto de vainilla.

El extracto de vainilla, se obtuvo por extracción asistida con microondas focalizadas usando el procedimiento descrito por Rojas-López y Cañizares-Macías (2013): se colocó 1 g de polvo de vainilla en un tubo de ensayo de 30 cm de largo y 3 cm de diámetro interno y se colocó en un baño de agua (tubo de ensayo de 4,5 cm de diámetro interno). Se añadieron a la muestra 25 mL de una solución de etanol-agua al 70% (v / v). Se adaptó un refrigerante al tubo de ensayo para evitar la pérdida del extractante y se aplicó una potencia de irradiación de microondas de 150 W a la muestra. Se llevaron a cabo veinte ciclos de irradiación de 1 minuto y 3 minutos de no irradiación. El tiempo total de extracción fue de 80 min. Una vez que terminó la extracción, la solución se filtró y se secaron 10 ml del extracto usando un evaporador rotatorio a presión reducida durante 8 h para eliminar el etanol presente en el extracto. El extracto concentrado obtenido se almacenó a 4 ° C hasta su uso y durante un período no superior a una semana. La concentración de VAI en el extracto se determinó por el método espectrofotométrico de aditividad de absorbancias descrito por Longares-Patrón y Cañizares-Macías (2006).

ANEXO 2. Curva de calibración para el método ORAC

En la Figura A1 se presentan las curvas de calibración para los estándares de ácidos gálico y cafeico, vainillina y Trolox. En la tabla A1 se presentan los parámetros asociados a cada curva.

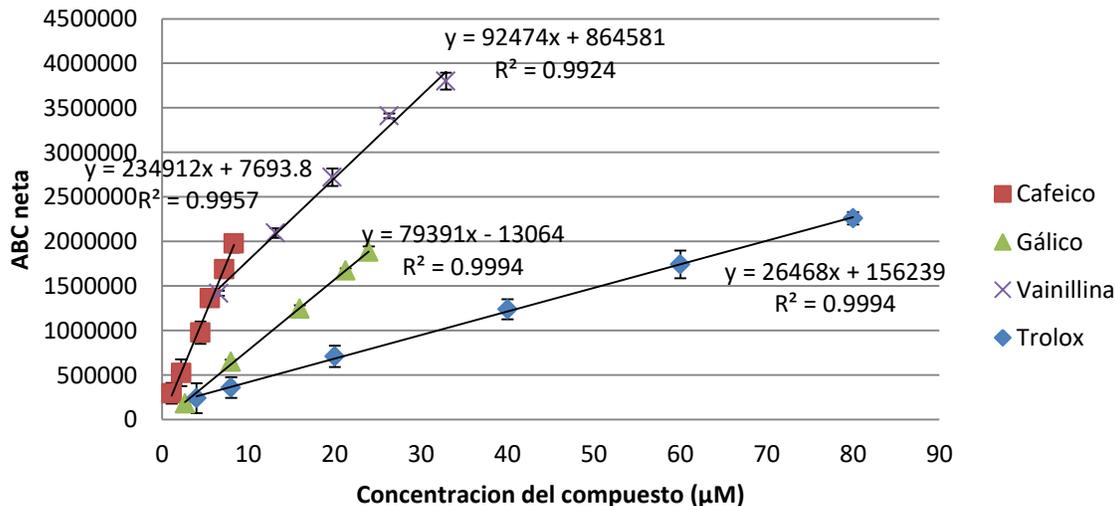


Figura A1. Curvas de calibración del método ORAC

Tabla A1 Parámetros de la curvas de calibración para el método ORAC

Compuesto	Intervalo lineal (μmol/L)	Ecuación	R ²
Ácido gálico	3.40 - 40.2	Abs=26.91 ± 0.3792 [VAI] - 0.008 ± 0.009	0.9995
Ácido cafeico	8.70- 34.7	Abs = 27.91 ± 0.2251 [PHB] -0.014 ±0.005	0.9997
Vainillina	6.40– 77.8	Abs=14.75 ± 0.1558 [AVAI] - 0.066±0.007	0.9994
Trolox	8.40– 67.2	Abs=18.85± 0.1517 [APHB] -0.016±0.006	0.9998

ANEXO 3. Curva de calibración de compuestos fenólicos en medio DMEM

En la Figura A2 se muestran las curvas de calibración de VAI, PHB, AVAI y APHB a respectivas longitudes de onda de máxima absorción en medio alcalino (pH=10) y los parámetros de cada curva se presentan en Tabla A2.

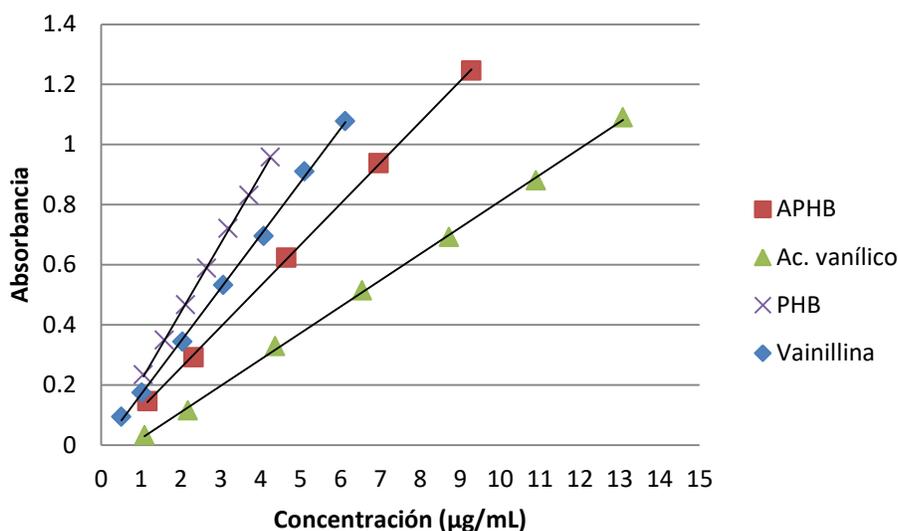


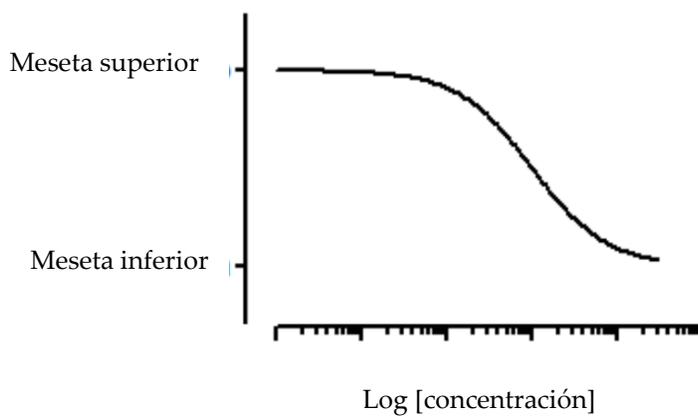
Figura A2 . Curvas de calibración de los compuestos fenólicos en medio alcalino

Tabla A2. Parámetros asociados a las curvas de calibración de los compuestos fenólicos en medio alcalino

Compuesto	λ (nm)	Intervalo lineal (μg/mL)	Ecuación	R ²
VAI	347	0.51-6.42	Abs=26.91 ± 0.3792 [VAI] - 0.008 ± 0.009	0.9995
PHB	330	1.06-4.24	Abs = 27.91 ± 0.2251 [PHB] -0.014 ±0.005	0.9997
AVAI	297	1.09-13.08	Abs=14.75 ± 0.1558 [AVAI] - 0.066±0.007	0.9994
APHB	280	1.06-9.28	Abs=18.85± 0.1517 [APHB] -0.016±0.006	0.9998

ANEXO 4. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) mediante el software GraphPad.

Las curvas de concentración-respuesta se definen generalmente por cuatro parámetros (Figura A3) : meseta superior, meseta inferior, el factor de pendiente (pendiente de Hill) y la IC₅₀ (Figura A3). Las mesetas superior e inferior describen los valores en los que la curva alcanza una meseta. La pendiente de Hill describe la pendiente de la curva entre estas dos mesetas. La IC₅₀ se refiere a una concentración del compuesto requerido para reducir la respuesta (viabilidad) al 50% de su valor máximo (Motulsky & Christopoulos, 2003).



$$y = \text{Meseta inferior} + \frac{\text{Meseta superior} - \text{inferior}}{1 + 10^{((\text{Log IC}_{50} - X) * \text{Pendiente de Hill})}}$$

Figura A3. Modelo de 4 parámetros en las curvas de dosis-respuesta y ecuación del modelo.

Las concentraciones estudiadas de los compuestos fenólicos, extracto y CDDP se transformaron a unidades logarítmicas de base diez. Para obtener el valor de IC₅₀ se realizó una regresión no lineal en el programa GraphPad Prism versión 5.00 (San Diego California USA, www.graphpad.com). El valor de IC₅₀ equivale al antilogaritmo del LogIC₅₀ calculado por el software y se expresa en unidades de mmol / L para los compuestos y extracto de vainilla o μM en el caso de CDDP.

ANEXO 5. Viabilidad de VAI y PHB en células LLC-PKI a macroescala utilizando un mayor intervalo de concentración (24h de exposición).

En la Figura A4 se presentan los datos de viabilidad de células LLC-PK1 expuestas a VAI y PHB respectivamente durante 24h, aumentando el intervalo de

concentración para estimar la IC₅₀ de los aldehídos fenólicos a macroescala (Tabla 3, pág. 60) por el método de RN y MTT.

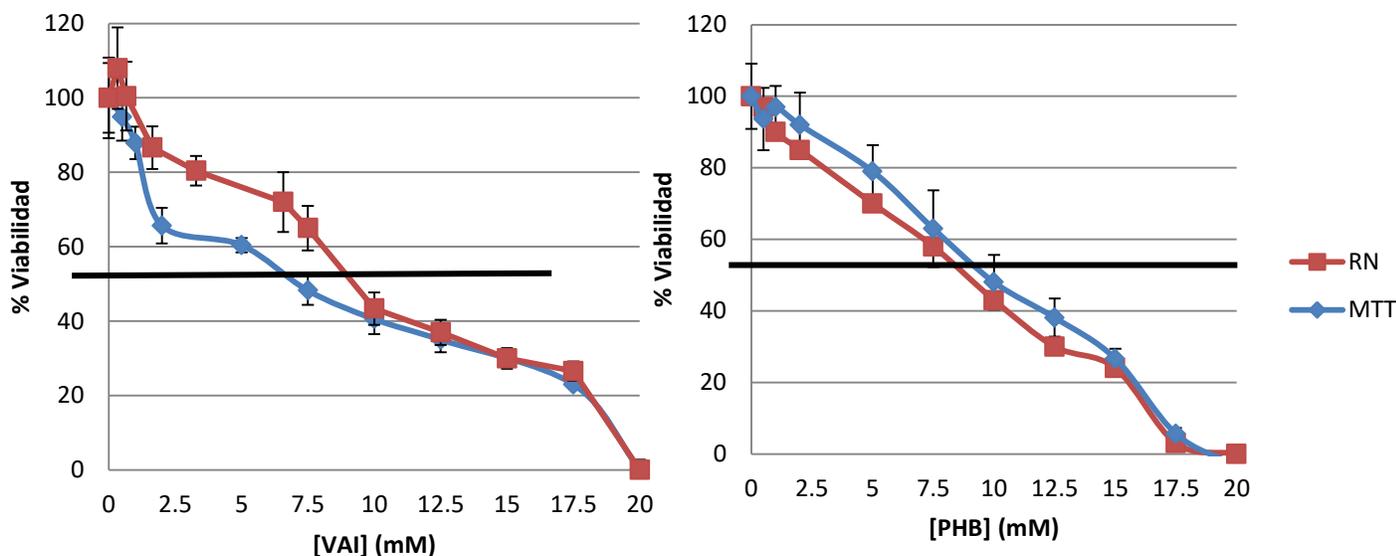


Figura A4. Evaluación de VAI y PHB en células LLC-PK1 a macroescala, utilizando un intervalo mayor de concentraciones

ANEXO 6. Determinación de la repetibilidad y reproducibilidad en ensayos de viabilidad.

Se presentará un ejemplo de cálculo con los datos de viabilidad de células LLC-PK1 (cultivadas a macroescala) y expuestas a VAI durante 24 horas a una concentración de 6.57mM.

Se ordenaron los datos en una tabla de la siguiente manera:

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Replica 1	52.31	51.54	70.28	65.60
Replica 2	55.23	52.13	69.35	72.53
Replica 3	53.77	46.84	74.88	74.13
Replica 4	61.56	54.48	76.73	67.73

El promedio total fue de 62.44%

Mediante Excel se realizó un análisis de varianza de un factor:

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianz</i>	
				<i>a</i>	
semana 1	4	222.87	55.72	16.58	
Semana 2	4	204.99	51.25	10.24	
Semana 3	4	291.24	72.81	12.67	
Semana 4	4	280	70	16	

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre semana	1340.63	3	446.88	32.22	5.06x10 ⁻⁶	3.49
Dentro de la semana	166.45	12	13.87			
Total	1507.08	15				

Con ayuda de un análisis de varianza (ANOVA) se obtuvieron la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y el cuadrado medio (CM) de la variación de los porcentajes de viabilidad entre semanas y dentro de la semana, que serán de utilidad para el cálculo de la precisión.

La repetibilidad (S_r^2), nos ayuda a medir la variación del porcentaje de viabilidad de cada compuesto obtenida en un mismo día (dentro de días) y se calculó considerando que:

$$S_R = \sqrt{CM_{dentro\ de\ dias}}$$

Por lo que:

$$S_R^2 = 13.87$$

La reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia (S_{WR}^2), se determinó haciendo uso de las siguientes expresiones, en donde n_j corresponde al número de réplicas realizadas por día:

$$S^2 = \frac{CM_{entre\ dias} - CM_{dentro\ de\ dias}}{n_j}$$

$$S_{WR}^2 = S_R^2 + S^2$$

De esta manera:

$$S^2 = \frac{446.88 - 13.87}{4} = 108.25$$

$$S_{WR}^2 = 13.87 + 108.25 = 122.12$$

Por último, se expresó la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio en términos de porcentaje, haciendo uso de las siguientes expresiones matemáticas:

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{S_R}{\text{Promedio total}} \right) \times 100 = \left(\frac{\sqrt{CM_{dentro\ de\ dias}}}{\text{Promedio total}} \right) \times 100$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{S_{WR}}{\text{Promedio total}} \right) \times 100 = \left(\frac{\sqrt{S_{WR}^2}}{\text{Promedio total}} \right) \times 100$$

Sustituyendo en las ecuaciones se obtiene:

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{13.87}}{62.44} \right) \times 100 = 5.96\%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{122.12}}{62.44} \right) \times 100 = 17.70\%$$

ANEXO 7. Curva de calibración de peróxido de hidrógeno por el método FOX

En la **Figura A5** se muestra la curva de calibración de peróxido de hidrógeno empleando el método de FOX y en la **tabla A5** se presentan los parámetros asociados a la misma. Esta curva de calibración se empleó para evaluar la estabilidad de H₂O₂ en DMEM.

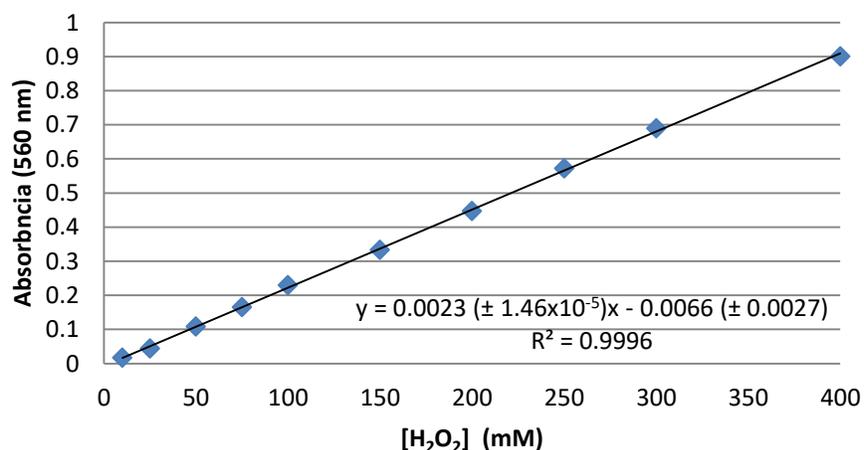


Figura A5. Curva de calibración de peróxido de hidrógeno empleando el método FOX.

Tabla A3. Parámetros de la curva de calibración de H₂O₂ con el método FOX

Intervalo lineal	10 a 400 μM
Error en la pendiente	$1.46 \times 10^{-5} \mu\text{M}$
Error en la ordenada	0.0027
Límite de detección	8.32 μM
Sensibilidad	0.0023

ANEXO 8. Procedimiento de construcción de microcanales mediante técnica de fotolitografía y litografía suave:

1. Se retiró del empaque la oblea de silicio y se colocó en una parrilla a 210°C por 5 minutos para remover toda humedad remanente, después se metió a un horno por 10 minutos a 70°C para disminuir su temperatura. Pasado este tiempo la oblea se sacó del horno y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente antes de ponerla en el *spin-coater*.
2. Se centró la oblea en el *spin-coater* y se vertieron aproximadamente 3 mL de resina SU-8 3035 sobre ella.
3. Se comenzó el programa de rotación: Primero 10 s a 500 rpm con una aceleración de 100 rpm/s para homogeneizar la distribución de la resina en la oblea y después 30s a 1000 rpm con una aceleración de 300 rpm/s
4. Se pasó la oblea con la resina a un proceso de calentamiento en parrilla con el fin de ir evaporando el disolvente presente en la resina. El proceso de calentamiento (*softbake*) consta de 35 minutos a 105°C
5. Una vez que la oblea alcanzó la temperatura ambiente, se centró nuevamente en el *Spin-coater* y se vertieron aproximadamente 3mL de resina SU-8 3035 sobre ella.
6. Se comenzó el mismo programa de rotación que en el paso 3 para obtener una segunda capa de resina y la altura de los microcanales deseada (160 μm)
7. Se realizó un segundo proceso de calentamiento (*Softbake*).
8. Una vez que la oblea alcanzo la temperatura ambiente se colocó sobre ella la máscara con el diseño deseado y un vidrio de 4mm de espesor. La máscara con la oblea se colocó bajo la radiación de la lámpara de rayos UV por 45 s a 30 cm de distancia para permitir la óptima polimerización de resina.
9. Después de la radiación con rayos UV, se retiró la máscara de la oblea y se realizó un tercer proceso de calentamiento (*Post Exposure Bake*). Primero se calentó la oblea durante 1 minuto 75°C y posteriormente a 105°C por 5 minutos.

10. Una vez que la oblea alcanzó la temperatura ambiente, se sumergió en 15 mL de disolvente revelador por 15 minutos, esto con el fin de retirar el exceso de resina que no polimerizó en el proceso de radiación. Pasados los 15 minutos, se le dio un enjuague final con 1-propanol para asegurar que no hubiera exceso de resina no polimerizada y se secó la oblea en el horno a 70°C por algunos minutos.

Con este molde se obtuvieron las réplicas de PDMS: primero se pesó 25g de PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) y se le agregó el agente curante en una proporción de 10:0.9, se mezcló y se añadió en el micromolde. Luego el micromolde se llevó a vacío durante 1 h para eliminar burbujas y posteriormente se metió a la incubadora durante 24 h a 60°C.

ANEXO 9. Imágenes representativas de células tratadas con VAI y evaluadas por rojo neutro y MTT

Figura A6. Imágenes representativas del estudio de citotoxicidad de VAI por MTT en microchip

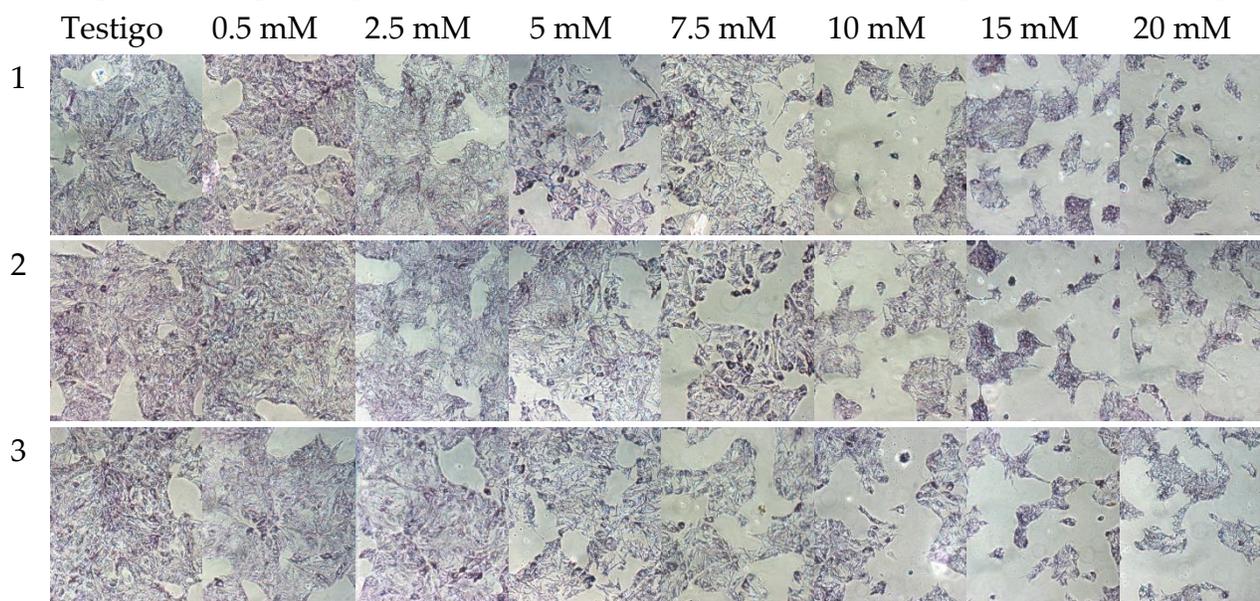
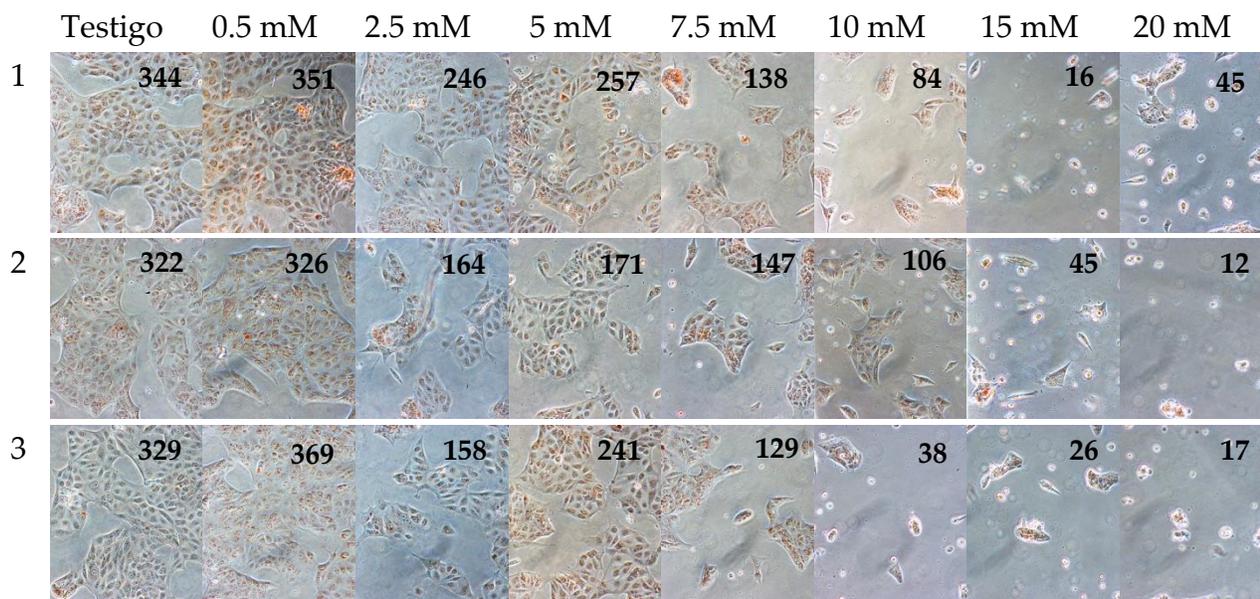


Figura A7. Imágenes representativas del estudio de citotoxicidad de VAI por rojo neutro en microchip. En la esquina superior derecha se muestra el número de células determinadas por conteo manual.



Article

Integrated On-Chip 3D Vascular Network Culture under Hypoxia

Miguel Ángel Olmedo-Suárez ¹, Tomohiro Sekiguchi ², Atsushi Takano ³, Maria del Pilar Cañizares-Macías ¹, and Nobuyuki Futai ^{2,*}

¹ Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad de México, 04510, México; miolsu22@hotmail.com (M.A.O.-S.); pilarm@unam.mx (M.P.C.-M.)

² Department of Mechanical Engineering, College of Engineering, Shibaura Institute of Technology, 3-7-5 Toyosu, Koto-ku, Tokyo 135-8548, Japan; md18048@shibaura-it.ac.jp

³ Digital Manufacturing and Design Centre, Singapore University of Technology and Design, 8 Somapah Road, Singapore 487372, Singapore; cookdo812@hotmail.com

* Correspondence: futai@shibaura-it.ac.jp; Tel.: +81-3-5859-8016

Received: 21 March 2020; Accepted: 28 April 2020; Published: date: 30 April 2020

Abstract: We developed a portable device made of poly(dimethylsiloxane) (PDMS)/polymethylmethacrylate (PMMA) for long-term 3D cell culture of vascular endothelial cells for the development of a vascular network and evaluated the device under different transitions between normoxia and hypoxia with good optical accessibility. The combination of a nested reservoir device and a bicarbonate/ascorbate buffer system accomplished on-chip incubation with $4.91 \pm 0.86\%$ pO₂ and $5.19 \pm 1.70\%$ pCO₂ for up to 10 days. Seventy-two hours of normoxic incubation preceding hypoxic culture increased the cell viability, network formation, and size and stability of the resulting lumens compared with those completely maintained in normoxia for the same total duration. We employed different parameters of the network (e.g., total mesh area, total length, number of branches, among others) for the comparison of different oxygen treatments in the device. The differential effect of hypoxic conditions based on the maturity of the vessels may be used as an external factor to improve vascular development in vitro.

Keywords: 3D cell culture; hypoxia; angiogenesis; portable cell culture device; vascular network; normoxic/hypoxic transition

1. Introduction

The vascular network formed by endothelial cells maintains tissue homeostasis by delivering oxygen and nutrients to cells and removing waste products. Thus, functional vasculature is essential to the clinical success of engineered tissue constructs, representing a challenge for regenerative medicine [1]. Experimental models of vascularization are used to provide new insights into vascular function, to elucidate details of molecular signaling pathways, and to serve as a platform for the development of new therapeutics against vascular targets [2]. In addition, the advent of organoids has generated recent interest in vascularization in vitro. In organoids, cells should be reorganized into complex tissue-specific structures. However, a major limitation in typical organoids is the lack of a structured vascular network that allows exchange of oxygen, nutrients, and waste. For example, upon reaching a certain size, organoids cease to proliferate and develop a necrotic core owing to limited diffusion of oxygen, nutrients, and metabolites. In this regard, the strategy of in vitro spontaneous vascularization in 3D constructs is of interest for efficient exchange of oxygen and nutrients in organoid cultures in order to develop models with in vivo-like functionality [3].

Hypoxia (oxygen level lower than 21%) is important to mimic the environment of cells under physiological conditions [4]. Particularly, hypoxia is of interest for a primary regulator for the development of a vascular network [5]. Endothelial cells and their lumenized networks are sensitive to hypoxia [6] involved in different diseases such cardiovascular [7], inflammatory [8], tumorigenesis [5,9], and microvascular damage associated with aging [10,11]. Hypoxia also modulates vessel patterning, maturation, and function, such as increased blood perfusion, owing to hypoxia-induced vasodilation [5,12], mainly by upregulating multiple pro-angiogenic pathways that mediate endothelial, stromal, and vascular support [5,13,14], as well as vascularization, during both embryonic development and adult life [5,15]. However, the evaluation of the hypoxia effect on self-assembled lumens in vitro is required because the vascular assembly and growth are differentially affected by hypoxic conditions based on the maturity of the vessels [16]. The effect of hypoxia on preformed vascular networks is important because there have been other recent approaches that evaluate the vascular promoting effect of hypoxia with structures previously assembled [17]. Novel research on the effect of hypoxia on both vasculogenesis and the resulting vasculatures, a portable and low-learning-cost system, and an optically accessible 3D culture under controlled oxygen concentrations are required.

Common and even microfluidic methods used to achieve hypoxia fall into three approaches [18]: (i) multi-gas incubators, gas tight chambers, or microchannels introducing $N_2/O_2/CO_2$ gases [19,20]; (ii) addition of oxygen scavenging reactions (sodium sulfite [21], pyrogallol [21,22], water electrolysis [23], cellular metabolism [23-25]); and (iii) biochemically inducing a state of pseudo-hypoxia with compounds, such as $CoCl_2$, that stabilize hypoxia inducible factors (HIFs) under normoxic conditions [26,27]. However, these methods have the following problems: (i) they require bulky gas supplies and tubing, and thus compromise easy handling and optical access; (ii) the reactions alter the medium compositions and further affect cellular responses [25,28]; and (iii) $CoCl_2$ influences the transcription of the distinct sets of genes that were not affected by real hypoxia [26,29]. Therefore, a simple hypoxic culture system capable of maintaining the long-term physicochemical properties of 3D culture is still challenging.

We developed a standard, cover glass-sized device made of poly(dimethylsiloxane) (PDMS)/polymethylmethacrylate (PMMA) for long-term 3D vascular network formation under controlled O_2 and CO_2 levels using a bicarbonate/sodium ascorbate (NaHAsc) buffer system. We then demonstrated the capability of this system to culture endothelial cells in hydrogels and develop vascular networks. The control of oxygen concentration in the culture was adequate to evaluate the organization of vascular networks under different transitions of normoxia/hypoxia and the relationship between the duration of normoxic/hypoxic incubation stages and angiogenic parameters (tube length, number of junctions, meshes, and isolated elements). We also evaluated the effect of preformed vascular networks under hypoxia exposure for short and prolonged durations. Macroscale culture systems as other microfluidic systems require external sources to control the conditions of culture. Our device is one of the simplest standalone systems for 3D cell culture under adjustable hypoxia conditions as it incorporates a source of CO_2 and an O_2 scavenger within the device. This offers the following advantages: (1) maintaining portable cell culture as a closed system requiring only a heat source as the external activator; (2) cells or lumens can be observed under a non-specialized microscopic stage without disturbing the atmosphere around the culture; (3) high incubation capacity compared with gas exchange between microchannels; (4) no need for conditioning gases, gas chambers, or other bulky and expensive equipment; and (5) no obstacle in the light path, unlike an external incubator or chamber.

In addition, this device provides an easy protocol of seeding and maintenance of cells' 3D vascular network formation; we introduced a fibroblast-conditioned medium as a simple alternative to a co-culture-based angiogenesis induction method.

2. Materials and Methods

2.1. Device Construction

Figure 1 shows a device for hypoxic 3D culture without any external gas supply. The device has a pair of nested reservoirs: (1) an inner reservoir for cell culture and culture media and (2) an outer reservoir for a bicarbonate and ascorbate buffer solution. The sidewall of the inner reservoir made of a cylindrical PDMS tube allows for gas exchange by diffusion. The enclosure is made of PMMA and has two threaded necks for each of the two reservoirs. The outer reservoir accommodates a jacket solution to allow gases to diffuse into the inner reservoir. The inner reservoir has one circular culture well at the bottom.

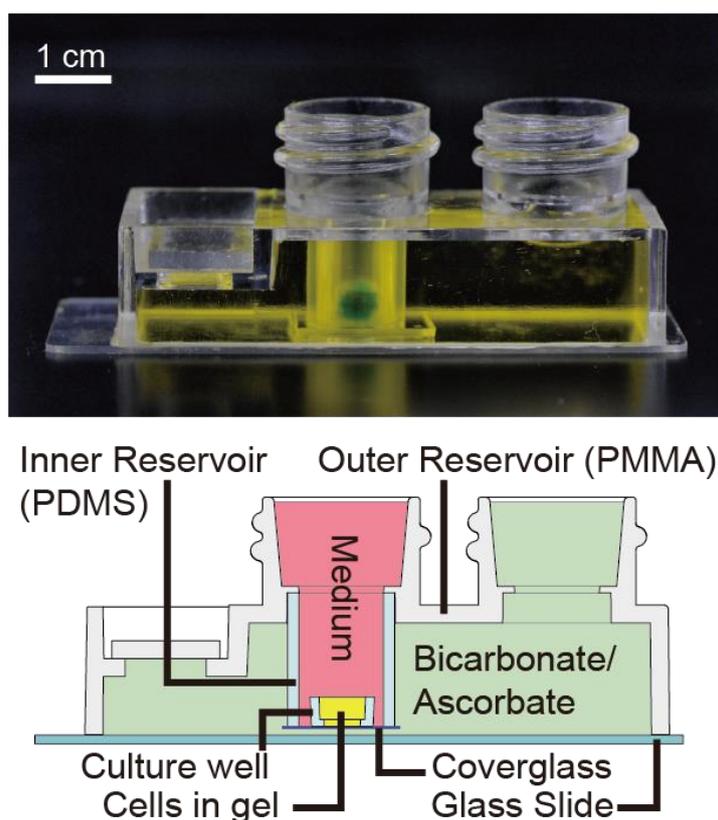


Figure 1. Portable device for the development of vascular networks under controlled oxygen and carbon dioxide concentrations. The device consists of two reservoirs: the inner reservoir where cells are cultured inside a fibrin-collagen hydrogel at the bottom, and the outer reservoir made of polymethylmethacrylate (PMMA) for the bicarbonate buffer/ascorbate solution. These reservoirs are divided by a tubular wall made of poly(dimethylsiloxane) (PDMS), where gas (O_2 and CO_2) and moisture exchange occurs.

The fabrication processes of the cell culture device are summarized in Figure S1. A PDMS well for 3D gel culture (ID, H = 4, 3.3 mm) was fabricated by casting KE106 (Shin-Etsu Chemical, Tokyo, Japan) from a 3D printed mold. The mixing ratio of the base and curing agent when making the PDMS of the well was 10:1. The PDMS was cured by placing at 65 °C overnight. The PDMS well and a PDMS tube (ID, OD, H = 10, 12, 15 mm, Kyowa Kogyo, Saitama, Japan) were bonded to a cover glass (18 × 18 mm No. 1, Matsunami, Osaka, Japan) after plasma treatment (20 mA, 20 Pa, 30 s, room temperature) (SC-708, Sanyu Electron, Tokyo, Japan). The PDMS–coverglass assembly was attached to an injection molded reservoir made of PMMA (Proto Labs G.K., Kanagawa, Japan) with silicone adhesive to form a nested reservoir pair. The reservoir pair was bonded onto a glass slide

(S9111, Matsunami, Osaka, Japan) with silicone adhesive. We can provide actual molded parts upon request (<http://www.cd.mech.shibaura-it.ac.jp/>).

The entire device was stored at room temperature for at least 24 h prior to use. Screw caps (5183-4303, Agilent, Santa Clara, CA, USA) were used to prevent oxygen or any external contamination from the atmosphere. Caps used for the inner reservoir were perforated and a round cover glass (φ 15 mm, No. 1, Matsunami, Osaka, Japan) was bonded with silicone adhesive to allow optical access to the inside of the PDMS well.

2.2. Device Characterization

The O₂ and CO₂ concentrations inside the inner reservoir were measured using a mock device that does not contain a PDMS well. To measure the partial O₂ pressure (pO₂), the fluorescence quenching-based oxygen probe with temperature compensation (FOSPOR-T1000-TS-NEO, Ocean Insight, Largo, FL, USA) coupled to a fluorimeter (NeoFox-GT, Ocean Insight, Largo, FL, USA) was used. The fluorimeter was calibrated with air saturated deionized water and a 1 M sodium sulfite solution for 0% and 20.9% pO₂. The outer reservoir was filled with 14 mL of 0.001–1 M sodium L-ascorbate (NaHAsc) (58049-17, Kanto Kagaku, Tokyo, Japan), 0.8 M NaHCO₃ (37116-00, Kanto), and 65 mM Na₂CO₃ (196-01595, Wako, Osaka, Japan) in deionized water; the inner reservoir was filled with 1.5 mL of 10 mM NaHCO₃. The oxygen probe was placed at the inside bottom of the inner reservoir through a perforated cap. The device was maintained at 37 °C using a hotplate and the pO₂ in the inner reservoir was recorded every minute for up to 90 h.

The partial CO₂ pressure (pCO₂) of the inner reservoir was obtained from the measured pH of 1.5 mL of 10 mM NaHCO₃ in the inner reservoir. The outer reservoir was filled with 14 mL of NaHCO₃, Na₂CO₃, and 1.0 M NaHAsc solution in deionized water. The pH and temperature of the inner reservoir were measured with a pH meter (LAQUA act, Horiba, Tokyo, Japan). The pCO₂ was calculated considering the chemical equilibria previously described in a CO₂–HCO₃⁻–CO₃²⁻ system [30].

2.3. Cell Culture and Vascular Network Development under Normoxic–Hypoxic Transition

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (CC-2519, Lonza, Basel-Stadt, Switzerland) and human lung fibroblasts (hLFs) (CC-2512, Lonza) were maintained in endothelial cell growth medium-2 (EGM-2, Lonza). For HUVECs and hLFs, passages 4–6 were used. When HUVECs reached 80–90% confluence, they were detached with Accutase (AT-104, Innovative Cell Technologies, Inc., CA, USA), pelleted by centrifugation at 100 g, and resuspended in Hanks' balanced salt solution (HBSS) (084-08345, Wako). Cells were counted using an automatic cell counter (Scepter 2.0, Millipore, Burlington, MA, USA) to adjust the cell seeding density to $(0.5\text{--}2) \times 10^5$ cells/well.

HUVECs were suspended in 40 μ L of HBSS without phenol red (085-09355, Wako). Then, 10 μ L of 25 mg/mL fibrinogen (F8630, Sigma, St. Louis, MO, USA) and 2 μ L of 3 mg/mL collagen type I (ASC-1-100-20, Nippi, Tokyo, Japan) were added to the suspension. The PDMS well was filled with the cell suspension immediately after the addition of 0.5 μ L of 50 U/mL thrombin (T4648, Sigma) and incubated for 10 min at room temperature to allow for complete gelation. To achieve vascular network formation, 1.5 mL of hLF-conditioned medium (EGM-2 exposed in hLF cells for at least 24 h) was added. The outer reservoir was filled with bicarbonate buffer solution (0.8 M NaHCO₃ and 65 mM Na₂CO₃) and the reservoir was capped tightly.

For normoxic experiments, the devices were incubated in a buffer solution without NaHAsc, cultured for 240 h (10 days), changing the buffer solution every 72 h, and evaluated daily using a microscope. For hypoxic experiments, the devices were pre-incubated for 24 h, 36 h, and 72 h at 37 °C in bicarbonate buffer without NaHAsc (normoxic preincubation), and then switched to a hypoxic condition by switching to bicarbonate buffer containing 1 M NaHAsc. The buffer solution was changed every 72 h and maintained for seven days. Cells cultured in normoxia and subsequent hypoxia were compared with cells cultured only with normoxia for the same total cultivation time.

Brightfield images were captured using an inverted microscope (EVOS XL Core Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Quantitative analysis of the vascular networks was realized with an Angiogenesis Analyzer [31]. The Angiogenesis Analyzer detects vascular networks and analyzes the vascular organization. The angiogenic parameters of cells cultured in normoxic–hypoxic conditions were compared with values obtained from cells cultured in only normoxia during the same period of culture (control group). The results are expressed as mean percent change relative to the control group. The parameters described were as follows: (1) number (#) of meshes: areas enclosed by segments. (2) Total mesh area: sum of areas enclosed by the segments. (3) # of segments: elements, which are delimited by two junctions. (4) Isolated elements: binary lines that are not branched. (5) Total length: sum of length of segments, isolated elements, and branches in the analyzed area. (6) Total segments length: sum of lengths of the segments in the analyzed area. (7) # of Branches: elements delimited by a junction and one extremity. (8) Total branching length: sum of length of the branches in the analyzed area. (9) Junctions: correspond to nodes or group of fusing nodes.

After hypoxic exposure for seven days, the cell viability was measured using a LIVE/DEAD cell staining kit II (PK-CA707-30002, PromoKine, Heidelberg, Germany). A working solution of 8 μM calcein-AM and 16 μM ethidium-1 homodimer (EthD-1) was prepared in HBSS without phenol red. The medium was removed from the inner reservoir, and the inside of the inner reservoir was washed twice with 1.5 mL of HBSS. Then, 150 μL of the working solution was added on the PDMS well. The devices were then incubated while being shielded from light at 37 °C for 30 min. Subsequently, the gel was removed from the well and placed in a glass slide. Fluorescence images were recorded with a fluorescence microscope (DMi8, Leica, Hesse, Germany). Each of the experiments was performed in triplicate.

3. Results

3.1. Characterization of O_2 and CO_2 Levels

Figure 2 shows the stability of O_2 levels inside the inner reservoir when the bottom of the device was incubated at 37 °C. A certain decrease in the O_2 levels by varying the concentration of ascorbate in the buffer solution was observed. The O_2 levels could be adjusted in a range of 4.91%–20.9% by increasing the NaHAsc concentration in the range of 1 mM to 1 M (1000 times). Figure 2A shows that the concentration as high as 1 M of NaHAsc was needed to reach within 4.91% \pm 0.86% pO_2 within 2 h of incubation. When 1 M NaHAsc was used, as shown in Figure 2B, the O_2 level was maintained in the range of 4.09% to 5.70% for up to 90 h.

Table 1 shows the pCO_2 levels calculated from the pH measurements in the inner reservoir when the outer reservoir was filled with bicarbonate buffer with NaHAsc (hypoxic conditions) or without NaHAsc (normoxic conditions). The 0.8 M NaHCO_3 and 65 mM Na_2CO_3 buffer solution in the outer reservoir was adequate to provide 5.19% \pm 1.70% pCO_2 . The addition of sodium ascorbate to the buffer solution did not affect the pCO_2 . Therefore, the 0.8 M NaHCO_3 , 65 mM Na_2CO_3 , and 1 M NaHAsc buffer solution was adequate for the on-chip culture with 5% pO_2 .

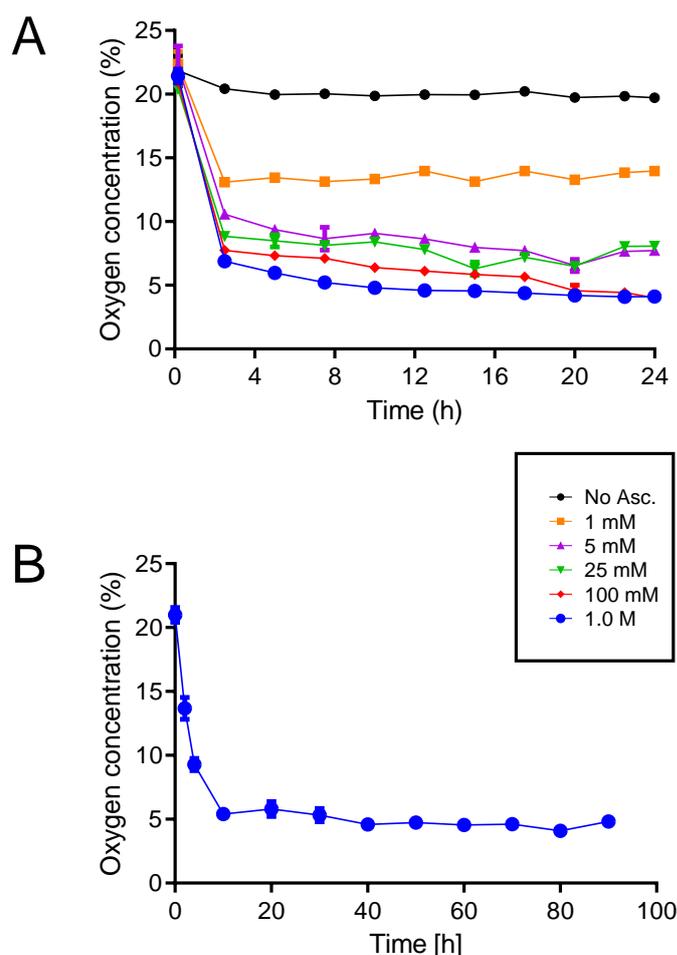


Figure 2. Oxygen concentrations measured within a device incubated with ascorbate buffer solutions of different concentrations ($N = 3$; mean 4.91 ± 0.86 standard deviation)). (A) The evaluation of a sodium ascorbate (NaHAsc) solution with different concentrations (0.001–1 M) for 24 h. The oxygen concentrations decreased proportionally with increasing NaHAsc concentration. (B) The time course of the oxygen levels of 1 M NaHAsc. The lowest level of oxygen in the device could be maintained up to 90 h.

Table 1. The pH, temperature, and calculated $p\text{CO}_2$ levels inside the inner reservoir of cell culture devices incubated on-chip and jacketed with bicarbonate buffer with or without sodium ascorbate.

Condition	pH	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	$p\text{CO}_2$ (%)
Bicarbonate (Normoxia)	7.13 ± 0.18	36.8 ± 0.06	5.19 ± 1.70
Bicarbonate + Ascorbate (Hypoxia)	7.11 ± 0.07	36.4 ± 0.05	5.22 ± 0.72

3.2. Network Formation in the Normoxic Condition

We cultured HUVECs seeded into fibrin/collagen gel at different densities and submerged them in hLF-conditioned EGM-2 medium to induce network formation. Figure 3 shows images of cells seeded with $(0.5\text{--}2.5) \times 10^5$ cells/well after culture for 72 h in normoxic conditions. As shown in Figure 3C, HUVECs seeded at a density of 2×10^5 cells / well formed visible vascular networks. Alternatively, Figure 3A,B show that cell densities less than 2×10^5 cells/well did not allow cell spreading or vessel forming. Figure 3D shows that HUVECs seeded at 2.5×10^5 cells/well formed a large lumen that covered the whole view field. Therefore, we seeded HUVECs at $(2.0 \pm 0.1) \times 10^5$ cells/well ($(1.59 \pm 0.07) \times 10^4$ cells / mm^2) for all experiments thereafter.

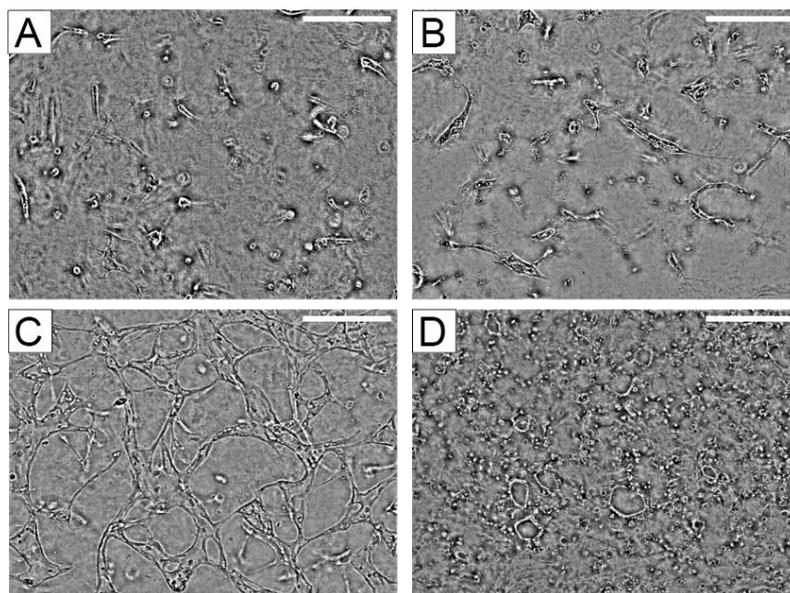


Figure 3. The vascular network formation depends on the number of cells seeded on a cell culture well in the device: (A) 0.5×10^5 cells/well; (B) 1.0×10^5 cells/well; (C) 2.0×10^5 cells/well; (D) 2.5×10^5 cells/well. All images were taken at 72 h of culture. Scale bar = 150 μm .

The on-chip network formation of HUVECs during normoxic incubation for ten days is presented in Figure 4. Sprouting of HUVECs was observed at Day 2. These sprouts were well lumenized at Day 3. Vascular networks were formed on-chip in 3D culture under normoxic conditions and could be maintained for at least 240 h.

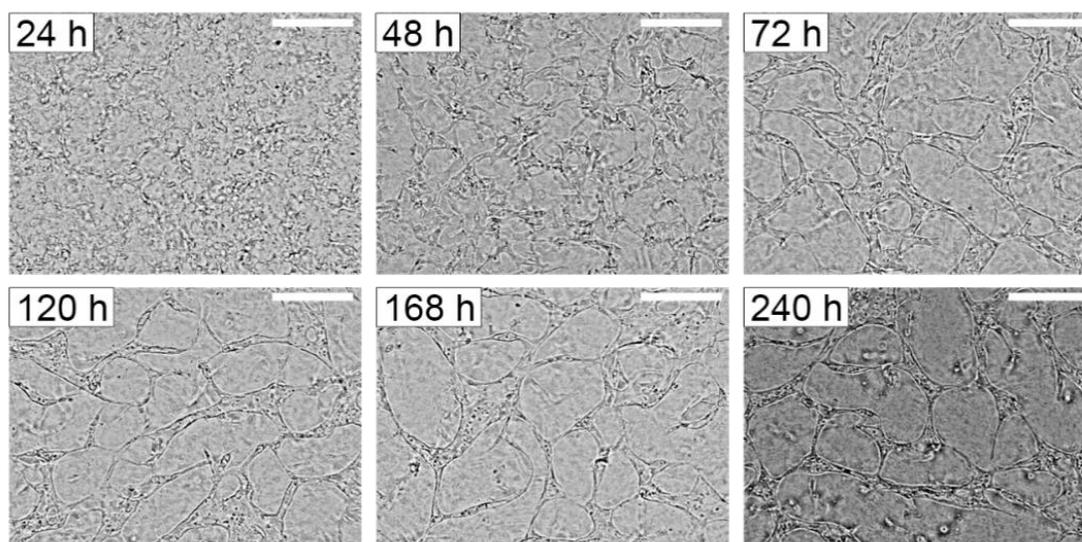


Figure 4. Development of vascular networks of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) formed within the device under normoxia for 240 h. Scale bar = 150 μm .

3.3. Network Formation and Development in the Normoxic–Hypoxic Transition

We characterized the vascular network formation of HUVECs on-chip under hypoxia. First, we found that cells did not form any vessel, nor did they proliferate (data not shown) when the cells were subject to hypoxia from the beginning. As a result, we proposed the hypoxic culture with

normoxic “preincubation”. As illustrated in Figure 5A, we first preincubated cells in normoxia (20.9% O₂) for either 24, 36, or 72 h, and then the inside of the device was switched to hypoxia. Figure 5B shows that the preincubation in normoxia for 72 h allowed for better vascular network development compared with the normoxic preincubation for 24 or 36 h.

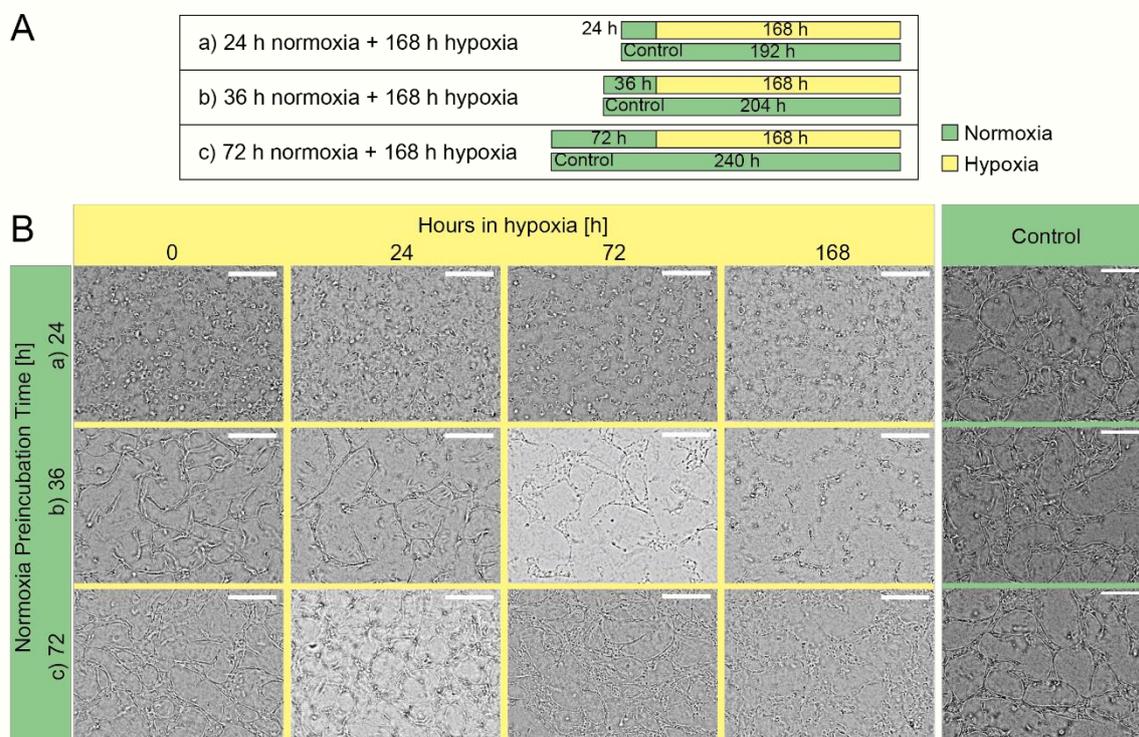


Figure 5. Vascularization under different conditions of preincubation in normoxia. **(A)** Time scheme of the cell culture at different preincubations in normoxia followed by hypoxia transitions. The cells are kept in preincubation in normoxia for 24, 36, and 72 h prior to the transition to hypoxic conditions for 168 h. Each condition was compared with cells maintained in normoxic conditions (Control). **(B)** Temporal evolution of the lumens at different normoxia preincubations. The lumenization increased with the time in normoxic preincubation. Scale bar = 150 μ m.

The effect of hypoxia and preincubation on the development and stability of vascular networks was evaluated using angiogenic parameter analysis, which allows a quantitative evaluation of the vessels-like network organization by extracting characteristic information of the network [31]. In Figure 6, lumens formed and incubated at 24, 36, and 72 h normoxia, followed by hypoxia up to 168 h, were compared with those incubated in normoxia for the same duration of culture (control; as shown in Figure 4). Changes in the angiogenic parameters shown in Figure 6B–E were expressed as the percentage relative to the control.

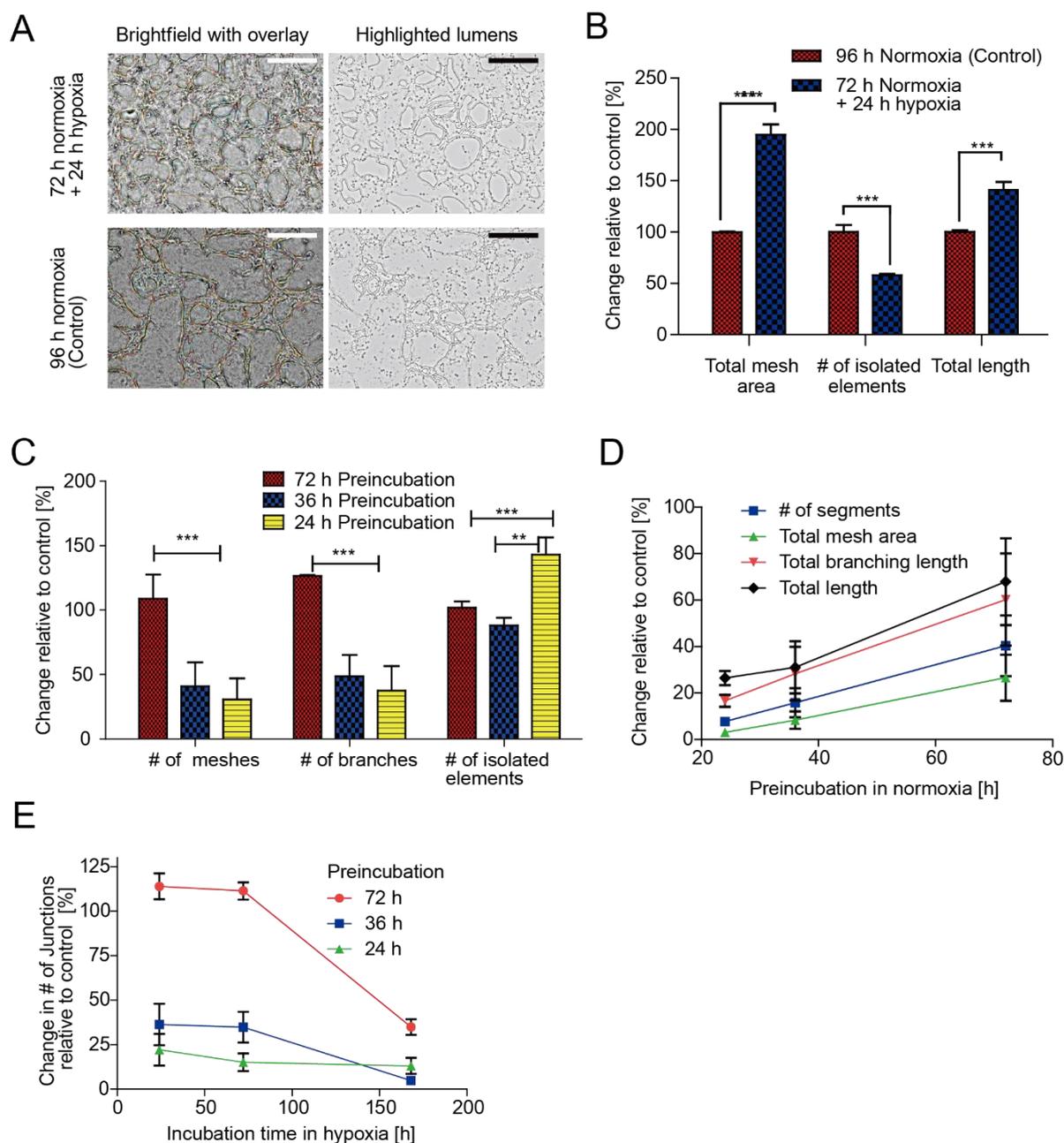


Figure 6. Angiogenic parameters of the vascular networks of HUVECs under different normoxic preincubations and followed by hypoxic transitions. Parameters increased with the time of normoxic preincubation and short periods of hypoxia exposure (24 h). Prolonged hypoxia decreased the angiogenic parameter values: (A) representative images of vascular networks of HUVECs cultured for 72 h normoxia/24 h hypoxia and control cells (96 h normoxia) (scale bar = 150 μ m); (B) angiogenic parameters of cells cultured for 72 h normoxia/24 h hypoxia and control cells (96 h normoxia); (C) angiogenic parameters in cells preincubated in normoxic conditions for 24, 36, and 72 h and switched to hypoxia for 24 h; (D) relationship between preincubation time in normoxia and vascular network parameters; (E) effect of incubation in hypoxia on the relative change in the number of junctions. The standard deviation of the mean (SD) is presented in all error bars, $N = 3$.

Figure 6A shows representative images of lumens formed after 72 h preincubation followed by hypoxia for 24 h, and those formed after normoxia for 96 h (control). Hypoxia for 24 h increased the cell density and branch density in comparison with the whole normoxic condition. Figure 6B shows the total mesh area (sum of the areas enclosed by segments), the number of isolated elements (binary lines not branched), and the total length of the vessel (sum of length of segments, isolated elements, and branches in the analyzed area) detected from pictures of lumens in the two cases referred to above. The total mesh area in the 24 h hypoxia case increased by 95%; the number of isolated elements decreased by 42% and the total length increased by 41% in comparison with the control. These results are in agreement with Nyberg and Grayson [17]; they determined, in a traditional system of culture, that hypoxia inhibits the vascular assembly of individual ECs, but promotes angiogenesis on preassembled lumens in a normoxic environment.

Figure 6C shows the number of meshes; branches (elements delimited by a junction and one extremity); and isolated elements for 24, 36, and 72 h of preincubation in normoxia followed by 24 h of hypoxia. These angiogenic parameters for lumens preincubated for 24 and 36 h and switched to hypoxia for 24 h were less than those of their respective controls with the exception of the number of isolated elements in which 24 h normoxia followed by 24 h hypoxia increased the number of isolated elements. These results suggest that the long preincubation before hypoxia promotes lumenization. Additionally, the lumens formed at 24 and 36 h of preincubation were less mature in comparison with the condition of 72 h, owing to a reduction in the number of meshes and branches. As shown in Figure 6D, the number of segments, total mesh area, total length, and total branching length (of the length of branches in the analyzed area) were proportional with the time of preincubation in normoxia. Figure 6E shows the relative changes in the number of junctions (nodes or group of fusing nodes) for various times of preincubation followed by hypoxia for different durations. The vessel development stopped for 24 and 36 h of preincubation. In addition, regardless of the preincubation time, a long exposure hypoxia (more than 72 h) destabilized the preformed vessel, as observed by the reduction in the number of junctions.

Figure 7 shows the viability of HUVECs cultured on-chip for each period of normoxic preincubation followed by prolonged incubation. After keeping the cells either in normoxia or hypoxia for 168 h (seven days), the cell viability was measured with the LIVE/DEAD method. Figure 7A shows the fluorescence images of the HUVECs stained with the LIVE/DEAD reagents. For each condition of preincubation, the population of living cells incubated in normoxia was greater than cells cultured in hypoxia for 168 h. Moreover, as shown in Figure 7B, the ratio of live/dead cells was proportional to the time of preincubation in normoxia. The method LIVE/DEAD was successfully applied to evaluate the viability of the cells cultured in the devices. However, during the extraction procedure of the gel from the devices, the lumen structure was lost. Therefore, we could not observe the lumen structure by fluorescence.

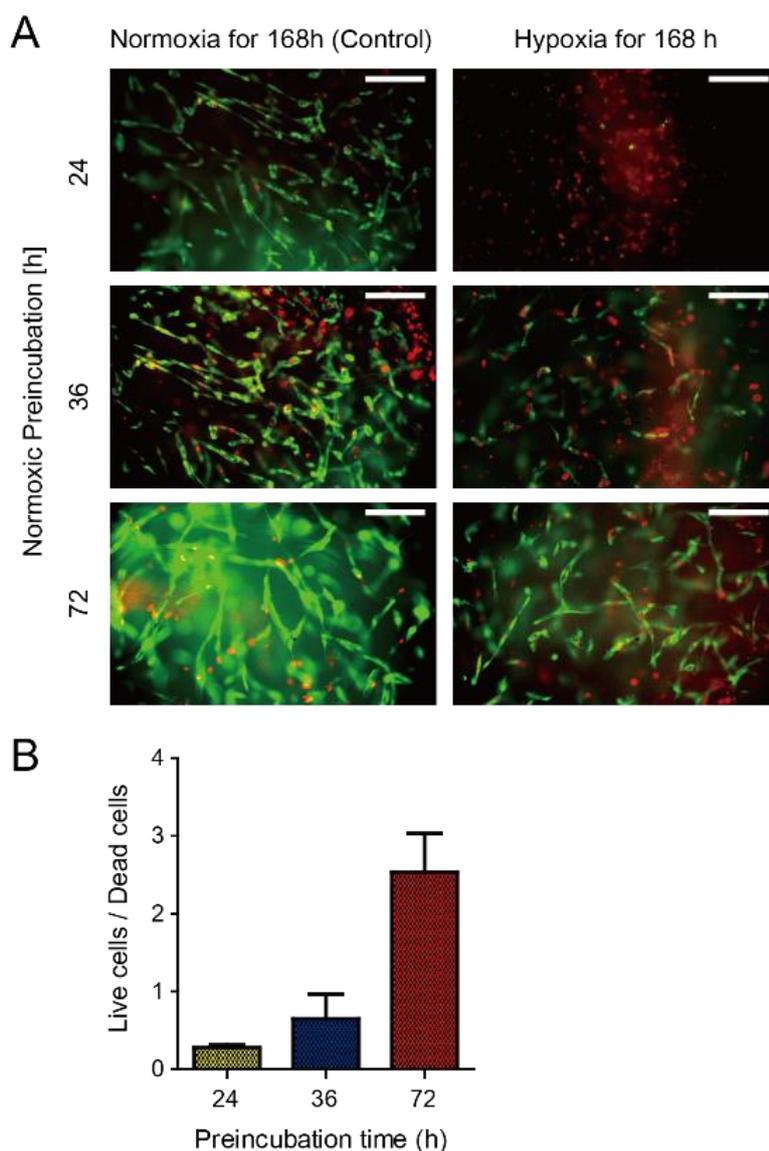


Figure 7. The effect of hypoxia and preincubation duration on the viability of HUVECs cultured on-chip: **(A)** fluorescence images of LIVE/DEAD stained HUVECs. For each image, either normoxia or hypoxia for 168 h followed normoxic preincubation for either 24, 36, or 72 h. Green represents live cells and red represents dead cells. Scale bar = 150 μ m. **(B)** Ratio of live/dead cells as a function of preincubation time in normoxic conditions. This ratio is proportional to the time of normoxic preincubation.

4. Discussion

Our experiments demonstrate that it is possible to develop 3D vascular networks on a chip under normoxic/hypoxic atmospheres. From these findings, various questions can be raised about the fundamental molecular process or genes involved in this phenomenon. Of course, these issues are beyond the scope of this article, but propose a wide field to explore in the future.

Our 3D gel culture device with a nested reservoir pair is a simple option for modeling angiogenesis under hypoxia that has a low cost and allows for easy imaging. Storage of a CO₂ source and a O₂ scavenger inside of the device offers the following: (1) calibration-free CO₂ incubation with or without hypoxia; (2) direct optical access even during hypoxic CO₂ incubation, unlike systems requiring an external chamber; and (3) a simple, well-based 3D gel culture that is much easier to adopt than microfluidic 3D coculture methods such as capillary barrier-based

segmentations of the cell culture area [32,33]. The simple design of this chip helped us provide a simple setup for a 3D vascular network formation assay with hypoxia without external apparatus for gas control or require expertise in microfluidics. The closed microsystem avoids gas exchange with the surrounding atmosphere; therefore, the gas composition of the incubator did not influence the performance of the device. We only verified that the incubator provides the optimal temperature for cell culture. Our miniature hypoxic culture device can incubate 3D cultures with variable oxygen levels down to 4.91% for up to ten days. The O₂ and CO₂ levels achieved within the device were similar to a previously developed on-chip incubation device [30]. However, our device offers an extended hypoxic incubation time, more repeatable and stable O₂ and CO₂ levels, and reduced parts and steps of fabrication. This system has been successfully used for monolayer cultures, such as pheochromocytoma (PC-12) cells, reported by [30].

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) represent a widely used source of primary endothelial cells for in vitro studies of the vasculature and angiogenesis. Although this model does not represent all endothelial cell types found in an organism, they are the most simple and available human EC type, accurate for the preparation of large quantities of cells [34,35]. Induction of HUVECs seeded in the 3D culture well of the device to form a vascular network was successful by seeding at an appropriate cell density and using the conditioned media of hLFs. First, we cocultured HUVECs and hLFs for vascular network formation. However, in most cases, hLFs dominate the culture volume and no visible lumen from HUVECs was observed. Although the comparability of angiogenesis induction by conditioned media and co-culture remains to be investigated, our experimental results show that hLF-conditioned medium works for angiogenesis induction at least as long as our PDMS-well/tubular reservoir system was used. Additionally, a cell density as high as 2×10^5 cells/well was optimal for on-chip angiogenesis and conservation of the vasculature for a long time (10 days) under normoxic conditions.

The effect of hypoxia on the network formation from HUVECs depended on the duration of the preceding normoxic culture, or preincubation. Depending on the concentration and time of exposure, hypoxia can prevent the proliferation of cells and vessels or can act as a signal to trigger endothelial cells to begin the formation of new vasculature. In this regard, as soon as hypoxia is sensed by the endothelial cells, they activate their master oxygen sensors, the hypoxia inducible factors (HIFs). HIF- α activates and translocates into the endothelial cell nucleus and attaches to HIF- β . The complex then enters the angiogenic signaling pathway, modulating the formation of capillaries and vessels [5]. We did not have any knowledge about the normoxia/hypoxia relationship to maximize the lumen formation in our microdevice. The network formation and stability of the morphology of cells and lumens was nearly proportional to the preincubation time. Additionally, the combination of a long pre-incubation time and short hypoxia increased the width and length of the lumens and reduced the number of isolated elements in comparison with the normoxic culture for the same total duration. However, longer hypoxia affected the network stability and led to the disruption of lumens, while a long pre-incubation improved cell viability. Hypoxia is an external factor that plays a dual role in vascularization with both proangiogenic and vessel growth inhibition. Besides the time of hypoxic exposure, the transition between normoxic/hypoxic status could be the factor that determines the effect of hypoxia on endothelial cells. This result will give a new perspective that relates vasculogenesis and intermittent or episodic hypoxia. The use of normoxic/hypoxic transition to control the vascular network formation is a novel approach, but it still needs to be investigated. For that reason, we propose alternating periods (cycles) of normoxia/hypoxia in the networks cultured in our device and to evaluate which condition promotes the development of the vessel for long-term maintenance.

However, it is not clear how the normoxic/hypoxic system could improve the features of the circulatory system. Furthermore, more studies on biochemical mechanisms of the preincubation effect on vessel growth are required. The tracking of biochemical mechanisms in real-time imaging of 3D culture could be one potential application offered by this device.

In addition, our device is promising as a platform for the development of complex human organoids that contain microvasculature for better oxygen, nutrient, and metabolite exchange.

Vascularization is considered one of the greatest challenges in the development of organoids [36,37]. Existing strategies to recreate vasculature including additive manufacturing based on photosensitive polymers and the use of sacrificial structures have limitations mainly in the removal of cytotoxicity [38,39]. Additionally, their considerable infrastructure cost precludes their wider adoption [3]. Our on-chip 3D hypoxia device will provide a platform for vasculature formation in organoids without cytotoxicity and in reasonably high throughput. Moreover, hypoxia is related to the angiogenic capability of cancer cells, and may mediate the progression of cancer. We could incorporate cells extracted from a biopsy into our device, and evaluate the angiogenic capacity to estimate their aggressiveness. Hypoxia is relevant in the treatment of some diseases such as cancer. For example, the effectiveness of radiotherapy relies on the oxygen radicals (ROS) produced by irradiating molecular oxygen [40]. Therefore, our device will also work as a platform for the therapeutic application of organoids.

5. Conclusions

We developed a portable standalone device to culture HUVECs under a 3D environment (fibrin–collagen gel) and expose them to transitions of normoxia/hypoxia. We confirmed that seeding at $(1.59 \pm 0.07) \times 10^4$ cells/mm² and the use of hLF-conditioned medium provide repeatable vascular network formation. We then evaluated the preincubation in normoxia as a parameter that influences the effect of hypoxia in the development and stability of vascular networks. The increased duration of preincubation (72 h) increases angiogenic parameters, and this condition favors the vascular promoting effect of hypoxia for 24 h.

The adaptation of endothelial cells to the transition of normoxia–hypoxia is an approach that allows for the formation and better development of a vascular network. For that reason, this device was important to maintain vascular networks in an easy configuration and introduces a different perspective of the study of cell cultures under hypoxic environments. Our result could potentially lead to the development of more advanced microdevices for cell culture (e.g., culture of organoids) that nowadays present technical difficulties for long-term maintenance. Particularly, hypoxia conditions will benefit the development of hypoxia-induced angiogenesis in organoid cultures or other kinds of biomimetic models.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: “Schematic of the fabrication process for the microdevice.”: the fabrication steps carried out in the manufacture of the 3D cell culture device.

Author Contributions: Conceptualization, N.F.; methodology, M.A.O.-S., A.T., and N.F.; formal analysis, M.A.O.-S.; investigation, M.A.O.-S., T.S., and A.T.; resources, A.T. and N.F.; data curation, M.A.O.-S.; writing—original draft preparation, M.A.O.-S.; writing—review and editing, M.A.O.-S., A.T., and N.F.; visualization, M.A.O.-S.; supervision, M.P.C.-M. and N.F.; project administration, M.P.C.-M. and N.F.; funding acquisition, M.A.O.-S., M.P.C.-M., and N.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by JST CREST Grant Number JPMJCR14W4. In addition, M.A.O.S. is thankful for the mobility fellowship 289105 granted by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to conduct research at Shibaura Institute of Technology.

Acknowledgments: We thank Ashleigh Cooper from Edanz Group (<https://en-author-services.edanzgroup.com/>) for editing a draft of this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Bae, H.; Puranik, A.S.; Gauvin, R.; Edalat, F.; Carrillo-Conde, B.; Peppas, N.A.; Khademhosseini, A. Building vascular networks. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 160ps23, doi:10.1126/scitranslmed.3003688.

2. Cochrane, A.; Albers, H.J.; Passier, R.; Mummery, C.L.; Van Den Berg, A.; Orlova, V.V.; Van Der Meer, A.D. Advanced in vitro models of vascular biology: Human induced pluripotent stem cells and organ-on-chip technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *140*, 68–77., doi:10.1016/j.addr.2018.06.007.
3. Grebenyuk, S.; Ranga, A. Engineering Organoid Vascularization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 39, doi:10.3389/fbioe.2019.00039.
4. Toussaint, O.; Weemaels, G.; Debaq-Chainiaux, F.; Scharffetter-Kochanek, K.; Wlaschek, M. Artefactual effects of oxygen on cell culture models of cellular senescence and stem cell biology. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 315–321, doi:10.1002/jcp.22416.
5. Krock, B.L.; Skuli, N.; Simon, M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: Good and evil. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 1117–1133, doi:10.1177/1947601911423654.
6. Cao, H.; Yu, D.; Yan, X.; Wang, B.; Yu, Z.; Song, Y.; Sheng, L. Hypoxia destroys the microstructure of microtubules and causes dysfunction of endothelial cells via the PI3K/Stathmin1 pathway. *Cell Biosci.* **2019**, *9*, 20, doi:10.1186/s13578-019-0283-1.
7. Abe, H.; Semba, H.; Takeda, N. The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* **2017**, *24*, 884–894, doi:10.5551/jat.RV17009.
8. Eltzchig, H.; Carmeliet, P. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 656–665, doi:10.1056/NEJMra0910283.
9. Rankin, E.B.; Giaccia, A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 678–685, doi:10.1038/cdd.2008.21.
10. Baldea, I.; Teacoe, I.; Olteanu, D.E.; Vaida-Voievod, C.; Clichici, A.; Sirbu, A.; Filip, G.A.; Clichici, S. Effects of different hypoxia degrees on endothelial cell cultures-Time course study. *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *172*, 45–50, doi:10.1016/j.mad.2017.11.003.
11. Wu, J.; Lei, Z.; Yu, J. Hypoxia induces autophagy in human vascular endothelial cells in a hypoxia-inducible factor 1 dependent manner. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 2677–2682, doi:10.3892/mmr.2014.3093.
12. Michiels, C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 1875–1882, doi:10.1016/S0002-9440(10)63747-9.
13. Tang, N.; Wang, L.; Esko, J.; Giordano, F.J.; Huang, Y.; Gerber, H.P.; Ferrara, N.; Johnson, R.S. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 485–495, doi:10.1016/j.ccr.2004.09.026.
14. LaGory, E.L.; Giaccia, A.J. The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 356–365, doi:10.1038/ncb3330.
15. Fathollahipour, S.; Patil, P.S.; Leipzig, N.D. Oxygen Regulation in Development: Lessons from Embryogenesis towards Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs* **2018**, *205*, 350–371, doi:10.1159/000493162.
16. Hutton, D.L.; Grayson, W.L. Hypoxia inhibits de novo vascular assembly of adipose-derived stromal/stem cell populations, but promotes growth of preformed vessels. *Tissue Eng. Part A* **2016**, *22*, 161–169, doi:10.1089/ten.TEA.2015.0421.
17. Nyberg, E.; Grayson, W.L. Assessing the Minimum Time-Period of Normoxic Preincubation for Stable Adipose Stromal Cell-Derived Vascular Networks. *Cell Mol. Bioeng.* **2018**, *11*, 471–481, doi:10.1007/s12195-018-0539-6.
18. Byrne, M.B.; Leslie, M.T.; Gaskins, H.R.; Kenis, P.J.A. Methods to study the tumor microenvironment under controlled oxygen conditions. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 556–563, doi:10.1016/j.tibtech.2014.09.006.
19. Funamoto, K.; Zervantonakis, I.K.; Liu, Y.; Ochs, C.J.; Kim, C.; Kamm, R.D. A novel microfluidic platform for high-resolution imaging of a three-dimensional cell culture under a controlled hypoxic environment. *Lab. Chip* **2012**, *12*, 4855–4863, doi:10.1039/c2lc40306d.
20. Bakmiwewa, S.M.; Heng, B.; Guillemain, G.J.; Ball, H.J.; Hunt, N.H. An effective, low-cost method for achieving and maintaining hypoxia during cell culture studies. *Biotechniques* **2015**, *59*, 223–224, 226, 228–229, doi:10.2144/000114341.
21. Skolimowski, M.; Nielsen, M.W.; Emnéus, J.; Molin, S.; Taboryski, R.; Sternberg, C.; Dufva, M.; Geschke, O. Microfluidic dissolved oxygen gradient generator biochip as a useful tool in bacterial biofilm studies. *Lab. Chip* **2010**, *10*, 2162–2169, doi:10.1039/c003558k.
22. Chen, Y.A.; King, A.D.; Shih, H.C.; Peng, C.C.; Wu, C.Y.; Liao, W.H.; Tung, Y.C. Generation of oxygen gradients in microfluidic devices for cell culture using spatially confined chemical reactions. *Lab. Chip* **2011**, *11*, 3626–3633, doi:10.1039/c1lc20325h.

23. Park, J.; Bansal, T.; Pinelis, M.; Maharbiz, M.M. A microsystem for sensing and patterning oxidative microgradients during cell culture. *Lab. Chip* **2006**, *6*, 611–622., doi:10.1039/b516483d.
24. Mosadegh, B.; Lockett, M.R.; Minn, K.T.; Simon, K.A.; Gilbert, K.; Hillier, S.; Newsome, D.; Li, H.; Hall, A.B.; Boucher, D.M.; et al. A paper-based invasion assay: Assessing chemotaxis of cancer cells in gradients of oxygen. *Biomaterials* **2015**, *52*, 262–271, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.012.
25. Wu, H.M.; Lee, T.A.; Ko, P.L.; Chiang, H.J.; Peng, C.C.; Tung, Y.C. Review of microfluidic cell culture devices for the control of gaseous microenvironments in vitro. *J. Micromech. Microeng.* **2018**, *28*, doi:10.1088/1361-6439/aaa993.
26. Munoz-Sanchez, J.; Chanez-Cardenas, M.E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* **2019**, *39*, 556–570, doi:10.1002/jat.3749.
27. Niu, N.; Li, Z.; Zhu, M.; Sun, H.; Yang, J.; Xu, S.; Zhao, W.; Song, R. Effects of nuclear respiratory factor1 on apoptosis and mitochondrial dysfunction induced by cobalt chloride in H9C2 cells. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 2153–2163, doi:10.3892/mmr.2019.9839.
28. Reist, M.; Marshall, K.A.; Jenner, P.; Halliwell, B. Toxic effects of sulphite in combination with peroxynitrite on neuronal cells. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 2431–2438., doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71062431.x.
29. Vengellur, A.; Phillips, J.M.; Hogenesch, J.B.; LaPres, J.J. Gene expression profiling of hypoxia signaling in human hepatocellular carcinoma cells. *Physiol. Genom.* **2005**, *22*, 308–318, doi:10.1152/physiolgenomics.00045.2004.
30. Takano, A.; Tanaka, M.; Futai, N. On-chip multi-gas incubation for microfluidic cell cultures under hypoxia. *Biomicrofluidics* **2014**, *8*, 061101, doi:10.1063/1.4902941.
31. Carpentier, G. Angiogenesis Analyzer for ImageJ. Available online: <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ> (accessed on 20 December 2019).
32. Kim, S.; Lee, H.; Chung, M.; Jeon, N.L. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab. Chip* **2013**, *13*, 1489–1500, doi:10.1039/c3lc41320a.
33. Kim, S.; Chung, M.; Ahn, J.; Lee, S.; Jeon, N.L. Interstitial flow regulates the angiogenic response and phenotype of endothelial cells in a 3D culture model. *Lab. Chip* **2016**, *16*, 4189–4199, doi:10.1039/c6lc00910g.
34. Baudin, B.; Bruneel, A.; Bosselut, N.; Vaubourdolle, M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 481, doi:10.1038/nprot.2007.54.
35. Kocherova, I.; Bryja, A.; Mozdziak, P.; Angelova Volponi, A.; Dyszkiewicz-Konwińska, M.; Piotrowska-Kempisty, H.; Zabel, M. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8101602.
36. Costa-Almeida, R.; Granja, P.L.; Soares, R.; Guerreiro, S.G. Cellular strategies to promote vascularisation in tissue engineering applications. *Eur. Cell Mater.* **2014**, *28*, 51–66, doi:10.22203/ecm.v028a05.
37. Grassi, L.; Alfonsi, R.; Francescangeli, F.; Signore, M.; De Angelis, M.L.; Addario, A.; Costantini, M.; Flex, E.; Ciolfi, A.; Pizzi, S.; et al. Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 201, doi:10.1038/s41419-019-1453-0.
38. Wu, W.; DeConinck, A.; Lewis, J.A. Omnidirectional printing of 3D microvascular networks. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H178–H183, doi:10.1002/adma.201004625.
39. Li, S.; Liu, Y.Y.; Liu, L.J.; Hu, Q.X. A Versatile Method for Fabricating Tissue Engineering Scaffolds with a Three-Dimensional Channel for Prevasculature Networks. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 25096–25103, doi:10.1021/acsami.6b07725.
40. Metsala, O.; Kreuzer, J.; Hogel, H.; Miikkulainen, P.; Kallio, P.; Jaakkola, P.M. Transportable system enabling multiple irradiation studies under simultaneous hypoxia in vitro. *Radiat. Oncol.* **2018**, *13*, 220, doi:10.1186/s13014-018-1169-9.

