



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Desarrollo de dispositivos de microfluídica para un nuevo enfoque en la producción de anticuerpos monoclonales.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Paola Julieta Karp**

Director de Tesis: Dr. Gustavo Fernando Helguera

Co-Directora de Tesis: Dra. Betiana Lerner

Consejero de Estudios: Dr. Leonardo Erijman

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)–  
CONICET

Buenos Aires, 2022

## **Desarrollo de dispositivos de microfluídica para un nuevo enfoque en la producción de anticuerpos monoclonales.**

### **Resumen:**

La presente tesis está centrada en el diseño y fabricación de dispositivos miniaturizados escalables que permiten optimizar las condiciones de cultivo y crecimiento de células adherentes de mamífero, para favorecer una mayor producción de proteínas recombinantes en condiciones controladas. Primero, se diseñaron y fabricaron distintas versiones de dispositivos de microfluídica de pequeño volumen (DMPV; 32,22  $\mu$ l) de polidimetilsiloxano (PDMS) con vidrio u otros materiales para el cultivo de células CHO-K1 y HEK-293T. El modelado computacional del flujo del medio de cultivo en el DMPV arrojó velocidades adecuadas para el crecimiento celular, permitiendo cultivar células por más de 2 meses.

En este DMPV se cultivaron las líneas celulares adherentes CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b que expresan un anticuerpo monoclonal (mAb) recombinante anti-hIFN- $\alpha$ 2b que está siendo evaluado para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico. La productividad de ambas líneas celulares fue mayor en los DMPV en comparación con la obtenida utilizando el método de cultivo celular adherente tradicional. Además, el análisis funcional de los mAbs producidos en los DMPVs no mostró diferencias significativas en comparación con los mAbs producidos con el método tradicional.

También se desarrolló un software de procesamiento y análisis de imágenes basado en Python para el crecimiento celular (PIACG, por sus siglas en inglés), que permite calcular el área total ocupada por las células en las cámaras de los DMPV en respuesta a diferentes concentraciones de suero fetal bovino, a partir de imágenes de microscopía.

Por último, se diseñó y fabricó un dispositivo de microfluídica de gran volumen (DMGV, 2,8 ml) para el cultivo de células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b. El crecimiento celular con bombeo activo del flujo en el DMGV se mantuvo constante a lo largo del cultivo. En este DMGV se cuantificaron los niveles de glucosa y lactato del medio de cultivo y se observó que sus concentraciones se mantuvieron sin cambios significativos durante todo el estudio. Por último, es interesante observar que los mAbs producidos en el DMGV exhiben una mejora significativa en su afinidad y actividad biológica, en comparación con los producidos con el método tradicional de cultivo.

Estos resultados sugieren que los DMPV permiten cultivar células adherentes de mamífero por más de 60 días y líneas celulares que expresan mAbs recombinantes. También se desarrolló un software que permite monitorear el crecimiento celular en estos DMPV. Finalmente, se demostró que los DMPV son escalables más de 80 veces su volumen, manteniendo estables parámetros críticos de cultivo como glucosa y lactato durante el cultivo.

**Palabras Clave: Dispositivo de Microfluídica, Anticuerpo Monoclonal Recombinante, Células adherentes, Análisis de imágenes, Crecimiento celular.**

## **Microfluidic device development for a new focus on the production of monoclonal antibodies.**

### **Abstract:**

The present thesis is focused on the design and manufacture of scalable miniaturized devices that allow optimizing the culture and growth conditions of adherent mammalian cells, to favor a greater production of recombinant proteins under controlled conditions. First, different versions of small volume microfluidic devices (SVMD; 32,22  $\mu$ l) of polydimethylsiloxane (PDMS) were designed and manufactured with glass or other materials for the culture of CHO-K1 and HEK-293T cells. The computational modeling of the flow of the culture medium in SVMD yielded adequate velocities for cell growth, allowing cells to be cultured for more than 2 months.

Adherent cell lines CHO-ahIFN $\alpha$ 2b and HEK-ahIFN $\alpha$ 2b expressing a recombinant monoclonal anti-hIFN- $\alpha$ 2b antibody (mAb) that is being evaluated for the treatment of systemic lupus erythematosus were cultured in this SVMD. The productivity of both cell lines was higher in SVMD compared to that obtained using the traditional adherent cell culture method. Furthermore, the functional analysis of the mAbs produced in the SVMDs did not show significant differences compared to the mAbs produced with the traditional method.

Python-based image analysis and processing software for cell growth (PIACG) was also developed, which allows calculating the total area occupied by cells in the SVMD chambers in response to different concentrations of fetal bovine serum, from bright-field microscopy images.

Finally, a large volume microfluidic device (LVMD, 2,8 mL) was designed and manufactured for the cultivation of CHO-ahIFN $\alpha$ 2b cells. Cell growth with active pump flow cycles in LVMD remained constant throughout the culture. In this LVMD, the levels of glucose and lactate of the culture medium were quantified and it was observed that their concentrations remained without significant changes throughout the study. Finally, it is interesting to note that the mAbs produced in the DMGV exhibit a significant improvement in their affinity and biological activity, compared to those produced with the traditional culture method.

These results suggest that these SVMDs allow culturing adherent mammalian cells for more than 60 days and cell lines expressing recombinant mAbs. Software was also developed to

monitor cell growth in SVMs. Finally, it was shown that SVMs are scalable more than 80 times, maintaining stable critical culture parameters such as glucose and lactate during culture.

**Key Words: Microfluidic Device, Recombinant Monoclonal Antibody, Adherent cells, Image analysis, Cell growth.**

## Publicaciones

### Trabajos publicados durante el desarrollo de esta tesis:

- **Karp P**, Gatto M, Batto MV, Ferrero S, Helguera G. *Biosimilar Monoclonal Antibodies in Latin America* (Online First)- IntechOpen. 2021 Dec 7. DOI: 10.5772/intechopen.101227.
- Bourguignon N\*, Attallah C\*, **Karp P\***, Booth R, Peñaherrera A, Payés C, Oggero M, Pérez MS, Helguera G, Lerner B. *Production of monoclonal antibodies in microfluidic devices*. Integr. Biol. (Camb). 2018 Mar 1;10(3):136-144. doi: 10.1039/c7ib00200a. \* Co-primera autora.
- Georg M, Fernández-Cabada T, Bourguignon N, **Karp P**, Peñaherrera AB, Helguera G, Lerner B, Pérez M, Mertelsmann R. *Development of image analysis software for quantification of viable cells in microchips*. (2018) PLoS ONE, 13(3), e0193605. doi: 10.1371/journal.pone.0193605

# Índice

	Página
<b>Resumen:</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract:</b> .....	<b>4</b>
<b>Publicaciones</b> .....	<b>6</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>11</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>14</b>
<b>1. Microfluídica</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1. Fenómenos físicos a macroescala</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.1. Perfil de velocidad del flujo laminar en un canal circular</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.2. Viscosidad de fluidos</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.3. Difusión de masa</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2. Fenómenos físicos a microescala (Número de Reynolds y Número de Péclet)</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3. Materiales de fabricación de los dispositivos de microfluídica</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4. Fabricación de los dispositivos de microfluídica de PDMS</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4.1. Litografía suave y fotolitografía (Fotoresina SU-8)</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4.2. Tecnología flexográfica</b> .....	<b>25</b>
<b>1.5. Recubrimientos para los microcanales de los dispositivos microfluídicos</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6. Aplicaciones de los dispositivos microfluídicos</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Métodos de cultivo celular</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1. Método convencional de cultivo celular adherente</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2. Cultivo celular en dispositivos de microfluídica</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Anticuerpos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1. Estructura básica de los anticuerpos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2. Evolución de los anticuerpos monoclonales a medicamentos biológicos</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3. Anticuerpos estructuralmente modificados (Fab, scFv, minicuerpos, monovalentes, bivalentes y multivalentes)</b> .....	<b>39</b>

3.4. Regulación de medicamentos biológicos y anticuerpos monoclonales terapéuticos en Argentina.....	42
3.5. Producción de anticuerpos monoclonales recombinantes .....	43
3.6. Producción de anticuerpos monoclonales en dispositivos de microfluídica .....	47
4. Rol de Interferones en enfermedades autoinmunes .....	48
Objetivos.....	50
Materiales y Métodos.....	52
1. Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos .....	53
1.1. Dispositivos de microfluidica de pequeño volumen (DMPV) de 4 canales y multicámara de 20 canales .....	53
1.2. Dispositivo de microfluídica de gran volumen (DMGV).....	57
1.2.1. Fabricación del molde maestro Flexográfico de fotopolímero (Fmold).....	59
1.2.2. Fabricación de un molde de Resina Epoxi (ERMold) .....	60
1.2.3. Dispositivo de PDMS.....	60
2. Caracterización del flujo interno de los dispositivos de microfluídica mediante modelado computacional.....	61
3. Líneas celulares de mamífero.....	61
4. Condiciones de cultivo celular.....	63
4.1. Cultivo celular en los DMPV .....	63
4.1.1. Estudio de internalización de pseudovirus de VSV en DMPVs de 4 canales ....	64
4.2. Cultivo celular en el DMGV.....	66
5. Medición del crecimiento y distribución celular mediante análisis de imágenes en ImageJ.....	68
6. Desarrollo del software PIACG .....	69
7. Producción del anticuerpo monoclonal recombinante anti-hIFN- $\alpha$ 2b.....	70
7.1. Purificación del anti-hIFN- $\alpha$ 2b .....	70
7.2. SDS-PAGE y análisis de transferencia Western del anti-hIFN- $\alpha$ 2b.....	70
7.3. Cuantificación por ELISA del anti-hIFN- $\alpha$ 2b .....	71
7.4. Evaluación de los atributos de calidad del anti-hIFN- $\alpha$ 2b.....	72



7.4.1.	Inhibición de la actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b por el anti-hIFN- $\alpha$ 2b	72
7.4.2.	Inhibición de la señalización de células de rhIFN- $\alpha$ 2b por el anti-hIFN- $\alpha$ 2b ....	73
7.4.3.	Inhibición de la actividad antiviral de rhIFN por el anti-hIFN- $\alpha$ 2b .....	74
7.4.4.	Determinación de constantes de afinidad del anti-hIFN- $\alpha$ 2b .....	75
8.	Cuantificación de Glucosa y Lactato del medio de cultivo del DMGV .....	75
	Resultados .....	77
1.	Dispositivos de microfluídica de pequeño volumen (DMPV) .....	78
1.1.	DMPV de 4 canales .....	78
1.1.1.	Modelado computacional de flujo en el DMPV de 4 canales.....	79
1.1.2.	Cultivo celular en los DMPV de 4 canales.....	82
1.1.2.1.	Comparación de los cultivos celulares en los DMPV de 4 canales con y sin Ablación Láser .....	85
1.1.2.2.	Comparación de los cultivos celulares en los DMPV de 4 canales con piso de vidrio y de PDMS.....	87
1.1.3.	Producción de anticuerpos monoclonales en los DMPV de 4 canales.....	88
1.1.4.	Evaluación y comparación de los atributos de calidad del anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido en los DMPVs y en las botellas-T .....	91
1.2.	DMPV multicámara de 20 canales .....	93
1.2.1.	Análisis de datos en el software PIACG .....	94
1.2.2.	Comparación entre el cálculo del software manual, ImageJ y PIACG.....	97
1.2.3.	Análisis biológico en el DMPV multicámara .....	100
2.	Dispositivos de microfluídica de gran volumen (DMGV) de 32 canales .....	103
2.1.	Modelado computacional del flujo en el DMGV .....	103
2.2.	Crecimiento celular en el DMGV de 32 canales.....	104
2.3.	Cuantificación de glucosa y lactato del medio del DMGV.....	106
2.4.	Producción de anticuerpos monoclonales en el DMGV.....	107

2.5. Inhibición de la actividad antiproliferativa, inhibición de la señalización de células e inhibición de la actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b por los anticuerpos producidos en el DMGV y en botellas-T .....	109
3. Estudio de internalización de pseudovirus de VSV en DMPVs de 4 canales.....	112
Discusión.....	114
Conclusiones .....	132
Referencias .....	136
Anexo.....	153

## Abreviaturas

**ADCC:** citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

**ADCP:** fagocitosis celular dependiente de anticuerpos

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CDC:** citotoxicidad dependiente del complemento

**CPD:** células predendríticas plasmocitoides

**CDR:** regiones determinantes complementarias

**C<sub>H</sub>:** dominio constante de la cadena pesada

**CHO:** ovario de hámster chino

**C<sub>L</sub>:** dominio constante de la cadena liviana

**DIC:** Contraste de Interferencia Diferencial

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMGV:** dispositivo de microfluídica de gran volumen

**DMPV:** dispositivo de microfluídica de pequeño volumen

**DQV:** deposición química de vapor

**DQV-PP:** deposición química de vapor potenciado por plasma

**ERmold:** molde de resina epoxí reutilizable

**Fab:** fragmento de unión al antígeno

**Fc:** fragmento cristizable

**FcRn:** receptor de Fc neonatal

**FcγRs:** receptores gamma Fc

**FDA:** Food and Drug Administration

**Fmold:** molde maestro flexográfico de fotopolímero

**FRC:** concentración necesaria para reducir la fluorescencia

**FSC:** dispersión de luz directa

**Fv:** región variable

**GFP:** proteína de fluorescencia verde

**GOI:** gen de interés

**HACA:** anticuerpo anti-quiméricos humanos

**HAMA:** anticuerpo humano anti-ratón

**HcAb:** anticuerpos de cadena pesada

**HEK:** riñón embrionario humano

**HER2:** receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

**HMDS:** hexametildisilazano

**hs:** hora/s

**IC:** concentración de inhibición

**IFN:** interferón

**IgG:** inmunoglobulina G

**K<sub>A</sub>:** constante de afinidad

**kDa:** kilodalton

**LES:** lupus eritematoso sistémico

**LOC:** lab on a chip

**mAb:** anticuerpo monoclonal

**min:** minuto/s

**MLV:** virus de la leucemia murina

**mSA:** albúmina sérica modificada

**neu:** neuroblastoma

**PDMS:** polidimetilsiloxano

**PIACG:** análisis de imágenes basado en Python para el crecimiento celular

**PMMA:** polimetilmetacrilato

**PS:** péptidoseñal

**rhIFN- $\alpha$ 2b:** interferón  $\alpha$  humano 2b recombinante

**rpm:** revoluciones por minuto

**scFv:** región variable de cadena sencilla

**Seg:** Segundo/s

**SFB:** suero fetal bovino

**SEM:** error estándar de la media

**SHM:** hipermutación somática

**SSC:** dispersión de luz lateral

**TIL:** capa de imagen térmica

**U:** unidad de actividad enzimática

**V<sub>H</sub>:** dominio variable de la cadena pesada

**V<sub>L</sub>:** dominio variable de la cadena liviana

**VSV:** virus de la estomatitis vesicular

# Introducción

---

## 1. Microfluídica

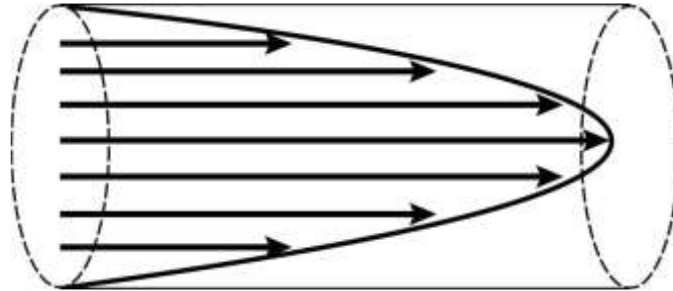
La ciencia y tecnología de los sistemas que procesan o manipulan bajas cantidades (nl a  $\mu\text{l}$ ) de fluidos ya sean líquidos o gases, mediante canales con dimensiones de 10 a cientos de micrómetros se conoce como microfluídica (Whitesides, 2006). En los últimos 30 años, la microfluídica ha evolucionado y florecido como una plataforma avanzada para proveer un ambiente simplificado y controlado. Según Whitesides (Whitesides, 2006), el campo de la microfluídica tiene cuatro padres: análisis molecular, biodefensa, biología molecular y microelectrónica. Las tecnologías de microfluídica han sido exploradas en su mayoría por disciplinas como la química, farmacéutica y la biología (Ho *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2019). Para trabajar con microfluídica, es importante comprender los fenómenos físicos que son dominantes a escala micrométrica. A microescala, las ecuaciones físicas básicas en mecánica de fluidos siguen siendo las mismas que en los sistemas macroscópicos. Sin embargo, debido a la reducción de la escala de los fluidos a submilimétrica, algunas de las fuerzas (por ejemplo, fuerzas capilares) se vuelven más dominantes sobre las cotidianas (Brody *et al.*, 1996). En el caso del flujo de fluido, la reducción de tamaño reducirá la influencia de las fuerzas de inercia en comparación con las fuerzas de fricción o viscosas. Esto conducirá a la formación de un flujo laminar en los canales microfluídicos. Por lo tanto, se deben considerar nuevos diseños para lidiar con las fuerzas que son dominantes cuando se trabaja en rangos de microescala. Al reducir la escala de la geometría del canal que contiene el fluido, los efectos que se vuelven dominantes en microfluídica incluyen flujo laminar, difusión, resistencia fluídica, relación de superficie sobre volumen y tensión superficial (Beebe *et al.*, 2002).

### 1.1. Fenómenos físicos a macroescala

#### 1.1.1. Perfil de velocidad del flujo laminar en un canal circular

El flujo laminar en un canal de sección transversal circular adopta la forma de un tubo concéntrico de pared delgada y su velocidad aumenta desde cero en la pared de hasta ser máxima en la línea central del canal, como se observa en la **Figura 1**, el flujo es direccionado

hacia el eje del canal y no hay gradientes de presión a través del diámetro del canal (Mousavi Shaegh *et al.*, 2019).



**Figura 1: Flujo laminar en un tubo de sección transversal circular.** El flujo laminar exhibe un perfil de velocidades parabólico. La velocidad es cero en las paredes del canal y alcanza su máximo valor en la línea central del canal. Adaptado de (Pethig and Smith, 2012).

### 1.1.2. Viscosidad de fluidos

Las moléculas en los líquidos tienen libre movimiento y están limitadas únicamente por las fuerzas de cohesión que dan lugar a los efectos viscosos, afectados principalmente por la temperatura y levemente por la presión. Por lo tanto, los líquidos son tratados como incompresibles (Mousavi Shaegh *et al.*, 2019).

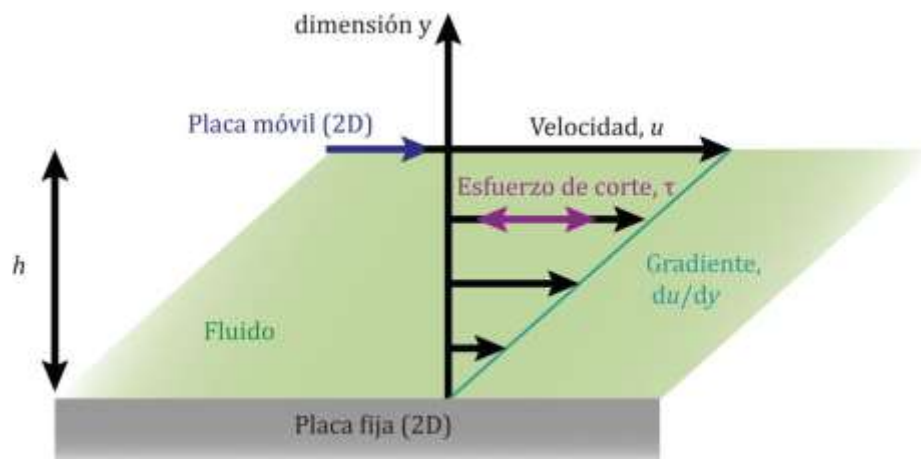
La viscosidad ( $\mu$ ) o la viscosidad dinámica de un fluido es aquella propiedad que determina la cantidad de resistencia opuesta a las fuerzas de corte. La viscosidad se debe principalmente a las interacciones entre las moléculas del fluido (Ronald, 1970). Ésta es una medida de su resistencia a la deformación gradual por el esfuerzo de corte que se discute en términos del dispositivo de Couette de flujo: un fluido contenido entre dos placas limítrofes, una estacionaria y otra móvil, que se mueven a velocidad horizontal constante (**Figura 2**). La mayoría de los fluidos tienen viscosidad diferente de cero. Un fluido que no presenta resistencia al esfuerzo de corte se conoce como un fluido ideal. La viscosidad cero se observa únicamente a temperatura muy baja en superfluidos, como isótopos de helio, debido a que son licuados a temperatura criogénica (Mousavi Shaegh *et al.*, 2019). La magnitud de esta fuerza ( $F$ ) es



proporcional a la velocidad ( $u$ ) y el área ( $A$ ) de cada placa e inversamente proporcional a su separación ( $y$ ) (**Ecuación 1**).

### Ecuación 1

$$F = \mu A \frac{u}{y}$$



**Figura 2: Corte laminar del fluido entre dos placas (dispositivo Couette de flujo).** La fricción entre el fluido y los límites en movimiento causa que el fluido corte debido al esfuerzo de corte ( $\tau$ ) causado por el gradiente espacial de velocidad ( $du/dy$ ) a una velocidad relativa del fluido ( $u$ ). La fuerza ( $F$ ) requerida para esta acción es una medida de la viscosidad ( $\mu$ ) del fluido. Adaptado de (Mousavi Shaegh *et al.*, 2019).

#### 1.1.1. Tensión o esfuerzo de corte

A macroescala (en el dispositivo Couette de flujo) la velocidad del fluido inmediatamente junto a la superficie será igual a la velocidad de la superficie. Para un fluido Newtoniano como el agua, su velocidad cambia progresivamente desde cero en la superficie estacionaria hasta la velocidad de la superficie móvil. En un flujo general paralelo, la fuerza de corte es proporcional al gradiente de velocidad, como en la sección transversal de un microcanal

rectangular. La tensión de corte de un fluido generalmente se mide como la relación de la fuerza de corte sobre el área sobre la que está actuando. Las paredes del microcanal se pueden comparar con dos placas paralelas y el esfuerzo de corte que se impone a las células es constante durante un período de tiempo definido, ya que el caudal es constante. En un canal donde se cultivan células, la pared inferior es donde se adhieren. El cálculo de la tensión de corte en un microcanal se expresa en la **Ecuación 2** (Bacabac *et al.*, 2005).

### Ecuación 2

$$\tau = \frac{6\mu Q}{wh^2}$$

En la **Ecuación 2**,  $\tau$  es la tensión de corte (Pa),  $\mu$  es la viscosidad dinámica del fluido (Pa·seg),  $Q$  es el caudal volumétrico (m<sup>3</sup>/seg),  $h$  es la altura del canal (m) y  $w$  es el ancho del canal (m). Para los cálculos de tensión de corte utilizando medio de cultivo celular DMEM, como fluido, la viscosidad de DMEM a 37°C es 0,0078 Pa·seg (Bacabac *et al.*, 2005). De la **Ecuación 2**, se espera que al reducir la escala de la altura de los microcanales aumentará la tensión de corte para un caudal o velocidad fijos. En condiciones de cultivo celular de perfusión constante, las células pueden verse afectadas físicamente por la exposición a la tensión de corte.

### 1.1.3. Difusión de masa

El mezclado de los fluidos depende de su viscosidad y también de su coeficiente de difusión de masa ( $D$ ). La difusión representa la velocidad de la migración de la masa debido al movimiento térmico de las moléculas, átomos o iones sin el movimiento de la masa completa, lo cual puede ocurrir por uno o más movimientos de objetos entre las fases. La capacidad de difusión de las sustancias depende de la temperatura, la presión y la morfología del medio (Mousavi Shaegh *et al.*, 2019). La unidad para la capacidad de difusión es m<sup>2</sup>/seg, la misma que la viscosidad cinemática. Para un flujo laminar en un canal, debido a la ausencia de fuerzas convectivas que actúan sobre el fluido, los contenidos en el fluido se mezclarán por difusión.

Además, la reducción de las dimensiones tiene una influencia directa en el tiempo de reacción de los contenidos. La difusión de una partícula en un canal se puede modelar en medios unidimensionales mediante la **Ecuación 3**.

### Ecuación 3

$$d = \sqrt{2Dt}$$

En la **Ecuación 3**,  $d$  es la distancia que se mueve una partícula en el tiempo  $t$  y  $D$  es el coeficiente de difusión de la partícula. De la **Ecuación 3**, queda claro que el tiempo de mezcla basado en difusión aumenta con la distancia de difusión. Por lo tanto, la difusión se convierte en un fenómeno importante a microescala. El grado de mezcla de partículas entre corrientes adyacentes depende, por lo tanto, de las dimensiones del canal, el tamaño de la partícula encontrada dentro del canal y las velocidades de flujo dentro del canal. La velocidad de difusión está relacionada con el coeficiente de difusión del soluto de interés. El coeficiente de difusión ( $D$ ) se puede estimar con la ecuación de Stokes-Einstein (**Ecuación 4**).

### Ecuación 4

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu r}$$

En la **Ecuación 4**,  $T$  (K) es la temperatura absoluta,  $r$  (m) es el radio de la partícula,  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $\mu$  (Pa·seg) es la viscosidad del soluto. En general, el tamaño lineal de una molécula varía según la raíz cúbica del peso molecular ( $r \approx \sqrt[3]{MW}$ ) (Young *et al.*, 1980). Por lo tanto, el coeficiente de difusión para una proteína grande es aproximadamente 50 veces más pequeño que un ion. Para células (10  $\mu\text{m}$  de diámetro) la constante de difusión podría ser  $2 \times 10^4$  veces más pequeña que para una proteína pequeña.

Los tiempos de difusión son mucho más reducidos en sistemas microfluídicos que en dispositivos convencionales. Esto se debe a las dimensiones más pequeñas del sistema que

conducen a menores tiempos de difusión para cualquier molécula dada. Una aproximación del tiempo de difusión se muestra en la **Ecuación 5**.

#### **Ecuación 5**

$$t \approx \frac{x^2}{2D}$$

En la **Ecuación 5**,  $x$  es la distancia recorrida por una molécula de soluto a lo largo de un eje después de un tiempo  $t$  y  $D$  es el coeficiente de difusión del soluto. De la **Ecuación 5** se deduce que  $t \propto x^2$ . Como las dimensiones del sistema se reducen, el tiempo en el que las moléculas se difunden por el sistema es menor. Por lo tanto, los tiempos de difusión son más rápidos en los dispositivos de microfluídica.

Los sistemas microfluídicos de cultivo de células se perfunden constantemente con medio de cultivo. La perfusión constante de los dispositivos microfluídicos de cultivo asegura que los nutrientes se suministren continuamente y se eliminen los productos de desecho. Sin embargo, la perfusión constante en los dispositivos de microfluídica significa que las moléculas de señalización, secretadas por las células, probablemente se eliminen, lo que interrumpe una posible señalización autócrina o parácrina. Adicionalmente, el tamaño de los sistemas logra un consumo menor de reactivos que los dispositivos convencionales, esta propiedad los hace candidatos ideales cuando el costo de los reactivos es un limitante.

## **1.2. Fenómenos físicos a microescala (Número de Reynolds y Número de Péclet)**

A macroescala los fluidos se mezclan por convección, consecuentemente, la inercia domina el comportamiento del fluido, mientras que a microescala, cuando dos fluidos viajan juntos por un microcanal, fluyen paralelamente y la única mezcla que ocurre es el resultado de la difusión de moléculas a lo largo de la interface entre los fluidos (Whitesides, 2006). La física de los fluidos está dominada por la relación entre las fuerzas de inercia y viscosidad. El número de Reynolds ( $Re$ ) de flujo de un fluido, describe esta relación y es una cantidad adimensional

utilizada para caracterizar el comportamiento de los fluidos dentro de los canales microfluídicos (**Ecuación 6**).  $Re$  se utiliza para estimar cuantitativamente la tendencia de un fluido a desarrollar turbulencia. Al reducir la escala, el efecto de la fuerza viscosa llega a ser dominante en la microfluídica a diferencia de lo que ocurre en la macroescala donde la fuerza inercial domina el comportamiento del flujo. Por lo tanto, el tipo de transporte de masa que domina a microescala corresponde a la difusión (Mousavi Shaegh *et al.*, 2019).

#### Ecuación 6

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu}$$

En la **Ecuación 6**,  $\rho$  es la densidad del fluido,  $v$  es la velocidad,  $L$  es la dimensión lineal del sistema y  $\mu$  es la viscosidad dinámica. De la **Ecuación 6**, se calcula un  $Re$  menor a 2000 cuando las dimensiones se reducen, por lo tanto, el régimen que gobierna el flujo es laminar, suave y predecible. Debido al pequeño tamaño de los microcanales, el flujo en un canal microfluídico es casi siempre laminar (Beebe *et al.*, 2002). Esto puede ser ventajoso en algunas aplicaciones de biología celular. Consecuentemente, el transporte molecular en régimen laminar difiere del turbulento ya que no existe mezclado por convección. Adicionalmente el número de Péclet ( $Pe$ ) proporciona información sobre el mecanismo de transporte de masa dominante de un fluido, la difusión o la convección (**Ecuación 7**).

#### Ecuación 7

$$Pe = \frac{vL}{D}$$

En la **Ecuación 7**,  $D$  es el coeficiente de difusión y  $Pe$  describe la relación entre el transporte por advección y difusión de moléculas en el fluido. En situaciones donde la velocidad ( $v$ ) es alta, el transporte convectivo dominará. Por el contrario, cuando la longitud ( $L$ ) del microcanal es corta, la difusión dominará. En un sistema de cultivo celular microfluídico, el número de Péclet también proporciona una estimación de la rapidez con que los nutrientes se reponen por el flujo en comparación con la cantidad que se difunde (Young and Beebe, 2010).

Para mantener cultivos celulares, es importante sostener un transporte de masa favorable. Cuando el transporte convectivo es demasiado lento, la tasa de reposición de nutrientes es más lenta que la tasa de consumo de nutrientes por las células y con el tiempo las células morirán. Por el contrario, cuando el transporte convectivo es demasiado rápido, los factores secretados por las células serán eliminados. De manera similar, cuando la distancia de difusión es demasiado grande, se genera un gradiente de concentración basado en la ubicación de la célula. Mientras que cuando la distancia de difusión es muy corta, ajustar suficientes células en el espacio limitado se convierte en un desafío (Lee *et al.*, 2011).

### **1.3. Materiales de fabricación de los dispositivos de microfluídica**

Los dispositivos de microfluídica han sido fabricados en materiales como vidrio, silicona, policarbonato, polimetilmetacrilato (PMMA), placas de circuitos impresos, papel y polidimetilsiloxano (PDMS) (Ai *et al.*, 2020). La selección del material depende de la compatibilidad química, temperatura y presión, así como también de la factibilidad de fabricación e integración (Jensen, 2011). Alternativamente a los primeros dispositivos de microfluídica de vidrio, hoy en día los polímeros se han convertido en la opción popular que ofrece una amplia gama de propiedades químicas y mecánicas, así como una mejor biocompatibilidad (Brown *et al.*, 2006; Bhagat *et al.*, 2007; Saggiomo and Velders, 2015; Xu *et al.*, 2015). Uno de los polímeros empleado comúnmente para construir estos dispositivos es el elastómero de silicona, PDMS (**Figura 3**). George Whitesides y su grupo fueron los pioneros en usarlo (McDonald *et al.*, 2000). El PDMS ofrece resistencia química y es biocompatible, posee la capacidad de replicar estructuras cuyo tamaño está a nanoescala, tiene un precio económico (Friend and Yeo, 2010), posee alta permeabilidad al O<sub>2</sub> y al CO<sub>2</sub>, lo que lo hace ideal para cultivo de células. Además, es transparente lo cual permite realizar observaciones morfológicas directas bajo el microscopio, visualizar y cuantificar eventos en tiempo real, lo que les confiere a los dispositivos la capacidad para ser una herramienta de diagnóstico (Ai *et al.*, 2020). Los dispositivos de PDMS son de fácil fabricación y permiten una amplia gama de aplicaciones (Bubendorfer *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Molécula de polidimetilsiloxano (PDMS), fórmula química del polímero de silicona.

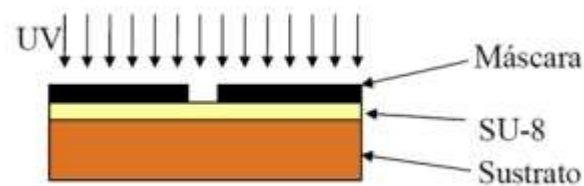
## 1.4. Fabricación de los dispositivos de microfluídica de PDMS

### 1.4.1. Litografía suave y fotolitografía (Fotoresina SU-8)

Existen diferentes técnicas para producir dispositivos como micromecanizado, litografía y abrasión láser (Beebe *et al.*, 2002). Los dispositivos de PDMS se fabrican principalmente a través de la tecnología de litografía suave, que es el proceso tradicional estándar para la producción a baja escala (Duffy *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2015),

Los moldes a partir de los cuales el PDMS replicará las estructuras, se fabrican mediante una máscara y una fuente lumínica para transferir el patrón a una resina negativa fotosensible. La fotoresina comúnmente más utilizada para este propósito es SU-8 desarrollada por IBM, la cual tomará la forma de la máscara (Jo *et al.*, 2000). El hecho de ser biocompatible y con buena resistencia química y mecánica hacen de él una buena elección para la realización de estructuras microfluídicas. SU-8 es una resina negativa fotosensible a la radiación ultravioleta (~365 nm) (**Figura 4**). Según la resolución requerida, la máscara se imprime a través de láser sobre una transparencia (resolución: 1200 dpi/250  $\mu\text{m}$ ), sobre una película delgada de polímero transparente para lograr una resolución más alta (10000 dpi/30  $\mu\text{m}$ ) y sobre cromo depositado en cuarzo para conseguir una fotomáscara de alta resolución (420000 dpi/600 nm). Esta técnica permite la creación de microestructuras con alta resolución (~1  $\mu\text{m}$ ) (Desai *et al.*, 2009). Sin

embargo, las máscaras de más alta resolución son varios órdenes de magnitud más costosas y este factor limita el tamaño del dispositivo a alrededor de 100 mm sobre un portaobjetos (Friend and Yeo, 2010). Esta técnica tiene varias desventajas significativas: los moldes normalmente usan obleas de silicio como sustratos, que son frágiles, su tamaño es limitado (normalmente no más de 4 o 6 pulgadas) y la fotoresina es propensa a la delaminación (Desai *et al.*, 2009). Además, la fabricación de moldes SU-8 requiere instalaciones de salas limpias (cleanrooms), que no están disponibles en todos los países, lo que limita su uso sólo a laboratorios que tienen acceso a equipos costosos para generar la máscara y realizar los procesos litográficos (Bourguignon *et al.*, 2018).



**Figura 4: Fotolitografía.** SU-8 es una resina negativa fotosensible a la radiación ultravioleta. La exposición consiste en iluminar la fotoresina con rayos ultravioleta utilizando una máscara para definir qué parte de la deposición se quiere polimerizar. Se expone la radiación ultravioleta sobre la máscara, con la resina SU-8 en el medio, dejando el sustrato por la cara opuesta.

El aumento de las aplicaciones de los dispositivos microfluídicos en varios campos de investigación brinda la oportunidad de desarrollar nuevas metodologías de bajo costo y alta factibilidad para la fabricación de dispositivos de PDMS. La literatura informa sobre muchas técnicas de fabricación alternativas que no requieren litografía, sin embargo, la mayoría de estas técnicas no logran la resolución de las fotoresinas o los procesos son costosos. Por este motivo la búsqueda de alternativas para fabricar dispositivos de microfluídica de forma accesible es uno de los aspectos en los que se enfoca la utilización de la tecnología flexográfica con el fotopolímero Flexcel (Novaković *et al.*, 2010) como alternativa a la resina SU-8.



### 1.4.2. Tecnología flexográfica

La metodología del uso de la tecnología flexográfica es un proceso simple y accesible para la fabricación de dispositivos de PDMS utilizando un molde maestro flexográfico de fotopolímero (Fmold) de plancha de impresión con deposición de SiO<sub>2</sub>. La capa de SiO<sub>2</sub> depositada sobre el Fmold, por deposición química de vapor (DQV) evita la adherencia indeseada entre el PDMS y el molde. El desempeño de los dispositivos fabricados mediante Flexcel ha sido desarrollado y caracterizado previamente y fue probado con la elaboración de microgotas (Bourguignon *et al.*, 2018). La técnica de flexografía es un proceso de impresión ampliamente extendido que se ha utilizado en varios sustratos como paquetes de alimentos, periódicos, papel de regalo, papel tapiz, catálogos, entre otros (Novaković *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016). Se puede obtener una variedad de patrones con resolución micrométrica y grosor uniforme. Las mejoras logradas con esta técnica han llevado a dispositivos de alto rendimiento y diseño complejo con una amplia variedad de aplicaciones en diferentes campos (Lars Rene *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2016).

El fotopolímero Flexcel permite la fabricación de moldes microfluídicos maestros con dimensiones de hasta 1270 × 2062 mm<sup>2</sup>, alturas de estructura entre 53 y 1500 μm, dimensiones precisas y una reproducción de un punto mínimo de 10 μm. Pueden alcanzar un tamaño mínimo de estructura de 25 μm, lo que permite la integración de múltiples funciones de laboratorio y sistemas de detección en una sola capa. La fidelidad de reproducción, la estabilidad y la durabilidad del Fmold se probaron produciendo hasta 50 réplicas de PDMS y las características morfológicas de la superficie de las réplicas del Fmold y del PDMS se conservaron (Bourguignon *et al.*, 2018). El Fmold ofrece una buena alternativa a los métodos convencionales de fabricación de dispositivos microfluídicos de fotoresina sobre obleas de silicio.

Los moldes flexográficos tienen muchas ventajas sobre otros métodos, las principales ventajas son: (i) la fabricación del molde a corto plazo, (ii) no posee delaminación, ya que el molde y las estructuras diseñadas componen una pieza única debido a que las estructuras del molde de fotopolímero están ausentes, (iii) bajos costos de desarrollo, (iv) podrían fabricarse múltiples moldes con una variedad de dimensiones (altura, ancho, largo), (v) se puede usar varias veces con la adquisición de réplicas de alto rendimiento, (vi) pueden realizarse canales con un ancho mínimo de 10 μm y (vii) poseen baja rugosidad superficial de las estructuras (Bourguignon *et al.*, 2018). Otra ventaja de esta tecnología es que los Fmolds se pueden obtener

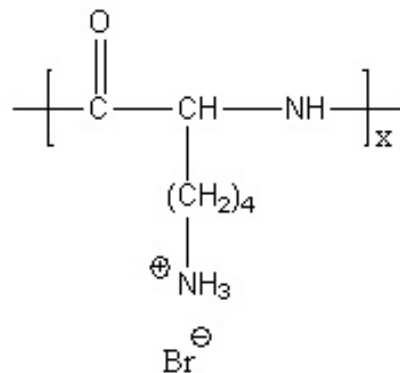
comercialmente a un costo mucho menor que los moldes SU-8. Además, dado que la tecnología Flexcel se usa comúnmente en la industria gráfica, los Fmolds se pueden adquirir en todo el mundo.

A pesar de todas las ventajas mencionadas de los Fmolds, su vida útil se limita al desprendimiento de la capa de SiO<sub>2</sub> causada por el proceso de replicación. Además, para la fabricación de Fmolds es necesario un equipo de DQV. En el trabajo de Olmos y col. (Olmos *et al.*, 2019), desarrollaron una metodología alternativa para fabricar dispositivos de PDMS, que combina la técnica Fmold con el método del molde de resina epoxi reutilizable (ERMold).

La nueva metodología ofrece moldes duraderos y no requiere la deposición de SiO<sub>2</sub> y, por lo tanto, su durabilidad es mucho mayor. Además, la metodología de fabricación de ERMold no requiere equipo DQV, por lo tanto, este molde puede usarse ampliamente en cualquier laboratorio sin comprar equipos costosos. La resina epoxi comercial genera moldes maestros rígidos que se pueden usar varias veces para obtener réplicas de PDMS con cambios mínimos en las dimensiones, con transferencia de características de alta precisión del ERMold al PDMS. La geometría del microcanal no cambia en los múltiples pasos de moldeo. Las dimensiones del canal (ancho, alto, profundidad) varían menos del 10% para todo el rango, lo que demuestra que el dispositivo de PDMS se puede replicar con alta fidelidad. El ERMold puede emplearse varias veces para obtener réplicas de PDMS y es más duradero que el FMold (Olmos *et al.*, 2019). Por otro lado, la precisión es comparable a las tolerancias fotolitográficas típicas (10%) (Desai *et al.*, 2009). Las ventajas de esta metodología son: (i) no se necesitan cleanrooms, (ii) es de bajo costo, (iii) se pueden reutilizar los moldes que además, poseen alta durabilidad, (iv) se obtiene alta producción en masa de la réplica del ERMold y de PDMS con de alta precisión de replicación, (v) el ERMold es un molde monolítico, por lo tanto, la delaminación y el sustrato no son un factor limitante, (vi) la fabricación de estructuras heterogéneas que tienen diferentes dimensiones permiten la fabricación de dispositivos que puede usarse en muchas aplicaciones, siendo fácil de implementar como alternativa a los enfoques litográficos blandos convencionales. Todo lo anterior hace que esta metodología sea una herramienta ideal para la fabricación de dispositivos microfluídicos diseñados para diferentes propósitos y con dimensiones de microcanal relevantes para una amplia gama de aplicaciones microfluídicas (Olmos *et al.*, 2019).

## 1.5. Recubrimientos para los microcanales de los dispositivos microfluídicos

Los dispositivos de PDMS ofrecen superficies que pueden modificarse a través de oligopéptidos, polisacáridos, adsorción de proteínas o mediante procesamiento de plasma de oxígeno de alta frecuencia por deposición química de vapor potenciado por plasma (DQV-PP) para obtener características superficiales específicas. Imitar la matriz extracelular es un desafío que se ha abordado texturizando microcanales con fibronectina (Garza-García *et al.*, 2013; Garza-García *et al.*, 2014) y colágeno (Leclerc *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2012) para lograr una mejor unión de las células a la superficie. El recubrimiento con poli-D-lisina (hidrobromuro de) (**Figura 5**), aumenta el número de sitios con carga positiva en la superficie del dispositivo, lo que mejora las interacciones electrostáticas con los grupos con carga negativa en la superficie celular, por lo tanto, mejora la adsorción mientras preserva la actividad biológica (Peñaherrera *et al.*, 2016). La utilidad de la poli-D-lisina como molécula de adhesión celular en dispositivos microfluídicos se ha confirmado en materiales como PDMS (Peñaherrera *et al.*, 2016).



**Figura 5:** El hidrobromuro de poli-D-lisina es un poliaminoácido sintético con un peso molecular superior a 30.000 Da, cargado positivamente que tiene un HBr por unidad de lisina. Es un sólido cristalino soluble en agua y se usa ampliamente como recubrimiento para mejorar la adhesión celular a las superficies de vidrio y plástico. Este polication es resistente a la degradación enzimática y se ha utilizado para cultivar una amplia variedad de tipos celulares.

## **1.6. Aplicaciones de los dispositivos microfluídicos**

La microfluídica proporciona plataformas prometedoras para aplicaciones del tipo lab-on-a-chip (LOC) y permite la miniaturización de operaciones básicas convencionales de laboratorio biológico o químico. La tecnología de laboratorio en un dispositivo microfluídico ha sido bien aceptada por las comunidades de investigación biológica y médica como una herramienta prometedora para diseñar microambientes a nivel molecular, celular y tisular (Xu *et al.*, 2013).

A principios de la década de los 90, se desarrollaron los primeros dispositivos microfluídicos para aplicaciones bioquímicas y desde entonces el campo se ha expandido rápidamente (Brown *et al.*, 2006; Lerner *et al.*, 2013). Dentro de los dispositivos de microfluídica (Koch *et al.*, 2000; Tabeling, 2005), los microsistemas analíticos se conciben para integrar varias operaciones de laboratorio como: inyección de muestras y reactivos, mezclado, incubación, reacción, separación, detección, aislamiento, etc. Estos microsistemas se identifican como LOC (Erickson and Li, 2004; Lion *et al.*, 2004; Walt, 2005; Chin *et al.*, 2006; Dittrich *et al.*, 2006; Whitesides, 2006) y básicamente consisten en una red de microcanales que incorpora diferentes secciones, cámaras, columnas y reservorios. Todos los componentes se integran en una placa de vidrio o material polimérico, con el formato de un porta-objetos de laboratorio o un disco compacto. El flujo a través de los microcanales se establece aplicando presión o campos eléctricos. Con el auge de la nanotecnología y en el propósito de integrar todos los ensayos rutinarios de biología molecular en un solo dispositivo (Thorsen *et al.*, 2002; Haeberle and Zengerle, 2007), se comenzaron a utilizar nuevos materiales, como el PDMS para la fabricación de los dispositivos (Duffy *et al.*, 1998).

## **2. Métodos de cultivo celular**

### **2.1. Método convencional de cultivo celular adherente**

El cultivo celular es una técnica biológica fundamental para varias investigaciones como el estudio de la química (Samavedi *et al.*, 2013) y fisiología (Metallo and Vander Heiden, 2013) de las células y su respuesta a diferentes sustancias (Ko and Gelb, 2014). En las prácticas convencionales de cultivo celular, las células aisladas se cultivan en monocapa bidimensional en recipientes como placas, botellas o microplacas de distinto número de pocillos (normalmente hechos de poliestireno) con una composición de medio optimizada y se mantienen dentro de una incubadora con las condiciones adecuadas de temperatura, CO<sub>2</sub> y humedad.

Para mantener la función celular y permitir la división y proliferación celular, el medio de cultivo se complementa universalmente con suero fetal bovino (SFB), una mezcla que contiene factores de crecimiento entre sus componentes (Eagle, 1955). El SFB se constituyó como un suplemento estándar del medio de cultivo celular a una concentración del 5% al 20%, que se obtiene fácilmente y contiene una alta concentración de factores de crecimiento y una baja concentración de gammaglobulinas, en comparación con otros sueros de origen animal (van der Valk *et al.*, 2004). Durante el transcurso del cultivo, el medio se provee manualmente y se reemplaza regularmente, no es un suministro constante de nutrientes. Aunque esta operación está estandarizada y se utiliza ampliamente en la actualidad, restringe el rendimiento, limita la recapitulación del microambiente fisiológico (Huber *et al.*, 2018) y la posibilidad de automatización (Mousavi Shaegh *et al.*, 2019). El volumen de medio de cultivo es muy alto en comparación con el volumen celular. El alto volumen de cultivo da como resultado una mayor dilución de las moléculas de señalización secretadas en comparación con las condiciones *in vivo*, lo que puede afectar la respuesta celular de una manera diferente, por ejemplo, para algunas señales puede ser necesario un cierto umbral para inducir una respuesta celular. Los procedimientos que incluyen un alto volumen de cultivo celular, incubación y cambio periódico de medio o repique significan que las condiciones del cultivo, en general, cambian con el tiempo.

Aunque es simple y ampliamente utilizado, el cultivo celular *in vitro* difiere significativamente de las condiciones *in vivo* con respecto a muchos parámetros que deben tenerse en cuenta al interpretar los datos. Esta inadecuación de los métodos actuales de cultivo celular *in vitro* ha sido el principal motivador para el desarrollo de más métodos *in vivo* dentro de la comunidad de investigación de microfluídos.

## 2.2. Cultivo celular en dispositivos de microfluídica

El desarrollo de la microfluídica provee las capacidades para estudiar poblaciones menores de células y crear ambientes miniaturizados para su cultivo, lo que facilita el rastreo de las células y la simulación dinámica. Este nivel de control ha permitido a los investigadores desarrollar plataformas para el cultivo de tejidos. A diferencia de los enfoques estáticos convencionales, los cultivos celulares basados en microfluídica no solo pueden mantener condiciones de cultivo celular bien definidos, sino lo que es más importante, permiten proporcionar continuamente a las células medios frescos que contienen O<sub>2</sub> y nutrientes al tiempo que eliminan los productos metabólicos a un flujo controlado (Leclerc *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2013; Mäki *et al.*, 2015).

En cuanto a las células adherentes, el control hidrodinámico del microambiente afecta no solo a la tasa de la entrega de nutrientes y el reabastecimiento, también define la tasa de dispersión de moléculas extracelulares así como también del estrés mecánico como la fuerza de corte sobre las células adheridas a la pared de un dispositivo (Huber *et al.*, 2018). Además, los volúmenes pequeños de los microcanales aumentan la concentración de las proteínas secretadas (Lecault *et al.*, 2012). Cuando las células se introducen en un canal de un dispositivo de microfluídica, presentan forma redondeada, éstas sedimentan, se adhieren a la superficie del canal mediante atracción electrostática o mediante proteínas sobre la superficie del microcanal a través de integrinas (Albelda and Buck, 1990). Una vez que las células se han adherido, éstas se aplanan y secretan proteínas de la matriz extracelular y comienzan a proliferar. La adherencia celular es importante para dar inicio a la liberación de señales que regulan la diferenciación, el ciclo celular, la migración y la supervivencia celular (Huang and Ingber, 1999).

El flujo del fluido en los microcanales produce una tensión de corte sobre las células, que compite con las fuerzas de adherencia entre las células y su sustrato (Zhu *et al.*, 2015). Los flujos hemodinámicos presentan una tensión de corte elevado (>1 Pa), esta tensión de corte induce una respuesta de estrés en las células adherentes, que puede conducir a la alteración de las propiedades de adherencia de las células, por lo que presentan forma redondeada, separación de la superficie y cambios en la expresión de proteínas de adherencia. La reconfiguración del citoesqueleto podría provocar apoptosis de la célula en determinados escenarios (DeMeester *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2018). Mientras que a una baja tensión de corte (<1 Pa) como en el intersticial, flujo extravascular en el cuerpo, las fuerzas hidrodinámicas

constituyen una señal mecanotáctica que puede conducir al movimiento de una célula y afectar su diferenciación (Huber *et al.*, 2018). El impacto de la tensión de corte en las células, varía según el tipo celular (Kim *et al.*, 2007), pero hasta 0,65 Pa no tiene impacto biológico en la mayoría de las células. En los dispositivos de cultivo a una velocidad de flujo de 500 nl/min, la tensión de corte se estima en  $10^{-4}$  Pa (**Ecuación 2**), varios órdenes de magnitud por debajo de los observados para efectuar tensión de corte en las células. Por lo tanto, a esa velocidad de flujo no se espera que la tensión de corte tenga ningún efecto sobre el comportamiento celular.

Con respecto a las células en suspensión en microescala, las fuerzas hidrodinámicas controlan la trayectoria celular y han sido ampliamente utilizadas en estudios celulares (Huber *et al.*, 2018). El establecimiento de modelos tridimensionales biofabricados representa un gran interés para descifrar las complejas interacciones celulares (Schmidt *et al.*, 2019). Los dispositivos de microfluídica también se han propuesto para fabricar cámaras de distinta profundidad del canal donde pueden almacenarse células no adherentes (Olmos Carreño *et al.*, 2020).

Los dispositivos microfluídicos se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones con células, incluido el monitoreo de la actividad celular (Leclerc *et al.*, 2003), los ensayos basados en células para evaluar la sensibilidad a los medicamentos (Xu *et al.*, 2013), se han utilizado también para realizar estudios de citotoxicidad (Ziolkowska *et al.*, 2010), para el cultivo de células procariotas y eucariotas, como las células de levadura y de mamífero, para producir proteínas recombinantes como anticuerpos monoclonales en microbioreactores (Garza-García *et al.*, 2013; Garza-García *et al.*, 2014; Mozdierz *et al.*, 2015; Ladner *et al.*, 2017) e incluso para síntesis de proteínas libres de células (Timm *et al.*, 2015). Se han reportado también dispositivos de microfluídica para el cultivo de células de mamífero en nanogotas (Barbulovic-Nad *et al.*, 2010), microrreactores con control de O<sub>2</sub> (Abaci *et al.*, 2012) y dispositivos que permiten modelar el ambiente *in vivo* en diferentes organizaciones a nivel celular (Ziółkowska *et al.*, 2011), para el enriquecimiento de células madre y para el uso de sistemas de co-cultivo para controlar las interacciones tumor-estroma en un dispositivo de microfluídica (Menon *et al.*, 2015), entre otras aplicaciones. Además, la microfluídica ha convergido con la ingeniería de tejidos para dar lugar a la tecnología órgano en chip (Organ-on-chip) para ofrecer soluciones efectivas a problemas persistentes en el desarrollo de medicamentos y tratamiento personalizado de enfermedades (Bhatia and Ingber, 2014; Mastrangeli *et al.*, 2019). Los métodos de microfabricación han permitido organizar canales de microfluídica inspirados en situaciones *in vivo* dentro de dispositivos. Esta tecnología ha logrado que la comunidad de los biomateriales y

la de la ingeniería de tejidos dirijan sus esfuerzos hacia la plataforma Organ-on-chip (Bhatia and Ingber, 2014).

El cultivo de células en dispositivos microfluídicos se ha aplicado para comprender mejor los fenómenos relacionados con los bioprocesos, analizar la heterogeneidad celular durante el crecimiento de la población celular e identificar células que detienen su proliferación y las células altamente proliferantes (Peñaherrera *et al.*, 2016; Ladner *et al.*, 2017). Además, el uso de dispositivos microfluídicos para la expresión de proteínas recombinantes destinadas al uso terapéutico, proporciona varias ventajas, incluyendo un tiempo de respuesta más corto, una relación superficie/volumen alta, un microambiente más homogéneo y controlable, reducción de volúmenes de muestra, bajos requisitos de potencia y costo de fabricación para la optimización del proceso (Jang *et al.*, 2015). Además, los dispositivos microfluídicos han demostrado un aumento de la productividad volumétrica para las moléculas sintéticas, con un entorno más controlado y un tiempo de permanencia corto del producto en el dispositivo, minimizando el impacto de los productos químicos no deseados o las modificaciones enzimáticas durante el proceso (Haswell *et al.*, 2001). En resumen, éstos dispositivos como métodos de cultivo celular tienen varias ventajas, como rentabilidad, reproducibilidad, requisitos de bajo volumen, visualización simple y precisa, velocidad de prueba y versatilidad de diseños y portabilidad (Karadimitriou and Hassanizadeh, 2012).

Adicionalmente, debido a la gran cantidad de datos que resultan de los dispositivos de microfluídica, es necesario desarrollar herramientas que permitan el análisis de imágenes con potentes procesadores y algoritmos. Esta combinación de análisis y computación avanzados de imágenes ha ayudado a observar fenómenos dinámicos y cuantificar los procesos involucrados. Por lo tanto, el análisis de imágenes es un objetivo primordial dentro de la biología y requiere paquetes de software intuitivos que faciliten el procesamiento de imágenes y con los que se obtenga la mayor cantidad posible de datos de forma rápida (Arena *et al.*, 2017). Hay varias herramientas analíticas en el mercado para esto, sin embargo, muchas de ellas a pesar de ser útiles para el procesamiento de imágenes de fluorescencia y contraste de fase, no brindan buenos resultados a partir de imágenes de microscopía óptica de transmisión. Este problema se debe a la variación intrínseca de la técnica de adquisición en sí y a la variabilidad introducida entre la adquisición de imágenes por parte de los operadores y por el equipo (Buggenthin *et al.*, 2013).



### 3. Anticuerpos

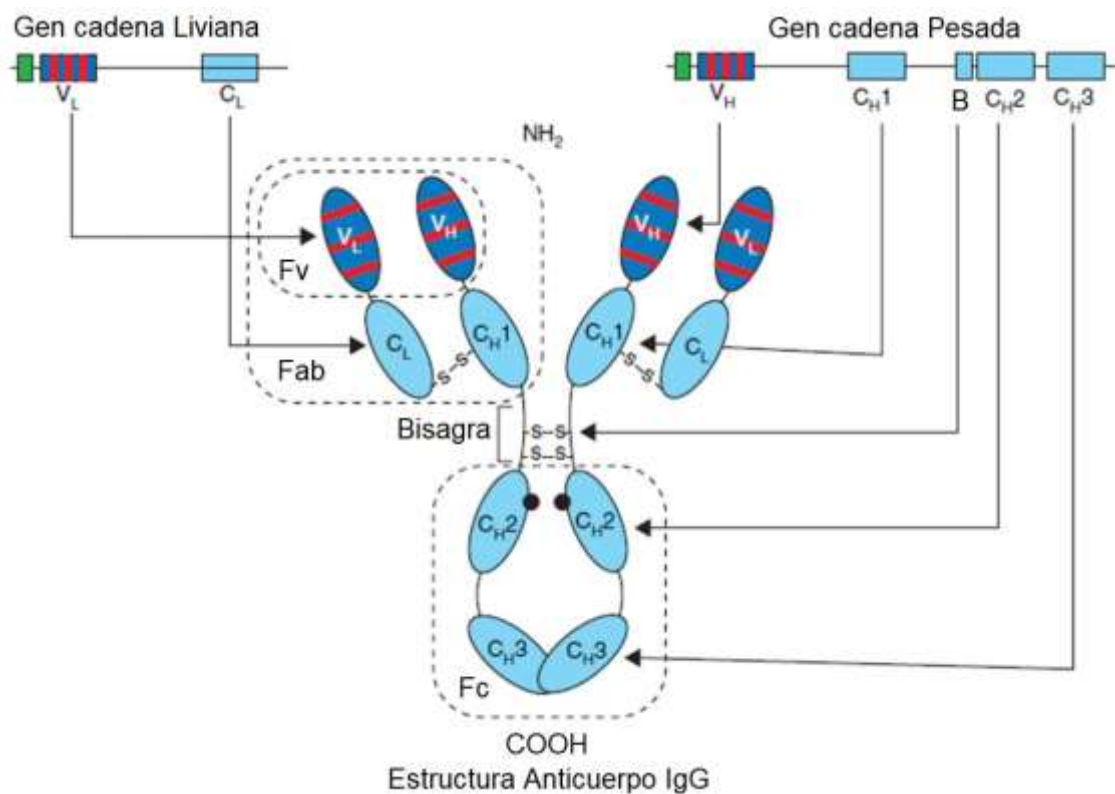
Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son glucoproteínas complejas producidas por las células B contra sustancias extrañas como parte de la respuesta inmune adaptativa, con varias propiedades que los hace un componente crítico del sistema inmunitario (Helguera *et al.*, 2010). Su propiedad más notable es que exhiben alta afinidad y especificidad para una amplia gama de diferentes moléculas conocidas como antígenos. Además, los anticuerpos tienen la capacidad de activar e interactuar con el sistema inmune efector del huésped.

#### 3.1. Estructura básica de los anticuerpos

La estructura básica de un anticuerpo consta de dos polipéptidos de cadena liviana idénticos y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos, unidos entre sí por enlaces disulfuro. Las cadenas pesada (H) y liviana (L) están codificadas por genes separados y se organizan en dominios globulares discretos separados por segmentos peptídicos cortos (**Figura 6**). Su estructura general exhibe dominios de globulina discretos que dan como resultado una proteína en forma de "Y" que consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas unidas entre sí por enlaces disulfuro (**Figura 6**). Cada cadena liviana consta de un dominio variable ( $V_L$ ) y un único dominio constante ( $C_L$ :  $\kappa$  o  $\lambda$ ), mientras que la cadena pesada abarca un dominio variable ( $V_H$ ) y tres dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ) (Ortiz-Sánchez *et al.*, 2008).

En las dos ramas superiores de la "Y" están los fragmentos de unión al antígeno (dominios Fab), que están formados por el dominio variable de las cadenas pesadas ( $V_H$ ) y livianas ( $V_L$ ) (Payés *et al.*, 2015). El sitio de unión del anticuerpo al antígeno se debe principalmente a tres regiones determinantes complementarias (CDR) de la región variable ( $F_v$ ) localizadas en el extremo amino y su diversidad está dada por su alta variabilidad de secuencia de aminoácidos que permite el ajuste fino de la unión del anticuerpo al epítipo. El tallo de la "Y" es el fragmento cristalizante (región  $F_c$ ) del anticuerpo vinculado a través de una bisagra al Fab y está localizado en el extremo carboxilo (**Figura 6**) (Alt *et al.*, 1987; Janeway *et al.*, 2005;

Helguera *et al.*, 2010). Formada por cadenas pesadas, la región Fc define el isotipo del anticuerpo y juega un papel importante en las propiedades farmacocinéticas y en algunas funciones biológicas del anticuerpo, incluida la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y la transmisión en la placenta (Kim *et al.*, 2005; Schaedel and Reiter, 2006; Nimmerjahn and Ravetch, 2007). Además, la región Fc de la IgG se une al receptor de Fc neonatal (FcRn), también conocido como el "receptor de rescate" o receptor Brambell, que juega un papel crítico en extender la vida media del anticuerpo (Kuo and Aveson, 2011; Payés *et al.*, 2015).



**Figura 6: Representación esquemática de la estructura general de un anticuerpo IgG.** En la parte superior, el gen de IgG consiste en exones representados por cajas e intrones representados por la línea central. Los cuadros verdes indican el péptido señal (PS) que se requiere para la secreción de anticuerpos. Los marcos de CDR que codifican las regiones hipervariables se representan en líneas rojas anchas dentro de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras (cuadros en azul oscuro). Estas regiones hipervariables se localizan en las regiones variables (Fv), que consisten en (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>)<sub>2</sub> en el extremo amino terminal de la proteína. La región constante incluye los dominios C<sub>L</sub> (en la cadena liviana) y C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub> (en la cadena pesada). Las cadenas livianas y pesadas están unidas por un enlace disulfuro. Fab<sub>2</sub> y Fc están

unidos por la región de la bisagra que confiere flexibilidad a la molécula. La IgG humana tiene un sitio de glicosilación (círculo negro) en cada dominio  $C_H2$ . Adaptado de (Ortiz-Sánchez *et al.*, 2008).

La especificidad de un anticuerpo depende de la secuencia de la Fv. El número total de diferentes regiones variables disponibles en los seres humanos se estima que es al menos  $10^{11}$ . Sin embargo, el número real de especificidades de anticuerpos en un individuo (conocido como el repertorio de anticuerpos) está limitado al número total de células B y de la historia de la exposición a antígenos del individuo.

La extraordinaria variabilidad de la respuesta de anticuerpos es el resultado de procesos que incluyen la recombinación V(D)J y la hipermutación somática (SHM) (Tonegawa, 1983). La recombinación V(D)J es el proceso por el cual los segmentos génicos V, D y J se reordenan aleatoriamente, lo que lleva al desarrollo de una gran diversidad de regiones variables (Dudley *et al.*, 2005). Dentro de las regiones variables de la cadena pesada y liviana existen tres regiones hipervariables o CDRs que codifican el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. En los seres humanos y roedores, los CDR1 y CDR2 de ambas cadenas pesadas y livianas se forman a partir de las secuencias de segmentos de genes de la línea germinal variable (V). En contraste, el bucle de CDR3 se produce por la unión del segmento V con la unión (J) para el segmento de la cadena liviana, o con la diversidad (D) y unión (J) para los segmentos de la cadena pesada. Por lo tanto, la diversidad de la cadena pesada y liviana se amplifica aún más por el proceso de SHM que se produce dentro de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas. Estas mutaciones se producen principalmente por sustituciones de nucleótidos individuales, con adiciones de nucleótidos ocasionales y deleciones. La tasa de SHM en ratones y seres humanos es de aproximadamente  $10^{-5}$  a  $10^{-3}$  mutaciones por par de bases por generación, que es aproximadamente un millón de veces mayor que la tasa de mutación espontánea en la mayoría de los otros genes (Rajewsky *et al.*, 1987).

El resto de las cadenas pesadas y livianas tienen una estructura relativamente constante. La región constante de la cadena liviana, denominada región  $C_L$ , consta de un solo dominio. En contraste, la región constante de la cadena pesada ( $C_H$ ) se divide en dominios estructurales discretos estabilizados por enlaces disulfuro intracadena:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , y  $C_{H3}$  de IgG (**Figura 6**). La estructura de dominios de anticuerpos resulta muy atractiva para la ingeniería genética, ya que permite el intercambio de dominios funcionales con actividades de unión al antígeno (Fabs o Fvs) o funciones efectoras (Fc). Los anticuerpos son glicoproteínas y los hidratos de carbono

presentes en el dominio C<sub>H</sub>2 de IgG han demostrado ser esenciales para sus funciones efectoras (Radaev and Sun, 2001). La región bisagra, un segmento de la cadena pesada entre los dominios C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2 en las IgGs proporciona flexibilidad a la molécula.

### **3.2. Evolución de los anticuerpos monoclonales a medicamentos biológicos**

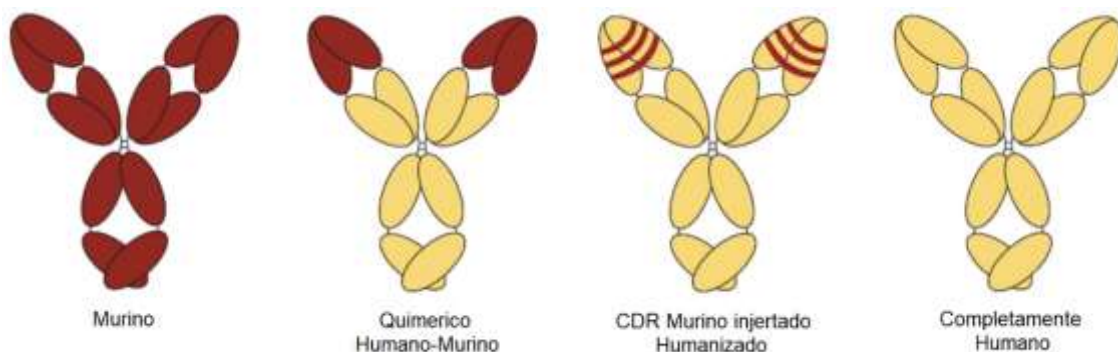
Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son el grupo más grande de proteínas recombinantes utilizadas para la terapia humana. En 1975, Köhler y Milstein (Kohler and Milstein, 1975), sentaron las bases para el éxito comercial de los anticuerpos, quienes desarrollaron el método para la inmortalización de los linfocitos B con el fin de producir mAbs murinos utilizados en la inmunoterapia contra el cáncer por la tecnología de hibridoma. Esto permitió la producción de mAbs con una especificidad deseada a partir de un clon único de células B. A diferencia de los anticuerpos policlonales, los mAbs son homogéneos, monoespecíficos y podrían producirse cantidades ilimitadas en el laboratorio (Kohler and Milstein, 1975; Yoo *et al.*, 2002; Penichet and Morrison, 2004). Estos mAbs murinos inducen efectos antitumorales al bloquear los receptores en la superficie de las células tumorales, neutralizar los ligandos solubles e inducir la apoptosis en las células cancerosas (Lubeck *et al.*, 1988; Dillman, 2001; Sharkey and Goldenberg, 2006). A pesar de los intentos similares de expresar otros productos con células inmortalizadas y diferenciadas, la industria farmacéutica reconoció el potencial de los mAbs como éxitos futuros. La razón fue que la tecnología de hibridoma fue publicado en Nature en 1975 y por lo tanto libre de derechos de propiedad intelectual (Kohler and Milstein, 1975). Como pueden dirigirse contra casi cualquier epítipo molecular, los mAbs se adoptaron tempranamente como herramienta de diagnóstico, pero pasó más de una década hasta la aprobación de Muromonab-CD3 (Orthoclone Okt3<sup>®</sup>), el primer mAb desarrollado con la tecnología de hibridoma comercializada para uso terapéutico (Group\*, 1985).

Sin embargo, como los anticuerpos de la tecnología de hibridoma solo tienen secuencias murinas, en pacientes humanos mostraron una función efectora limitada. Dado que las regiones Fc de estos mAbs murinos tienen una capacidad limitada para unirse a las células efectoras

humanas o al complemento humano (Carter, 2006; Helguera *et al.*, 2010). Por lo tanto, estos anticuerpos tienen un potencial terapéutico restringido (Lubeck *et al.*, 1988; Dillman, 2001).

La próxima generación de líneas celulares productoras de mAbs fue impulsada por los problemas de inestabilidad del hibridoma y dado que estos mAbs murinos son completamente de origen de ratón, son inmunogénicos e inducen una respuesta inmune de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) en pacientes (Penichet and Morrison, 2004) y tienen una vida media significativamente reducida (Khazaeli *et al.*, 1994). Esta respuesta da como resultado la neutralización y la rápida eliminación de los mAbs murinos, lo que limita aún más su eficacia antitumoral. Esta respuesta inmune HAMA también puede asociarse con reacciones alérgicas graves (Reilly *et al.*, 1995; Choy, 1998; Penichet and Morrison, 2004; Kim *et al.*, 2005). El progreso en las técnicas de biología molecular y la viabilidad de la ingeniería genética dirigida de células de mamíferos permitió la producción de mAbs por líneas celulares recombinantes para superar los problemas de células de hibridoma menos definidas. La expresión de anticuerpos en sistemas de mamíferos (como las líneas celulares de mieloma) promueve su correcta modificación postraduccional, lo que aumenta su actividad biológica en comparación con los mAbs producidos en sistemas de expresión no mamíferos (Winter and Milstein, 1991; Winter, 1998; Yoo *et al.*, 2002).

Por lo tanto, no fue sino hasta el desarrollo de mAbs recombinantes en los años 80 y 90 que comenzó una nueva era de terapia biológica. Para disminuir su inmunogenicidad y mejorar sus efectos anticancerígenos en pacientes, estos anticuerpos han evolucionado de anticuerpos murinos a quiméricos (Morrison *et al.*, 1984), humanizados (Jones *et al.*, 1986) y completamente humanos (McCafferty *et al.*, 1990). Cada paso implicó el reemplazo gradual de los segmentos murinos de la secuencia de anticuerpos por la secuencia humana correspondiente (**Figura 7**).



**Figura 7: Representación esquemática de evolución en ingeniería genética de un anticuerpo IgG.** Evolución de anticuerpos: murino (Bordó), quimérico con regiones variables murinas (bordó) y regiones constantes humanas (Amarillo), anticuerpos humanizados (CDR murinas; líneas bordó) y anticuerpos completamente humanos (Amarillo). Adaptado de (Ortiz-Sánchez *et al.*, 2008).

En los anticuerpos quiméricos se reemplazó la región constante murina con regiones de inmunoglobulina humana constante, para inhibir las respuestas HAMA en pacientes y solo las regiones variables son de ratón (**Figura 7**) (Morrison *et al.*, 1984; Penichet and Morrison, 2004; Kim *et al.*, 2005). Estos anticuerpos se construyen usando vectores de expresión que codifican las regiones constantes de los anticuerpos humanos, con la cadena pesada Ig variable de un mAb murino {mV<sub>H</sub>-h(C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3)}, más la cadena liviana variable del ratón con la cadena liviana constante humana (mV<sub>L</sub>-hC<sub>L</sub>) (Ortiz-Sánchez *et al.*, 2008). Debido a que estos anticuerpos contienen regiones Fc humanas, exhiben actividad biológica completa en humanos (Penichet and Morrison, 2004; Kim *et al.*, 2005). Un ejemplo de anticuerpo quimérico es el rituximab (Rituxan<sup>®</sup>, MabThera<sup>®</sup>), que está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del linfoma no Hodgkin. Rituximab reconoce el antígeno CD20 en la superficie de las células B malignas y es capaz de inducir ADCC, CDC y apoptosis de estas células cancerosas (Leget and Czuczman, 1998; Smith, 2003). A pesar del esfuerzo por reducir la inmunogenicidad, los pacientes tratados con anticuerpos quiméricos pueden desarrollar una respuesta de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA) a las regiones variables murinas (Penichet and Morrison, 2004; Kim *et al.*, 2005).

Para disminuir el componente de ratón de los anticuerpos quiméricos y reducir aún más su inmunogenicidad, se han desarrollado estrategias de humanización de anticuerpos injertando los dominios de unión a antígeno CDR murinos en el marco del dominio variable humano y la región constante también humana (**Figura 7**) (Jones *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 2005). Un ejemplo de anticuerpo humanizado es trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), que se dirige al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)/gen asociado al neuroblastoma (neu) y ha sido aprobado por la FDA como un tratamiento para el cáncer de mama (Baselga *et al.*, 2006). HER2/neu es un receptor que se sobre expresa en aproximadamente 20-30% de los cánceres humanos de mama y ovario y su sobreexpresión se asocia con un pronóstico desfavorable (Slamon *et al.*, 1989; Cooke *et al.*, 2001; Smith, 2001).

Se pueden producir anticuerpos completamente humanos para eliminar totalmente la inmunogenicidad de los anticuerpos (**Figura 7**). Para producir estos anticuerpos humanos, el

repertorio de inmunoglobulina murina ha sido reemplazado por genes humanos variables en el cromosoma murino de ratones transgénicos (Ortiz-Sánchez *et al.*, 2008). Sin embargo, el mejor método para generar un mAb humano aplicable es comenzar a partir de genes humanos originales. Esos pueden obtenerse de donantes cebados con antígeno, así como de bibliotecas inmunes que están disponibles comercialmente. En este caso, los derechos de propiedad intelectual deben cobrarse por el paquete tecnológico. La ingeniería adicional permitió su personalización, creando variantes en valencia, tamaño, funciones efectoras y con la conjugación de compuestos para el suministro a tipos de células específicas como las cancerígenas.

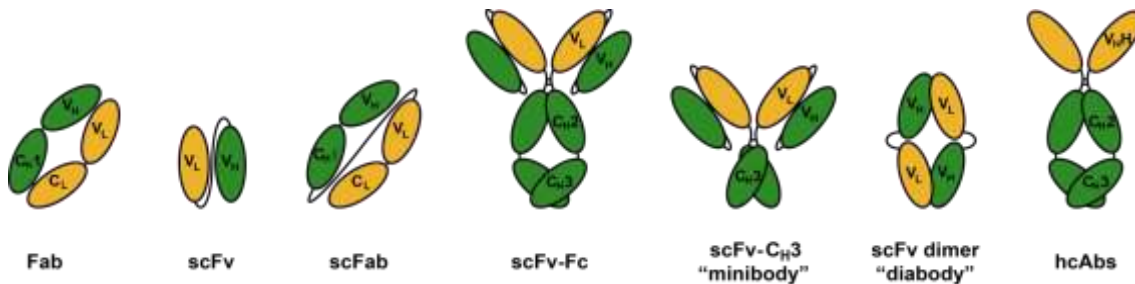
La tecnología de presentación de fagos es la que se utilizó para producir mAbs recombinantes completamente humanos por primera vez (McCafferty *et al.*, 1994; Penichet and Morrison, 2004; Kim *et al.*, 2005). La técnica de presentación de fagos consiste en genes humanos de región variable de cadena sencilla (scFv) clonados en un vector de presentación en fagos (Smith, 1985). Esta tecnología permite la detección de los fragmentos scFv expresados en la superficie del bacteriófago que se unen con alta afinidad al antígeno deseado. Los genes scFv seleccionados se clonan en vectores de expresión para desarrollar anticuerpos completamente humanos (Penichet and Morrison, 2004; Kim *et al.*, 2005).

### **3.3. Anticuerpos estructuralmente modificados (Fab, scFv, minicuerpos, monovalentes, bivalentes y multivalentes)**

El creciente número de dianas terapéuticas y los requisitos especiales para las diferentes intervenciones terapéuticas han favorecido la aparición de una amplia gama de configuraciones de anticuerpos, con propiedades más allá de los anticuerpos naturales, hechos a medida para aplicaciones específicas. La estructura de dominios de anticuerpos permite la generación de formatos alternativos, donde se han eliminado o reorganizado para alterar las propiedades biológicas de los diferentes dominios constantes.

Debido a la estructura de dominio de los anticuerpos, se pueden generar fragmentos tales como Fab, scFv y minicuerpos eliminando parte o la totalidad de la región constante del Fc. Un bloque de unión primario del anticuerpo es el fragmento Fab, que consiste en una cadena

liviana unida covalentemente mediante un enlace disulfuro a un segmento de la cadena pesada que incluye los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$  (**Figura 8**) (Beckman *et al.*, 2007; Wesolowski *et al.*, 2009).



**Figura 8: Representación esquemática de varios fragmentos de anticuerpos manipulados genéticamente.** Se muestran el tamaño relativo y las relaciones de dominio entre: Fab, Fv de cadena simple (scFv) que consiste en dominios  $V_L$  y  $V_H$  unidos por un conector peptídico, Fab de cadena sencilla (scFab), scFv-Fc consta de dos regiones scFv unidas a la región bisagra seguida por el dominio  $C_{H2}$ - $C_{H3}$ , un minibody (minicuerpo) consiste en dos dominios scFv unidos a dominios  $C_{H3}$  por la bisagra (scFv- $C_{H3}$ ), un dímero de di-scFv o diabody y fragmentos de cadena pesada (hcAbs). Adaptado de (Penichet and Morrison, 2004) y de (Wesolowski *et al.*, 2009).

Los fragmentos scFv constan de los dominios  $V_L$  y  $V_H$  fusionados genéticamente por un conector flexible peptídico, como  $(Gly_4-Ser)_3$  (Huston *et al.*, 1988; Power *et al.*, 2001) para estabilizar la estructura de unión adecuada en estas moléculas. El peso molecular de los scFv es mucho menor que la de anticuerpos intactos (**Figura 8**), 25-27 kDa en comparación con aproximadamente 146 kDa para IgG1 intacto y aún así pueden retener la especificidad y la afinidad del Fab de un anticuerpo de longitud completa. Sin embargo, los fragmentos que carecen de la región Fc o que contienen regiones Fc truncados no tienen funciones efectoras inmunes y son incapaces de unirse al receptor de rescate FcRn con la consiguiente reducción en la vida media (horas en comparación con 21 días para IgG1) (Kim *et al.*, 2005). Una limitación de los scFv en comparación con los anticuerpos de larga duración se vincula con su monovalencia contra el antígeno. Debido a la presencia de dos sitios de unión al antígeno, los anticuerpos intactos exhiben una mayor avidéz en comparación con scFv. Para abordar esta cuestión, se han producido dímeros de scFv denominados diacuerpos mediante la incorporación de un residuo de cisteína carboxi-terminal para formar un puente disulfuro, obteniéndose fragmentos  $(scFv)_2$  (**Figura 8**) (Albrecht *et al.*, 2004). Los anticuerpos intactos, como la IgG1 humana, tienen una



vida media de 3 a 4 semanas, mientras que el scFv tiene un aclaramiento sanguíneo de menos de 10 hs y excreción renal en 2 a 4 hs (Kim *et al.*, 2005; Albrecht and DeNardo, 2006). Estas características hacen que los fragmentos de anticuerpos sean útiles en aplicaciones de diagnóstico e imágenes tumorales (Holliger and Hudson, 2005; Wu and Senter, 2005).

Otra configuración con pequeño tamaño son los anticuerpos de cadena pesada (hcAbs) derivados de camélidos, que carecen de la cadena liviana y del dominio C<sub>H</sub>1, son bivalentes y se unen a su objetivo a través de dominios V<sub>HH</sub> (**Figura 8**) (Wesolowski *et al.*, 2009). La avidéz de los fragmentos de anticuerpos puede incrementarse aún más en el enfoque de diacuerpos por la disminución de la longitud del péptido conector entre dominios, que puede resultar en la formación de tria-cuerpos y tetra-cuerpos (Hudson and Kortt, 1999). Alternativamente, los dímeros de scFv se han construido utilizando un péptido conector muy corto para conectar las regiones variables del anticuerpo, lo que resulta en la formación de dímeros, en la que el V<sub>L</sub> de uno asocia con la V<sub>H</sub> de un segundo, mientras que el V<sub>L</sub> del segundo se asocia con el V<sub>H</sub> de la primera (**Figura 8**) (Perisic *et al.*, 1994). Estos dímeros no covalentes tienen un peso molecular similar a la de los fragmentos Fab de anticuerpos (55-60 kDa), pero contienen dos sitios de unión al antígeno y son capaces de unirse al antígeno de forma bivalente, lo cual presenta una mejora significativa *in vivo* en comparación con scFv estándar.

Los minicuerpos son fragmentos de anticuerpos alternativos que consisten en dos regiones scFv, una región bisagra fusionado a un dominio C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina (**Figura 8**) (Hu *et al.*, 1996; Holliger and Hudson, 2005; Albrecht and DeNardo, 2006). Estos fragmentos de anticuerpos más pequeños tienen una eliminación más rápida y una mejor penetración en el tejido/tumor.

El formato scFv-Fc consta de dos regiones scFv, una región bisagra y dominios C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 que le permiten reconocer específicamente el antígeno y también unirse a los receptores gamma Fc (FcγRs) (**Figura 8**) (Holliger and Hudson, 2005; Kim *et al.*, 2005; Albrecht and DeNardo, 2006).

La desventaja de todos estos fragmentos (con la excepción del fragmento scFv-Fc) es que, aunque retienen la capacidad de unión al antígeno, han perdido la capacidad de inducir funciones efectoras de Fc, incluido ADCC, que es un mecanismo antitumoral relevante de anticuerpos terapéuticos (Presta, 2003; Kim *et al.*, 2005).

### **3.4. Regulación de medicamentos biológicos y anticuerpos monoclonales terapéuticos en Argentina**

Argentina fue uno de los primeros en adoptar la tecnología del ADN recombinante y a finales de los 80 y principios de los 90, pequeñas empresas biofarmacéuticas locales comenzaron a producir bioterapéuticos recombinantes que eran copias de medicamentos biológicos (Gutman and Lavarello, 2011). Esta primera ola de bioterapéuticos, como la eritropoyetina (EpO) o la hormona del crecimiento humana recombinante (rhGH), consistía en homólogos de proteínas humanas con una función bien establecida que se usaban como terapia de apoyo o suplementaria. Los bioterapéuticos incluye a los mAbs terapéuticos, que están diseñados contra un objetivo molecular específico para generar una actividad no fisiológica para modificar el curso de una enfermedad, pero debido a sus múltiples interacciones, su mecanismo de acción generalmente es desconocido o no bien establecido (Schellekens *et al.*, 2015).

Con el objetivo de cumplir con los estándares internacionales, desde 2008 la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), es miembro del Esquema de Cooperación de Inspección Farmacéutica (PIC/S). Esta organización establece estándares en el desarrollo internacional, implementación y mantenimiento de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) armonizadas y sistemas de calidad de inspecciones de medicamentos. En 2009 ANMAT recibió su certificación como autoridad regional de referencia para garantizar la eficacia, seguridad y calidad de los medicamentos y biológicos recomendados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). ANMAT emitió una serie de normas para establecer requisitos específicos para la aprobación de productos biológicos, liberando en 2011 y 2012 la disposición N° 7075/2011 (ANMAT, 2011b), N° 70729/2011 (ANMAT, 2011a) y N° 3397/2012 (ANMAT, 2012). Esas disposiciones incorporan requisitos estrictos que deben cumplirse para aprobar medicamentos biológicos, de acuerdo con los estándares internacionales. ANMAT en la disposición N°3602/2018 (ANMAT, 2018) enuncia la “Guía de Buenas Prácticas de Manufactura para Fabricantes, Importadores/Exportadores de Medicamentos de Uso Humano”, posteriormente modificada por las disposiciones N°3287/2018 y 1281/2019, que establecen los estándares BPM que deben seguir diferentes productos, incluidos los medicamentos biológicos (Vogelius, 2019).

ANMAT estableció en la disposición N° 7075/2011 (ANMAT, 2011b) los requisitos para el registro de especialidades medicinales de origen biológico, incluyendo la documentación para la evaluación de su calidad, eficacia y seguridad. Además, requiere la implementación de un plan de gestión de riesgos para controlar el perfil de eficacia y seguridad del medicamento a lo largo de su ciclo de vida. Brinda una definición de biológicos, donde se incluyen los anticuerpos como Medicamentos de Origen Biológico: “Son productos obtenidos de organismos vivos o de sus tejidos. Incluyen virus, sueros terapéuticos, toxinas, antitoxinas, vacunas, sangre, componentes o derivados de la sangre, productos alergénicos, hormonas, factores estimulantes de colonias, citoquinas, anticuerpos, heparinas, entre otros. Las fuentes y métodos de producción incluyen, pero no se limitan al cultivo celular, microorganismos, extracción de tejidos o fluidos biológicos, técnicas de ADN recombinante, transgénesis, técnicas de hibridoma, propagación de microorganismos en embriones o animales, etc. Son productos utilizados para la prevención, tratamiento o diagnóstico in vivo de determinadas enfermedades.” Existe una definición más restringida para los medicamentos de origen biotecnológico: “Para los efectos de esta disposición, no se entiende por medicamento o especialidad medicinal de origen biotecnológico, todo producto cuyo ingrediente farmacéutico activo se obtenga mediante el uso de organismos vivos o células, tecnología de ADN recombinante y por técnicas de Hibridomas” (ANMAT, 2011b). Dado que los mAbs están cubiertos por ambas definiciones, se refiere a ellos como biológicos, que es el término de uso más general.

### **3.5. Producción de anticuerpos monoclonales recombinantes**

El sistema de producción dominante para mAbs es una expresión recombinante en sistemas celulares. No solo los costos del medicamento final son el parámetro más importante para la toma de decisiones para un sistema de producción, sino que también los procedimientos posteriores deben evaluarse cuidadosamente, ya que contribuyen significativamente a satisfacer todas las demandas regulatorias y la eficacia clínica. El costo del producto es una consecuencia del costo de los bienes y la capacidad disponible de la instalación de producción, que puede diferir para los sistemas de células individuales. Los procedimientos posteriores y los pasos de aseguramiento de la calidad del producto generan un impacto importante que causa

costos significativos incluso cuando se aplican tecnologías baratas con sistemas procariotas y eucariotas inferiores. El sistema de producción de células de ovario de hámster chino (CHO) es comparable con sistemas alternativos por la capacidad de producción y la calidad del producto (Kunert and Reinhart, 2016). Los sistemas de producción en desarrollo, a menudo durante décadas, son plantas y animales transgénicos, así como sistemas de traducción *in vitro*. Las dificultades que se encuentran en esos sistemas son a menudo títulos de producto insuficientes (animales transgénicos), patrones de glicosilación no deseados o actividad proteolítica (ambos principalmente previstos en plantas transgénicas), lo que hace que los procedimientos posteriores sean complicados e ineficientes. Además de la disponibilidad de estos sistemas de expresión, los anticuerpos para la aplicación en humanos se aíslan por fraccionamiento de plasma humano. La escala industrial de las instalaciones individuales está en el rango de varios miles de litros en operaciones por turnos. Las donaciones de plasma que contienen niveles elevados de anticuerpos clínicamente importantes se usan preferiblemente para la producción de productos de IgG hiperinmunes o específicos, como antihepatitis B, antitetánico, anticitomegalovirus o antirrábico (Robert and Hotchko, 2013). Esto significa que el individuo humano también representa una fábrica para la producción de anticuerpos comerciales y se aíslan y purifican grandes cantidades de una cohorte mundial de millones de donantes.

Los biofármacos representan oportunidades preventivas y terapéuticas para una gran cantidad de trastornos humanos. Por lo tanto, el estudio y el desarrollo de métodos innovadores para la producción rápida de proteínas recombinantes son esenciales (Zhu, 2012). De los sistemas de producción mencionados anteriormente, los biofármacos se producen principalmente en líneas celulares de mamíferos para garantizar la calidad de las modificaciones postraduccionales (Kim *et al.*, 2012). Las células CHO son las células huésped de mamíferos estándar para la fabricación industrial de proteínas terapéuticas, aunque otras células de mamífero como las células NS0 o SP2/0 también se han utilizado para producir bioterapéuticos (Jayapal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). Las principales ventajas de estas células son la viabilidad de la manipulación genética, la capacidad de crear patrones de glicosilación similares a los humanos y la capacidad para el crecimiento en altas densidades celulares en cultivo en suspensión sin suero. Por su parte, las células de riñón embrionario humano (HEK-293) también recibieron aprobación regulatoria para producción de proteínas recombinantes (Frenzel *et al.*, 2013; Walsh, 2014).

Desafortunadamente, el cultivo de células de mamíferos es muy caro y lento. En este sentido, se han desarrollado una variedad de vectores y estrategias de ingeniería genética para generar células de mamífero de alta producción (Hitoshi *et al.*, 1991; Sautter and Enenkel, 2005;

Westwood *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Chin *et al.*, 2015). Además, la secreción de proteínas se conoce como uno de los principales cuellos de botella en la productividad de las células de mamífero. Se han utilizado varios genes para mejorar la secreción de las células CHO, incluidas las chaperonas moleculares y los mediadores de la formación de vesículas secretoras a lo largo de la vía secretora (Khan and Schröder, 2008; Florin *et al.*, 2009; Peng and Fussenegger, 2009; Peng *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). La eficacia de la secreción de proteínas no está garantizada por el péptido señal (PS) natural (Knappskog *et al.*, 2007; Young and Rance, 2012). Kober y col. (Kober *et al.*, 2013) demostraron que los PS de preproteína de azurocidina y albúmina sérica de humano mejoran el rendimiento del producto independientemente de la proteína expresada en células CHO-K1. Al respecto, hay informes de evaluación de PS en células CHO pero no hay suficiente información sobre estos PS en otras células de mamíferos (Knappskog *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Young and Rance, 2012; Attallah *et al.*, 2017).

Los mAbs recombinantes se utilizan para el tratamiento de enfermedades graves, incluidos los trastornos autoinmunes y el cáncer (Helguera and Penichet, 2005). El desarrollo de la tecnología de mAbs ha permitido la generación de anticuerpos terapéuticos con la capacidad de apuntar selectivamente a los antígenos expresados en la superficie de las células cancerosas, convirtiéndolos en una herramienta fundamental para la inmunoterapia del cáncer. Hoy en día, existen varios anticuerpos recombinantes que han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer (Jung and Sarpatwari, 2020). La producción comercial de mAbs y otros productos bioterapéuticos actualmente, se basa en la síntesis en tanques biorreactores de 5 a 20 m<sup>3</sup> con células de mamíferos por cultivo en suspensión con agitación operada en modo de lote alimentado o de perfusión (Kshirsagar *et al.*, 2012; Gilbert *et al.*, 2013; Hilal-Alnaqbi *et al.*, 2013). La producción comercial de mAbs en tanques agitados enfrenta desafíos relacionados con la calidad del producto y el proceso, demanda de mayor productividad, control de glicosilación, reproducibilidad, así como otros controles de procesos (Abu-Absi *et al.*, 2010; Kshirsagar *et al.*, 2012; Gilbert *et al.*, 2013). La mayoría de estos desafíos están relacionados con la gran variabilidad temporal y espacial de las condiciones intrínsecas de los fermentadores. Una forma de mejorar el control de la producción de mAb en los fermentadores es reducir la escala del sistema mediante miniaturización en forma de dispositivos de microfluídica (Abaci *et al.*, 2012).

Desde la primera aprobación reglamentaria en 1986, los mAbs terapéuticos se han convertido en la clase de medicamentos biofarmacéuticos de más rápido crecimiento (Scott, 2012; Jung and Sarpatwari, 2020). El desarrollo de nuevas clases de derivados de anticuerpos

(mAb modificado con Fc, mAb biespecífico y conjugados anticuerpo-fármaco) prometen aún más actividad y especificidad en mAbs terapéuticos de tercera generación. Estos revolucionarán la farmacoterapia del cáncer y muchas otras enfermedades. El desarrollo de un anticuerpo terapéutico es un proceso largo y costoso, que a menudo lleva de 10 a 15 años, incluido el descubrimiento/ingeniería de anticuerpos, el desarrollo de la línea celular de producción, el desarrollo del proceso de fabricación y los estudios clínicos (Agrawal and Bal, 2012). Entre estas tareas, el descubrimiento de anticuerpos puede demorar entre 6 y 18 meses y el desarrollo de líneas celulares de producción puede requerir entre 10 y 12 meses adicionales (Jayapal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). La producción de material para los ensayos de fase I/II es un paso crítico y limitante para llevar una proteína terapéutica al mercado.

Las líneas celulares de producción de mAbs deben exhibir una expresión estable y de alto nivel del anticuerpo que exhiba todos los atributos deseados de calidad del producto, incluida la homogeneidad de la secuencia de proteínas, el perfil de glicosilación, las variantes de carga y los niveles de agregación. Actualmente, el objetivo del rendimiento de fabricación a escala comercial supera los 2–3 g/l de mAb (Yu *et al.*, 2014). Para lograr este objetivo, se requiere una línea celular que produzca más de 0,2 pg/célula/día antes del desarrollo del proceso y la optimización del biorreactor. Debido a que es raro tener el gen de interés (GOI) integrado en un sitio transcripcional altamente activo en el genoma de la línea celular de producción, las metodologías convencionales de desarrollo de la línea celular a menudo requieren amplificación de genes. Históricamente, la dihidrofolato reductasa (DHFR) o glutamina sintetasa (GS) se ha empleado para multiplicar el GOI integrado para mejorar los niveles de mAbs (Agrawal and Bal, 2012). La adición de concentraciones cada vez más altas de metotrexato (MTX) en el sistema DHFR o metionina sulfoximina (MSX) en el sistema GS aplica presión de selección para amplificar genes de anticuerpos adyacentes al DHFR o GS. Una de las desventajas de la amplificación genética es que las células con múltiples copias del GOI a menudo son inestables, lo que resulta en una disminución de los rendimientos de producción en ausencia de presión de selección (Yu *et al.*, 2014). Por lo tanto, las líneas celulares de producción múltiple deben llevar al desarrollo del proceso en una etapa tardía para garantizar al menos una línea celular estable para la fabricación a gran escala.

En los últimos años, se han utilizado varios enfoques epigenéticos para facilitar el desarrollo de la línea celular: región de unión a matriz o elementos genéticos de Selexis (SGE, Selexis), elemento de apertura de cromatina ubicuo (UCOE, Millipore) y elementos antirrepresores (STAR, Crucell) (Yu *et al.*, 2014). Estos elementos de ADN pueden incorporarse

en vectores de expresión de anticuerpos para mejorar las actividades transcripcionales, particularmente cuando el vector de expresión está integrado en un locus desfavorable. Aunque se ha informado que estos métodos mejoran significativamente el rendimiento de producción para grupos estables, su éxito en la detección de líneas celulares de producción superior ha sido limitado (Browne and Al-Rubeai, 2007; Agrawal and Bal, 2012). Debido a que solo se generan docenas de clones de alta producción en el desarrollo convencional de líneas celulares, la productividad suele ser el único criterio utilizado para la selección hasta una etapa muy tardía, cuando se evalúa un puñado de clones para otros atributos de calidad críticos para la fabricación a gran escala. Por lo tanto, la actividad, la glicosilación, la agregación, la oxidación, la desaminación y la carga a menudo se evalúan en etapas posteriores del desarrollo (Yu *et al.*, 2014).

### **3.6. Producción de anticuerpos monoclonales en dispositivos de microfluídica**

Dado que el uso de dispositivos del tipo LOC es relativamente nuevo en el campo de la biología molecular, existen escasos trabajos sobre usos de estos dispositivos para la producción de proteínas recombinantes (Lee *et al.*, 2009). No existen en el país otros grupos dedicados a fabricar y estudiar la producción de mAbs en dispositivos de microfluídica y solo existe un grupo a nivel global que ha comenzado recientemente a explorar en el tema (Garza-García *et al.*, 2013). El grupo de Garza-García y col. diseñó un dispositivo con cuerpo de PMMA y placa de cubierta de PDMS para producir Infliximab. Estos autores alcanzaron valores de productividad de anticuerpos aproximadamente tres órdenes de magnitud más altos en los dispositivos microfluídicos que los reportados típicamente en cultivos de suspensión discontinua alimentada y lograron una alta densidad celular en los microcanales (Garza-García *et al.*, 2013; Garza-García *et al.*, 2014). Sin embargo, los autores propusieron diferentes geometrías de dispositivos con un área pequeña disponible para la proliferación celular y una distribución de velocidad de flujo no homogénea sobre las células productoras. Además, no lograron una distribución celular homogénea y mediante modelado de flujo determinaron la generación de vórtices en el flujo, lo que puede haber contribuido al tiempo limitado de producción de 5 días (Garza-García *et al.*, 2013; Garza-García *et al.*, 2014). Esta tecnología no solo abre la puerta para explorar una nueva

forma de producir mAbs y otras proteínas recombinantes, sino que también podría utilizarse en generación y selección de clones y desarrollo de ensayos biológicos.

#### 4. Rol de Interferones en enfermedades autoinmunes

Los interferones (IFNs) tipo I forman un grupo de citoquinas estructuralmente relacionadas, siendo IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$  las más representativas (Kontsek, 1994). Los IFNs se unen a un receptor único de membrana que consiste en al menos dos subunidades (Roberts *et al.*, 1998; Mogensen *et al.*, 1999). El IFN- $\alpha$  exhibe actividades antivirales y antiproliferativas, por lo tanto está indicado para el tratamiento de varias infecciones virales y de tumores (Gutterman, 1994), aunque, su liberación endógena después de una infección viral aguda representa un daño severo al huésped. También, hay varias enfermedades autoinmunes asociadas con una mayor expresión de IFN- $\alpha$ . Por ejemplo, en pacientes que sufren lupus eritematoso sistémico (LES), se han observado niveles elevados de IFN- $\alpha$  inducidos por la interacción de inmunocomplejos con células sanguíneas periféricas (Batteux *et al.*, 1999). Las células predendríticas plasmocitoides (CPD), son las células productoras naturales de IFN- $\alpha$ , éstas se infiltran en la piel de los pacientes psoriáticos y se activan para producir IFN- $\alpha$  tempranamente durante la formación de la enfermedad. En un modelo de xenoinjerto de psoriasis humana, se ha demostrado que inhibir la capacidad de las CPD para producir IFN- $\alpha$ , previene el desarrollo de psoriasis dependiente de células T (Nestle *et al.*, 2005).

La terapia basada en anticuerpos ha ganado una mayor aceptación con varios mAbs utilizados actualmente como agentes terapéuticos o en ensayos clínicos en etapa tardía. Por lo tanto, IFN- $\alpha$  representa un objetivo atractivo para el desarrollo de anticuerpos para sortear aquellas situaciones en las que la producción excesiva de la citoquina puede conducir a condiciones patológicas. Sin embargo, la efectividad del uso de mAbs murinos completos está limitada por varios factores. La posibilidad de variaciones genéticas introducidas durante ciclos repetidos de crecimiento celular hace que los mAbs sean difíciles de manejar y potencialmente poco confiables. Lo más importante es que la administración repetida de anticuerpos murinos se asocia con la "enfermedad del suero" en los receptores, debido a una fuerte respuesta HAMA (Waldmann, 1991). La gravedad de la respuesta HAMA se puede disminuir mediante el uso de



fragmentos de anticuerpos que carecen del dominio Fc, particularmente los anticuerpos scFvs (Bird *et al.*, 1988).

Depetris y col. (Depetris *et al.*, 2008) describieron el desarrollo y la caracterización de un panel de 11 mAbs murinos, preparados mediante el uso de IFN- $\alpha$  humano recombinante como inmunógeno, algunos de los cuales se utilizaron para diseñar fragmentos variables funcionales de cadena única mediante la tecnología de visualización de fagos, obteniendo un scFv particular capaz de neutralizar un amplio espectro de subtipos de IFN- $\alpha$ , producidos por leucocitos de sangre periférica estimulados y células de Namalwa. Estos autores descubrieron un potencial candidato como agente terapéutico único para contrarrestar la actividad de varios subtipos de IFN- $\alpha$  en condiciones patológicas, donde la mayor expresión de la citoquina se correlaciona con diferentes enfermedades autoinmunes. La amplia especificidad de IFN- $\alpha$  y la afinidad adecuada del scFv respalda una plataforma adecuada para ser utilizada en aquellas enfermedades en las que la producción de esta citoquina se exagera, como en LES, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la psoriasis (Depetris *et al.*, 2008).

Dado que los altos niveles de interferón  $\alpha$  humano (hIFN- $\alpha$ ) es un factor de riesgo hereditario para contraer LES (Niewold *et al.*, 2007; Kirou and Gkrouzman, 2013), una molécula similar a un mAb recombinante anti-hIFN- $\alpha$  scFv-Fc, se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Attalla (Attallah *et al.*, 2017) y se expresó con éxito en una forma activa por células CHO-K1 y HEK-293 usando cultivo celular adherente *in vitro* en botellas-T. En este grupo de trabajo, analizaron la eficiencia de secreción de los PS y la productividad de las diferentes líneas celulares de expresión de una proteína quimérica, basada en un scFv murino anti-interferón humano recombinante  $\alpha$ 2b (rhIFN- $\alpha$ 2b) fusionado al fragmento cristalizable del dominio de la IgG1 humana (Fc $\gamma$ 1). El PS de preproteína de albúmina sérica modificada (mSA) mostró la más alta eficiencia usando líneas celulares CHO-K1 y HEK-293. El PS de mSA tiene la capacidad de dirigir la secreción de proteínas con una alta eficiencia en células derivadas de diferentes mamíferos, lo que lleva a la producción de proteínas recombinantes de interés comercial con las propiedades esperadas de la línea celular seleccionada (Attallah *et al.*, 2017).

# Objetivos

---

El objetivo general de esta tesis es desarrollar un nuevo método para la producción de mAbs y otras proteínas recombinantes para uso terapéutico, mediante dispositivos de microfluídica conocidos comúnmente como "Lab-on-a-chip" (LOC).

Se plantean a continuación los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar y fabricar dispositivos miniaturizados para el cultivo de líneas celulares eucariotas que se adhieran al soporte sólido que permitan la producción de proteínas recombinantes, incluyendo la expresión del anticuerpo monoclonal biosimilar con células CHO-K1 y HEK-293. Los dispositivos se desarrollarán con el fin de optimizar las condiciones de cultivo y crecimiento para la producción de proteína recombinante. Se realizan en PDMS, permitiendo este material una rápida fabricación y reajuste en el diseño según la retroalimentación obtenida de las experiencias prácticas con células. Se evaluarán según cada diseño el crecimiento y densidad celular, la producción, condiciones de flujo de medio de cultivo, entre otras cosas.
- Ajustar los parámetros de inyección de medio de cultivo de composición definida optimizado para la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células, para alcanzar una óptima producción en los dispositivos.
- Realizar un análisis de imágenes de microscopía de campo claro para analizar parámetros de biología celular con un software de procesamiento de imágenes, que permita calcular de forma altamente eficiente el área total ocupada por células.
- Desarrollar nuevos dispositivos que permitan aumentar la superficie de producción de anticuerpos obtenida en los dispositivos pequeños, con el objetivo de obtener una mayor producción y evaluar potenciales usos comerciales.

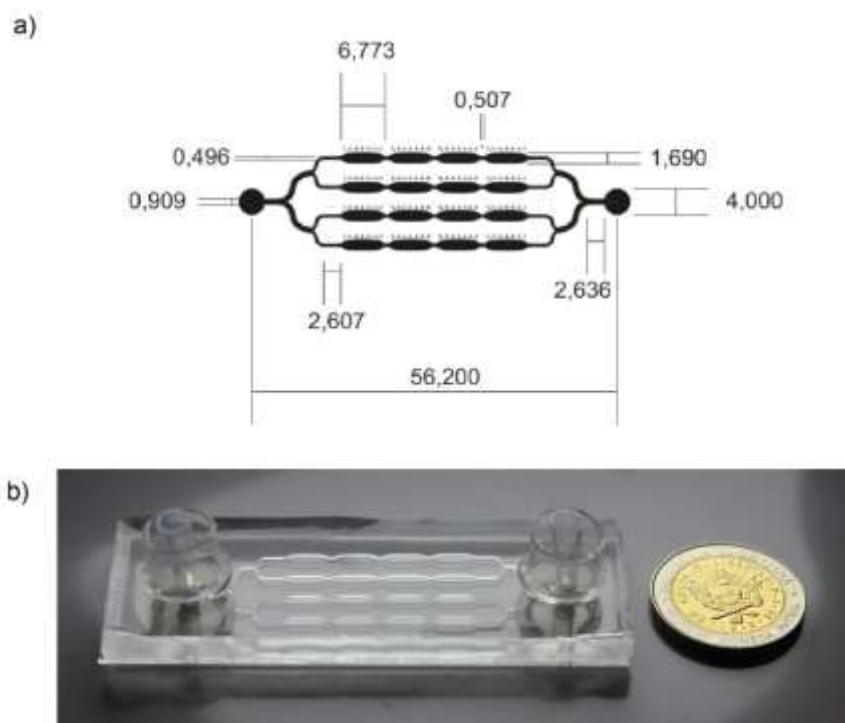
# Materiales y Métodos

---

## 1. Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos

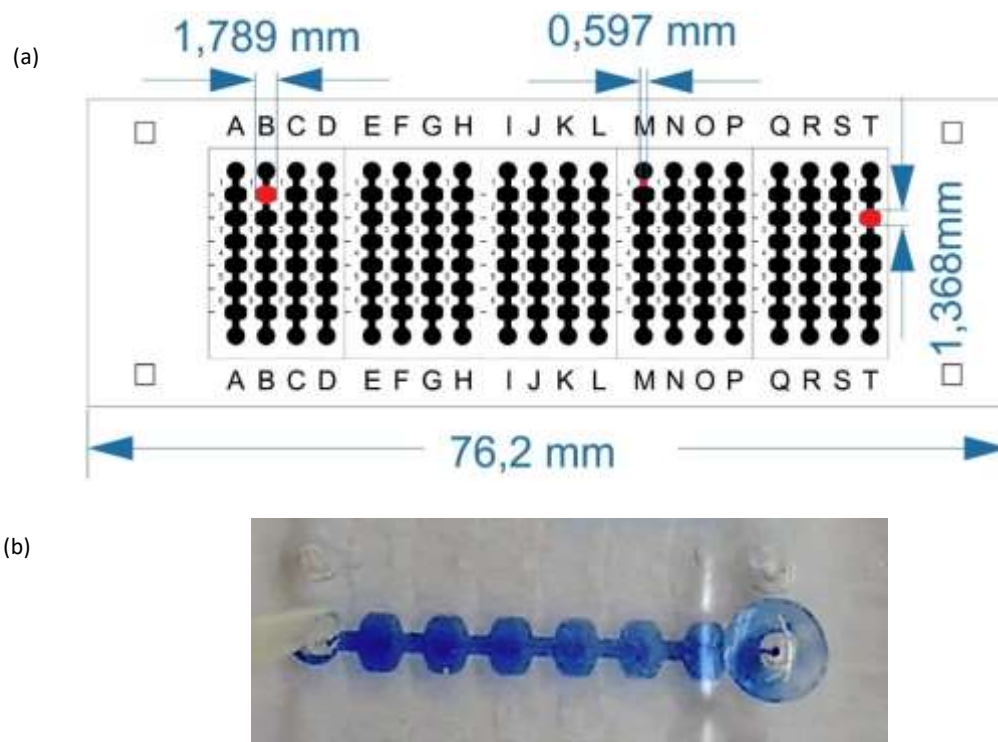
### 1.1. Dispositivos de microfluidica de pequeño volumen (DMPV) de 4 canales y multicámara de 20 canales

Los dispositivos de microfluídica de pequeño volumen (DMPV) utilizados en esta tesis fueron diseñados utilizando el software Layout Editor (<http://www.klayout.de/index.php>). El DMPV de 4 microcanales y 16 cisternas consiste en una entrada y un canal de salida conectados. El canal de entrada se divide en cuatro microcanales idénticos (496  $\mu\text{m}$  de ancho) con 4 cisternas cada uno (1690  $\mu\text{m}$  de ancho), después de lo cual se unen a una sola salida del dispositivo. La altura del canal es de 150  $\mu\text{m}$  y el volumen interno total es de 32,22  $\mu\text{l}$  (**Figura 9**). Los 4 canales se unen mediante microcanales curvos para evitar la acumulación de células en las esquinas rectas y la formación de burbujas (Peñaherrera *et al.*, 2016).



**Figura 9:** (a) Diseño del DMPV de 16 cisternas, con 4 microcanales con 4 cisternas de cultivo celular por canal y una entrada y una salida en común. Las medidas del DMPV están expresadas en mm. (b) DMPV de PDMS/vidrio con un volumen interno total de 32,22  $\mu\text{l}$ .

El DMPV multicámara consta de 20 microcanales con 6 cámaras de 1,368 mm de ancho y 1,79 mm de largo cada uno (**Figura 10.a**). El volumen interno de cada cámara es 130 nl (**Figura 10.b**).

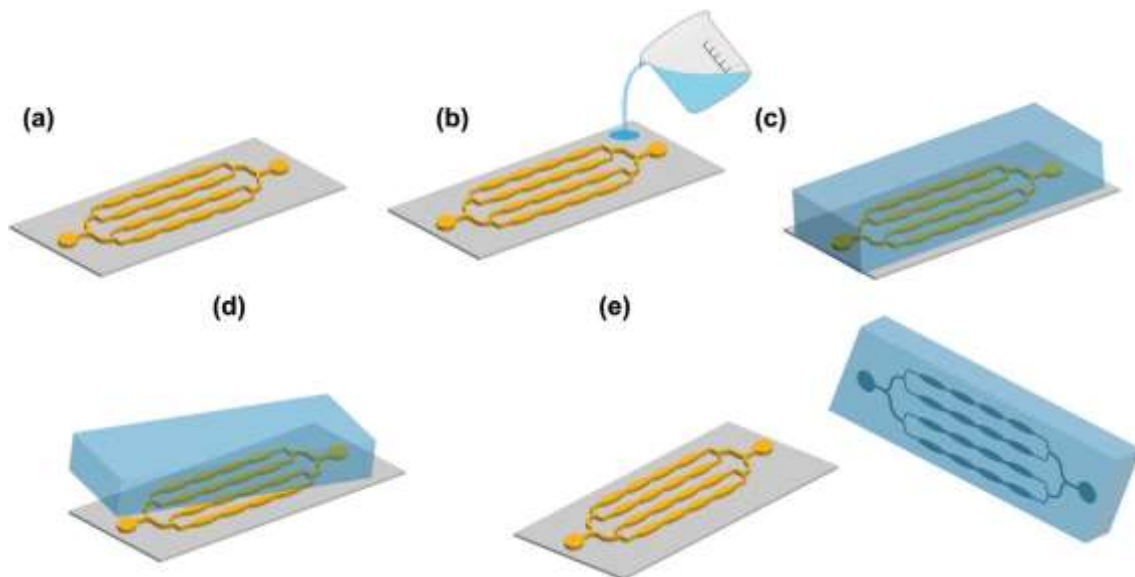


**Figura 10:** (a) Diseño del DMPV multicámara. Con 20 canales con 6 cámaras por canal de 1,36 mm de altura. El volumen interno de cada cámara es de 130 nl. (b) Visualización con solución de azul tripán, de un canal con 6 cámaras de cultivo del DMPV multicámara.

Ambos tipos de DMPVs fueron fabricados en PDMS (Sylgard 184, Dow Corning). Para esto, se hizo un molde del diseño en alto relieve modelando fotolitográficamente SU-8 de 150  $\mu\text{m}$  de espesor (MicroChem, Alemania) en una oblea de silicio (Virginia Semiconductor, Inc.). El sustrato de silicio se limpió mediante sonicación en acetona y alcohol isopropílico y la superficie del sustrato se deshidrató durante 10 min en una placa calefactora a 200°C. Luego, se volcó la resina SU-8 sobre el sustrato y se hizo girar en dos ciclos idénticos. Para esparcir la resina, la centrífuga se fue incrementando de 100 rpm hasta 500 rpm y se mantuvo durante 5 seg. En el ciclo de centrifugado, la centrífuga se fue incrementando de 300 rpm hasta 2000 rpm y se mantuvo durante 30 seg. La resina se horneó suavemente a 65°C durante 20 min, luego a 95°C durante 50 min. El sustrato se alineó y la resina se expuso a UV cercano a 650  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . La resina

se horneó después de la exposición a 65°C durante 12 min, luego a 95°C durante 15 min. Finalmente, la resina SU-8 se elaboró durante 15 min bajo agitación.

El PDMS se mezcló con el agente de curado en una relación de 10:1. La mezcla se colocó al vacío para eliminar las burbujas de aire. Luego, la mezcla se vertió en el molde, se colocó al vacío una vez más y se curó en un horno a 70°C durante 70 min. Finalmente, los dispositivos microfluídicos se cortaron y los puntos de conexión fluidica se perforaron con un punzón hueco (calibre 21, diámetro interno de 0,51 mm, Integra Miltex®, Ted Pella, Inc) (**Figura 11**). El dispositivo de PDMS se unió irreversiblemente a una oblea de vidrio por exposición al plasma de oxígeno de alta frecuencia por deposición de vapor químico potenciado por plasma (DQV-PP) (900 V, 1 mbar) (BD 10AS, Chicago, EE. UU.), durante 120 seg (Peñaherrera *et al.*, 2016), para crear el grupo -SiOH en la superficie de PDMS y activarla (Lasorsa *et al.*, 2005). Una vez completamente pegado el dispositivo se le agregaron puntas de tips p1000 como reservorios en la entrada y la salida.

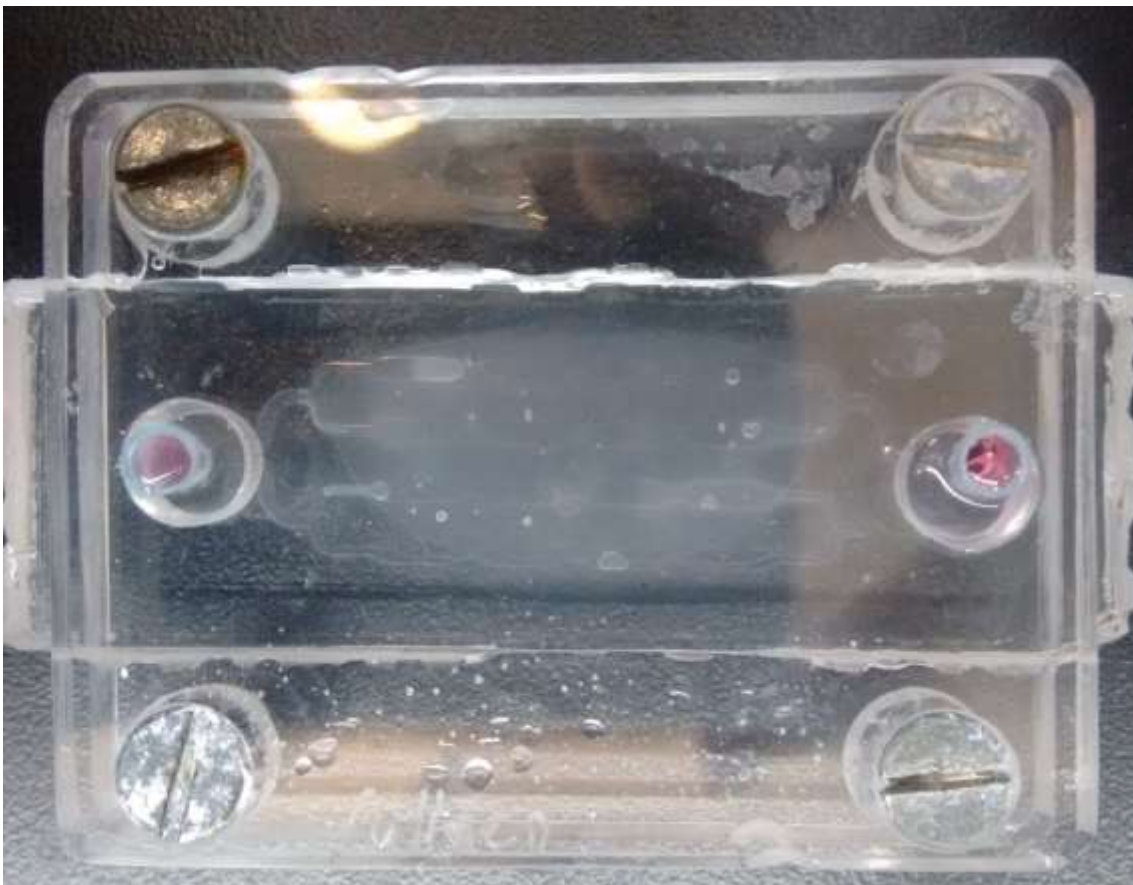


**Figura 11:** Fabricación del DMPV de 4 microcanales: (a) Resina SU-8 sobre oblea maestra de silicio hecha por fotolitografía, (b) mezcla de PDMS y agente de curado (relación 10:1) vertido sobre el molde, (c) PDMS a 70°C en horno, 70 min, (d) desprendimiento del PDMS del molde, (e) dispositivo listo para perforar en la entrada y salida y pegar al vidrio.

En algunos DMPVs se modificó la superficie del vidrio con abrasión láser. Los vidrios se expusieron a la altura de los canales al láser produciendo un marcaje o rugosidad y se evaluó la

adhesión de las células sobre esta superficie. Para los portaobjetos sometidos a abrasión con láser, las muestras se mecanizaron en atmósfera al aire libre con un sistema láser Ti: Sapphire que genera pulsos de 130 fs a una longitud de onda central de 800 nm, con una tasa de repetición de 1 kHz. El rayo láser de 8 mm de diámetro se enfocó en los vidrios utilizando un objetivo de microscopio de 10x. Estos vidrios se unieron al PDMS como se describe más arriba.

También, se realizaron DMPVs totalmente de PDMS sin soporte de vidrio, uniéndose irreversiblemente por exposición al plasma de oxígeno a un piso de PDMS. Ya que el soporte de vidrio es más frágil que el de PDMS. Algunos de estos DMPVs totalmente de PDMS pero sin unirse por plasma de oxígeno, se juntaron con un soporte de acrílico (**Figura 12**) para poder obtener DMPV reutilizables.

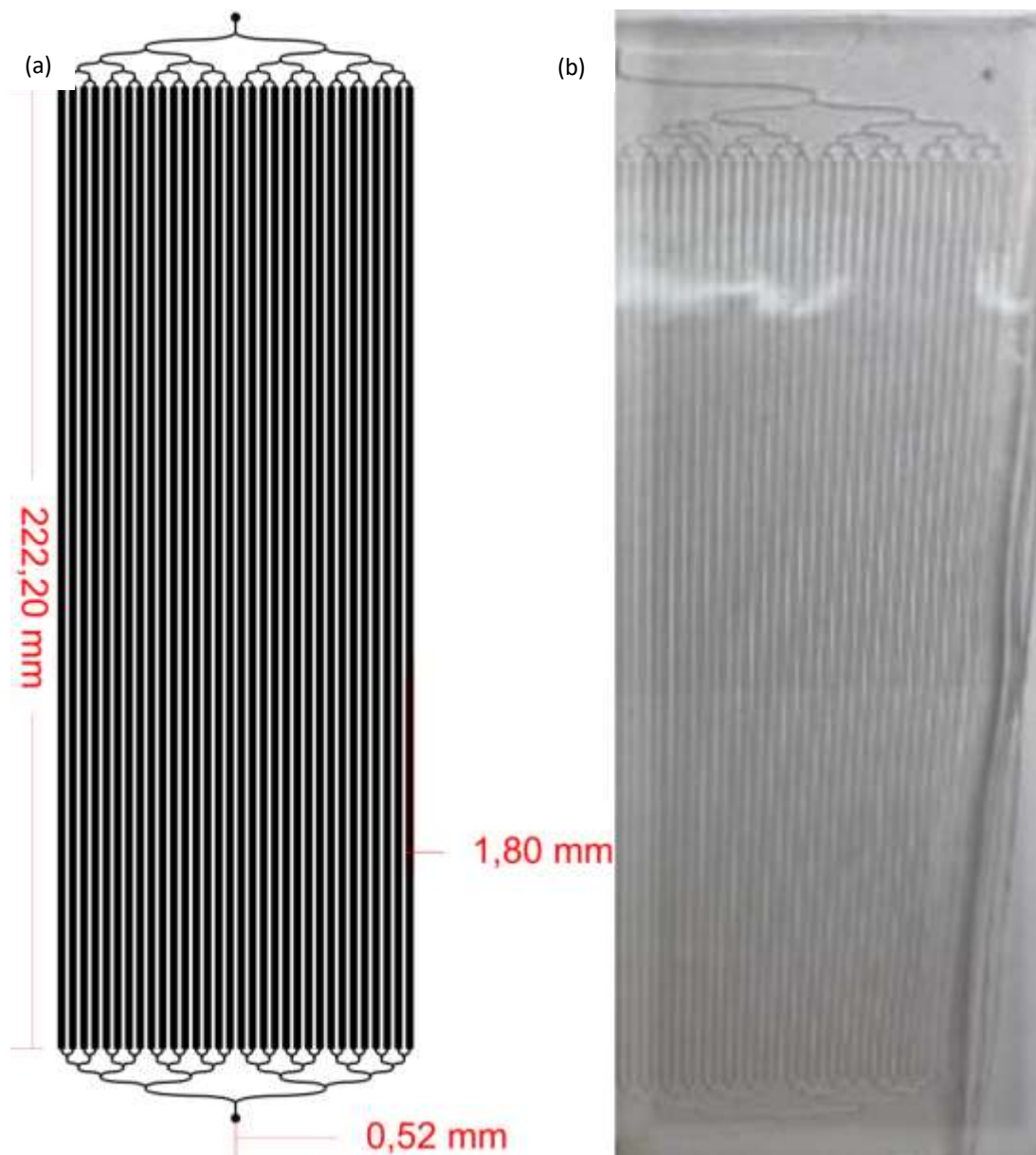


**Figura 12:** El DMPV de PDMS, se juntó a un piso de PDMS con un soporte de acrílico que los mantiene juntos, sin unirlos irreversiblemente por exposición al plasma de oxígeno.



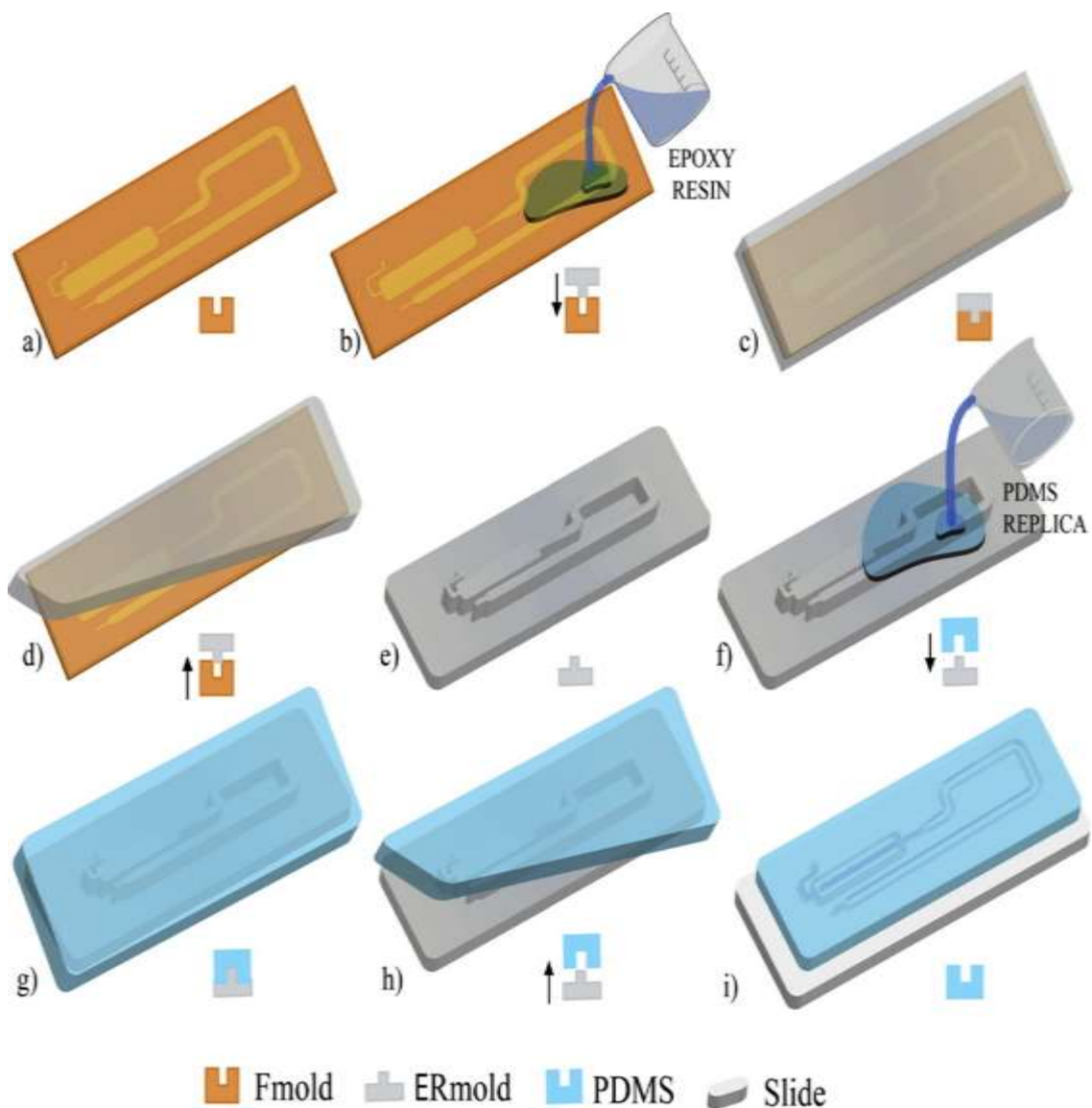
## 1.2. Dispositivo de microfluídica de gran volumen (DMGV)

El DMGV consta de un canal de entrada y uno de salida conectados. El canal de entrada se divide en 32 microcanales idénticos ( $1800\ \mu\text{m}$  de ancho), después de lo cual se unen a la salida del dispositivo. La altura del canal es de  $200\ \mu\text{m}$  y el volumen interno total es de  $2,8\ \text{ml}$  en un área de  $20 \times 30\ \text{cm}$  (**Figura 13**). Los canales de entrada y salida se unen a los 32 microcanales de



**Figura 13:** DMGV utilizado en este estudio. (a) Diseño de microcanales con una entrada, una salida y 32 cisternas de cultivo celular. (b) DMGV de PDMS/vidrio con un volumen interno total de  $2,8\ \text{ml}$ .

forma curva para evitar la formación de burbujas y la acumulación de células en esquinas rectas. El proceso de fabricación del dispositivo microfluídico de PDMS (Sylgard 184, Dow; Corning) constó de tres pasos principales: (1) Fabricación de un molde maestro flexográfico de fotopolímero (Fmold), (2) fabricación de un molde macho de resina epoxi reutilizable (ERMold) por moldeado de réplica del FMold y (3) transferencia de las características de ERMold a PDMS. Este proceso se resume esquemáticamente en la **Figura 14**.



**Figura 14:** Fabricación de dispositivos microfluídicos de PDMS. (a) Molde maestro fotopolimérico flexográfico (Fmold). (b, c) La resina epoxi se moldea en el Fmold y se cura a 25°C (d, e) Después de 72 hs, el ERMold se despegó para formar el molde macho. (f, g) El PDMS se moldea en el ERMold y se cura a 40°C durante la noche. (h) La réplica PDMS se despegó. (i) Los puertos de conexión fluidica se perforan y luego la réplica se une irreversiblemente a una oblea de vidrio mediante exposición a plasma de O<sub>2</sub>.

### 1.2.1. Fabricación del molde maestro Flexográfico de fotopolímero (Fmold)

El fotopolímero Flexcel NX y la capa de imagen térmica (TIL) utilizados en la fabricación de los moldes fueron suministrados por Eastman Kodak (Kodak, 2017b). La red de microcanales se diseñó con el software Layout Editor. Este diseño fue transferido al TIL con una fuente láser infrarroja de 2400 ppi (Kodak, 2017a) y posteriormente, fue laminado sobre la placa de fotopolímero no expuesto. En el siguiente paso, la placa de fotopolímero se expuso a la luz UVA a 0,45 J durante 10 seg en el reverso, luego se retiró el TIL y el lado frontal se expuso a la luz UVA a 19 J durante 360 segundos. La placa de fotopolímero se lavó con solvente PROSOL N-1 a 360 mm/min y se secó en una estufa durante 30 min a 50°C. Finalmente, la placa de fotopolímero se expuso a luz UVC a 10 J durante 17 min y a luz UVA a 4 J durante 2 min en el lado frontal (**Figura 15**). Este molde fue codificado como Fmold. Antes del uso, el Fmold se colocó en un horno a 100°C durante 12 hs y luego se trató en una cámara de vacío durante 1 hs a 25°C, seguido de una limpieza en solución de etanol al 70% en un baño ultrasónico durante 7 min, se secó a 40°C durante 10 min y se limpió con una corriente de nitrógeno.



**Figura 15:** Método de fabricación del Fmold.

El Fmold obtenido se cubrió con una película de SiO<sub>2</sub> ultradelgada por DQV-PP. El reactor casero proporcionó una fuente de energía eléctrica continua de descarga luminosa de 900 V con acoplamiento capacitivo y adaptación de impedancia. El hexametildisilazano (HMDS) (Dow

Corning, grasa de silicona de alto vacío) se usó como un monómero precursor. La entrada de gas de trabajo ( $O_2$ ) estaba ubicada al final de la cámara de vacío, lejos del sustrato, lo que permite la ionización de vapor en el área de generación de descarga y producción de recubrimiento de  $SiO_2$ . El proceso de recubrimiento se realizó de acuerdo con las condiciones descritas por Lasorsa y col. (Lasorsa *et al.*, 2005). Las condiciones de trabajo de DQV-PP fueron: caudal de  $O_2$  8 ml/seg, 1 mbar de presión de gas y 3 hs de exposición.

### 1.2.2. Fabricación de un molde de Resina Epoxi (ERmold)

Para la fabricación del ERmold, se mezclaron una resina epoxi y un agente de curado disponibles comercialmente (Cristal-Tack, Tecnarte - Argentina) con agitación manual durante 3 min en una relación de peso 2:1 y se trataron ultrasónicamente con un sonicador de tipo baño (Limpiador ultrasónico TESTLAB) durante 7 min para eliminar las burbujas de aire. Luego, la mezcla se vertió en el Fmold y se curó a temperatura ambiente durante 72 hs. Después del curado, el molde de resina epoxi se despegó del para formar el molde macho (**Figura 14.d**), este molde se denomina ERmold.

### 1.2.3. Dispositivo de PDMS

El PDMS se mezcló con un agente de curado en una proporción de 10:1 (200 gr en total). La mezcla se colocó al vacío para eliminar las burbujas de aire. Luego, la mezcla se vertió en el ERmold y se curó en estufa a  $40^\circ C$  durante la noche. Finalmente, el dispositivo se despegó del molde, se cortó y se perforó para hacer las conexiones con un punzón hueco con un diámetro interno de 0,511 mm (Integra Miltex<sup>®</sup>, Ted Pella, Inc). La réplica de PDMS se unió irreversiblemente a una superficie de vidrio por exposición al plasma de oxígeno de alta frecuencia por DQV-PP (900 V, 1 mbar) (BD 10AS, Chicago, EE. UU.) durante 15 min, para crear el grupo  $-SiOH$  en la superficie de PDMS y activarla (**Figura 14.i**) (Lasorsa *et al.*, 2005). Después de pegar el PDMS al vidrio, se conectaron catéteres de acero inoxidable y mangueras (0,8 mm de diámetro) con jeringas en los canales de entrada y salida.

## 2. Caracterización del flujo interno de los dispositivos de microfluídica mediante modelado computacional

Para modelar los perfiles de flujo dinámicos dentro de los dispositivos microfluídicos, se utilizó el software Comsol Multiphysics versión 5.2a. Se perfundió medio de cultivo con el colorante azul tripán (Life Technologies, EE.UU.) en cada dispositivo (**Figura 10.b**). Se filmó el flujo de colorante desde que entraba a los canales por gravedad hasta llenarse todo el dispositivo y mediante el video se modeló el flujo en los canales. La velocidad de flujo de referencia para las simulaciones fue la que se calculó en el video de 3,28 mm<sup>3</sup>/seg. El cálculo computacional se basó en las ecuaciones de Navier-Stokes, se desestimó el componente inercial debido al muy bajo número de Reynolds de los dispositivos de microfluídica, permitiéndole al software calcular una densidad de flujo mayor. Las condiciones de límite para el modelo 3D incluían flujo laminar sin deslizamiento, presión cero en la salida y las propiedades del agua.

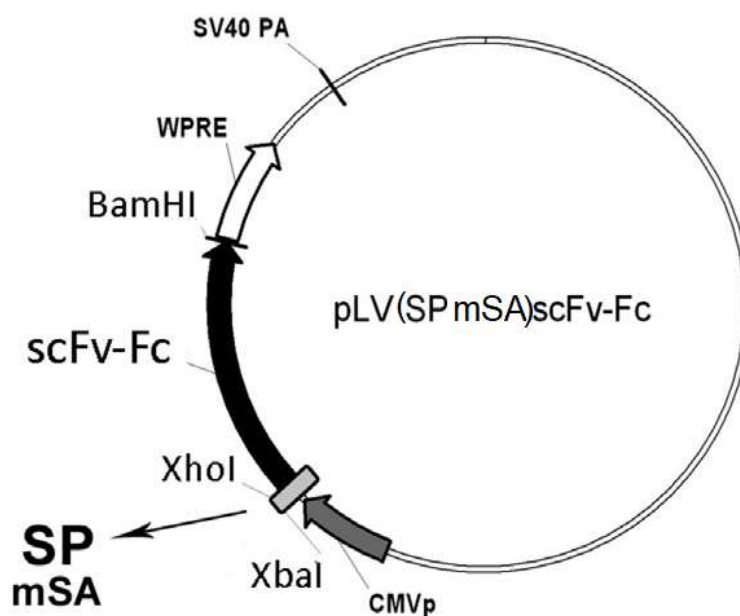
## 3. Líneas celulares de mamífero

La línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1) y la línea celular de riñón de embrión humano (HEK-293T) fueron adquiridas de la American *Type Culture Collection* (ATCC). Las células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b fueron provistas por la Dra. Carolina Attallah del Laboratorio de Cultivos Celulares, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL); son células CHO-K1 y HEK-293 que fueron modificadas para la expresión del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-hIFN- $\alpha$ 2b. Este mAb consiste en un fragmento variable de anticuerpo de cadena única fusionado para el dominio cristalizante de la IgG1 humana (proteína de fusión scFv-Fc recombinante) contra el interferón  $\alpha$  humano 2b recombinante (rhIFN- $\alpha$ 2b) (**Figura 16**). Estas dos líneas celulares se generaron mediante transfección y posterior selección de puromicina (Attallah *et al.*, 2017). La secuencia scFv



**Figura 16:** El mAb recombinante (scFv-Fc) anti-hIFN- $\alpha$ 2b desarrollado para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, es una proteína de fusión producida en células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b. Desarrollado para la prevención de infecciones virales agudas, trastornos inflamatorios y varias enfermedades autoinmunes, donde la citoquina rhIFN- $\alpha$ 2b puede ser un factor para iniciar o mantener la enfermedad.

primero se obtuvo como se describe por Depetris y col. (Depetris *et al.*, 2008) y se modificó agregando el péptido señal mSA para permitir que el scFv-Fc se exprese en células de mamífero como se describe por Attallah y col. (Attallah *et al.*, 2017). La secuencia scFv-Fc se obtuvo mediante la fusión de la secuencia Fc $\gamma$ 1 humana con el scFv generado previamente. El Fc $\gamma$ 1 fue sintetizado por GeneArt™ Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se clonó entre sitios de restricción NheI y BamHI en un vector pLV (**Figura 17**).



**Figura 17:** Representación del vector de expresión del mAb scFv-Fc, con el PS de mSA, Promotor CMV, el constructo del scFv-Fc fue insertado entre sitios de restricción XbaI y BamHI. (Attallah *et al.*, 2017)

## 4. Condiciones de cultivo celular

Las líneas celulares HEK-293T y CHO-K1 fueron cultivadas utilizando medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, NY, EE.UU.) con 3,7 g/l de  $\text{NaHCO}_3$ , suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios, Mendoza, Argentina) decomplementado e inactivado, 2 mM L-glutamina y 100 U/ml penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomicina y 0,25  $\mu\text{g/ml}$  fungizona (Gibco, NY, EE.UU.) a 37°C en estufa con 5%  $\text{CO}_2$ . Para cultivar las células HEK-ahIFN $\alpha$ 2b se utilizó el mismo DMEM anterior, con el agregado de 0,11 g/l de piruvato de sodio. Las células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b fueron cultivadas utilizando medio DMEM/F12 (50/50) (Gibco, Waltham, MA, EE.UU.) con 1,2 g/l de  $\text{NaHCO}_3$ , suplementado con 5% de SFB (Internegocios, Mendoza, Argentina) decomplementado e inactivado, 2 mM L-glutamina y 100 U/ml penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomicina y 0,25  $\mu\text{g/ml}$  fungizona (Gibco, NY, EE.UU.) a 37°C en estufa con 5%  $\text{CO}_2$ . Los medios de cultivo para la producción de anticuerpos fue el mismo que el descrito para el crecimiento, pero se disminuyó el SFB a 0,5%. En la sección **Anexo** se detallan los métodos realizados repicar (Anexo I), para descongelar (Anexo II) y para congelar las líneas celulares (Anexo III).

### 4.1. Cultivo celular en los DMPV

La superficie de los microcanales de los DMPVs se expuso al plasma de oxígeno (BD 10AS, Chicago, USA) durante 3 min para modificar el PDMS de hidrofóbico a hidrofílico. Luego, se perfundió dentro de los microcanales con etanol al 70% que tiene una tensión superficial más baja que el agua, para evitar formación de burbujas. Continuadamente, el dispositivo microfluídico se desinfectó usando NaOH 0,5 M durante 30 min y luego se enjuagó con 4 ml de agua ultrapura estéril. A partir de esta instancia, los siguientes pasos se realizaron en cabina de flujo laminar estéril. Antes de la siembra celular, el DMPV se incubó con una solución estéril de hidrobromuro de poli-D-lisina 0,1 mg/ml (Sigma, Saint Louis, EE. UU.) durante 30 min a 37°C para mejorar la adhesión de las células al vidrio del DMPV (Peñaherrera *et al.*, 2016). Se utilizaron células de ovario de hámster chino CHO-K1, CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y células de riñón de embrión

humano HEK-293T y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b. Las líneas celulares adherentes se resuspendieron con tripsina 0,5 mg/ml y EDTA-4Na 0,2 mg/ml (Gibco, Nueva York) y se incubaron a 37°C durante 3 min. Luego, la tripsina se inactivó con 10% de SFB, las células se lavaron con Buffer fosfato salino (PBS) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,6) y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Antes de los experimentos, las células se cosecharon y se volvieron a resuspender en medios frescos y se cuantificó el número y la viabilidad de las células utilizando una cámara de Neubauer y exclusión con azul tripán (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.).

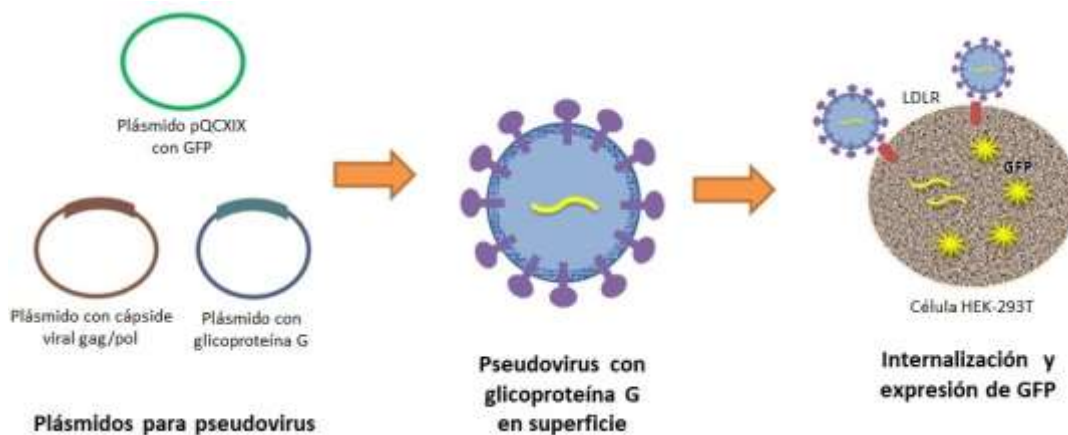
En los DMPV de 4 canales y 16 cisternas, se tomaron las células resuspendidas con una micropipeta y se sembraron por la entrada del DMPV a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml. Se dejaron sedimentar las células y los DMPVs se colocaron dentro de una placa de Petri en una incubadora a 37°C durante 3 o 5 días hasta que se logró una adhesión celular homogénea en el piso de los DMPVs. Luego, los DMPVs se alimentaron con 200  $\mu$ l de medio de cultivo de producción, que se fue renovando cada 24 hs por 24 días. El método de flujo pasivo por bombeo por gravedad se utilizó en este sistema microfluídico abierto, generando el flujo por diferencia de altura en los reservorios de entrada y de salida (Huang *et al.*, 2010; Shemesh *et al.*, 2015). En todas las condiciones, las células se cultivaron en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio de cultivo consumido extraído de los DMPVs se guardó a -20°C para análisis de los anticuerpos producidos por las células. La placa de Petri se sacó de la incubadora todos los días para transportar el dispositivo microfluídico al microscopio, para obtener las microfotografías.

En los DMPVs multicámara de 20 microcanales, las células se resuspendieron en medio DMEM completo, suplementado con concentraciones crecientes de SFB (0; 1,25; 2,5; 5; 10 y 20%) a  $5 \times 10^5$  células/ml. Cada condición experimental se realizó por triplicado con 6 cámaras por canal en el mismo DMPV. Los microcanales se llenaron con 1 ml de DMEM completo. A continuación, se sembraron células HEK-293T en suspensión con micropipeta en la entrada de cada canal del DMPV. Se dejó que las células sedimentaran y el DMPV se incubó en una estufa humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante la noche. Se cambió el medio de cultivo con la correspondiente concentración de SFB con pipeta cada 48 hs.

#### **4.1.1. Estudio de internalización de pseudovirus de VSV en DMPVs de 4 canales**



Para comprobar la factibilidad de transfección celular en los dispositivos de microfluídica y evaluar el monitoreo de células fluorescentes utilizando un microscopio de fluorescencia, se realizó una infección de células HEK-293T cultivadas en DMPV de 4 canales y 16 cisternas. En el laboratorio poseemos partículas pseudovirales del virus de la estomatitis vesicular, llamado VSV (por su nombre en inglés, vesicular stomatitis virus). Los pseudovirus de VSV expresan la proteína de cápside viral gag/pol del virus de la leucemia murina (MLV) no-replicante y la glicoproteína G del VSV sobre la superficie, las cuales al interactuar con el receptor LDL en la membrana celular, las partículas pseudovirales son internalizadas induciendo la expresión de GFP del vector retroviral pQCXIX dentro de la célula (**Figura 18**).



**Figura 18: Sistema de tres vectores para generar pseudovirus de VSV en células HEK293T.** Las partículas pseudovirales decoradas con la glicoproteína G de VSV que contienen un vector para la expresión de GFP. En este sistema la glicoproteína G sobre la superficie de los pseudovirus interactúan con el LDLR sobre la membrana celular de las células HEK-293T y las partículas pseudovirales son internalizadas induciendo la expresión de GFP.

Se sembraron 400µl de células HEK-293T en DMPVs de 4 microcanales a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/µl en DMEM. Al día siguiente se cambió 200µl de medio de cultivo de los DMPVs con pseudovirus VSV. Se tomaron imágenes de campo claro y de fluorescencia (excitación con luz azul) bajo el microscopio Olympus invertido CKX41 y se cambió

el medio cada 24 hs por 9 días. Las microfotografías se procesaron con el software QCapture Pro 6.0 y luego con ImageJ.

## 4.2. Cultivo celular en el DMGV

Para evaluar el crecimiento celular y producción de mAbs en el DMGV, se utilizó la línea celular CHO-ahIFN $\alpha$ 2b por ser la línea que más mAbs produjo en los DMPVs. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en medios de cultivo frescos, el número de células y la viabilidad se cuantificó usando una cámara de Neubauer y exclusión de azul de tripan (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.). A continuación, las células resuspendidas se sembraron con la jeringa en la entrada al dispositivo de microfluídica a una concentración de  $10^6$  células/ml utilizando una bomba de jeringa ActIVA A22 (ADOX, Argentina) a un caudal de 300  $\mu$ l/min durante 10 min (**Figura 19**). La jeringa se fue girando 90° para evitar la sedimentación celular a lo largo de la pared lateral de la jeringa. El dispositivo microfluídico se incubó a 37°C en una estufa humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> dentro de un contenedor cerrado para que no pierda humedad.

Las células dentro del DMGV fueron alimentadas con medio de cultivo de crecimiento hasta que se logró la adhesión celular y confluencia en el piso del DMGV a los 7 días del sembrado de las células. Luego, el DMGV se alimentó automáticamente todos los días con medio de cultivo de producción durante 11 días. El flujo de medio de cultivo de entrada al DMGV se programó con la bomba de jeringa a 300  $\mu$ l/min por 10 min, para que cada 24 hs se renueve medio de cultivo y salga el consumido del DMGV con mAb siempre en un circuito cerrado estéril. El medio de cultivo efluente recolectado se guardó a -20°C para análisis de glucosa, lactato y anticuerpos. La cantidad de glucosa en el cultivo celular se cuantificó con un medidor de glucosa Accu-Chek® Performa (Roche).

El estado de las células y su crecimiento en el DMGV fueron seguidos por la toma sistemática de microfotografías. Los microcanales se observaron utilizando un microscopio invertido Olympus CKX41 (Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes de campo claro se obtuvieron con el objetivo Olympus PlanC N 10X / 0,25 con una Olympus QColor 5 y se procesaron con el software QCapture Pro 6.0. Se obtuvieron tres micrográficas por microcanal a un aumento de 100X en campo claro, por día durante los 18 días del experimento.



**Figura 19:** Fotografía del set-up utilizado para cultivo celular con flujo continuo por bomba de jeringa al DMGV dentro de una cabina de flujo para mantener el dispositivo estéril en los cambios de medio de cultivo.

## 5. Medición del crecimiento y distribución celular mediante análisis de imágenes en ImageJ

En el DMPV de 4 microcanales y 16 cisternas, se sembraron y cultivaron células CHO-K1 para el experimento de proliferación celular de 69 días. Para la cuantificación de células dentro del DMPV, se tomó 1 microfotografía para cada cisterna al azar por día (16 en total), con un aumento de 100X en campo claro durante los 69 días del experimento. El número de células (con núcleos distinguibles) y las densidades por  $\text{mm}^2$  se determinaron utilizando ImageJ (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., [Http://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)). Para la cuantificación, cada fotomicrografía se dividió en 24 cuadrantes iguales de  $0,38 \text{ mm}^2$  o 16 de  $0,57 \text{ mm}^2$ , según el ensayo, para cuantificar las células de cada área de las fotografías se creó una macro automática con el complemento de contador de células de FIJI/ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). A partir de las mediciones por cuadrante, se determinó el número promedio de células nuevas en cada cisterna en el DMPV por día. Los microcanales se visualizaron usando un microscopio Olympus invertido CKX41. Se tomaron imágenes de campo claro con objetivos Olympus LUCPlan FLN 40X / 0,60; LCACH N 20X / 0,40; PlanC N 10X / 0,25; y PlanC N 4X / 0,10 con una Olympus QColor 5 y procesado con el software QCapture Pro 6.0.

En el DMGV, se tomaron 3 microfotografías al azar de cada cisterna por día (96 fotografías en total/día) con un aumento de 100X en campo claro durante los 18 días del experimento y se prosiguió al de igual forma que en el DMPV de 4 microcanales dicho anteriormente.

En el DMPV multicámara, los 20 microcanales se visualizaron utilizando un microscopio Olympus invertido CKX41. Las imágenes de campo claro se tomaron con los objetivos Olympus LUCPlan FLN 40x/0,60; LCACH N 20x/0,40; PlanC N 10x/0,25 y PlanC N 4x/0,10 con una Olympus QColor 5 y procesado con el software QCapture Pro 6.0. Se tomaron imágenes de las 6 cámaras de cada microcanal. La densidad celular dentro de los microcanales se cuantificó posteriormente al sembrar las células. Luego de 24 hs de incubación, se cuantificó la densidad celular en cada cámara mediante el software de análisis de imágenes desarrollado en esta tesis o mediante ImageJ. El análisis se realizó cada 48 hs durante 10 días. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar de la media de los datos de 3 experimentos independientes, contando un total de 54 cámaras para cada concentración de SFB. En total se analizaron 1000 imágenes.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de un solo factor seguido de por la prueba de diferencia honestamente significativa post hoc de Dunn. Se eligió un nivel de significancia de  $P < 0,05$  y se utilizó el software SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc) para todas las pruebas estadísticas y análisis de dispersión de líneas.

## 6. Desarrollo del software PIACG

Para realizar el análisis de imágenes de las células cultivadas en los DMPVs multicámara de 20 microcanales, se requirió de un paquete de software que pueda analizar gran cantidad de células adheridas a superficies irregulares, con gradientes de tonalidades de fondo sutiles y al mismo tiempo que pueda discriminar objetos que no sean células, como los límites de las cámaras de los microcanales. El software de análisis de imágenes desarrollado en esta tesis que permite hacer frente a estos problemas se creó utilizando Python, para lo cual existen muchas librerías de procesamiento de imágenes disponibles. Se utilizaron las siguientes bibliotecas: Mahotas, Matplotlib y NumPy.

En la imagen de una célula perfectamente enfocada bajo microscopio óptico, se observa el contorno como una línea oscura bien visible y dentro de la célula se ve del mismo tono que la superficie que la rodea. Para el mejor análisis de las células, es necesario que se destaquen del fondo. Por lo tanto, se desenfocaron las células y así éstas se vuelven ligeramente borrosas y más oscuras y así contrastan con el fondo. El software de análisis de imágenes basado en Python para el crecimiento celular (PIACG) segmenta cada imagen en varias piezas (16 por defecto) y procesa cada porción individualmente. Esto es necesario debido a la superficie irregular de la cámara, las irregularidades proyectan sombras de modo que el fondo tiene muchas áreas sombreadas. Para obtener resultados precisos, fue fundamental que la adquisición de imágenes fuera lo más homogénea posible. Durante el procesamiento, la biblioteca Mahotas se utilizó para generar un valor umbral óptimo y se aplicó un filtro gaussiano a cada porción. Para el umbral se utilizó el método de Ridler-Calvard. Luego, el umbral generado se emplea en la versión gausseana de la imagen. Se utilizaron 6 píxeles como valor sigma en el filtro gaussiano. El resultado fue una imagen en la que todos los píxeles que pertenecen a las células son negros y todo lo demás son blancos. En el último paso, se cuentan los píxeles negros y se comparan con el número total de píxeles de las imágenes. Estos valores se pueden utilizar para calcular el área

cubierta por las células en porcentaje. Si se conocen los píxeles por centímetro, el valor se puede calcular en milímetro cuadrado. Para comparar las funcionalidades de PIACG, se realizaron los siguientes pasos en ImageJ con el fin de analizar las mismas imágenes: Abrir imagen / Selección del área a cuantificar / Editar> Limpiar exterior / Procesar> Binario> Convertir a máscara / Analizar> Medir.

## **7. Producción del anticuerpo monoclonal recombinante anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

### **7.1. Purificación del anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

El anti-hIFN- $\alpha$ 2b scFv-Fc se purificó a partir de los diferentes cultivos celulares clarificados mediante cromatografía de afinidad de proteína A usando la resina de purificación de anticuerpos MabSelect SuRe (GE, Boston, MA, EE. UU.) De acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La elución se llevó a cabo con ácido cítrico 0,1 M, pH 3,0. Las fracciones que contenían mAbs, se dializaron durante la noche contra PBS y luego se concentraron mediante ultrafiltración centrífuga usando una membrana de corte de MW de 30 kDa (Millipore, NorthRyde, Australia). La concentración de mAb se determinó espectrofotométricamente a 280 nm y su pureza se calculó mediante densitometría en gel utilizando un software apropiado. Las purificaciones de proteínas se llevaron a cabo en un sistema explorador FPLC-ÅKTA (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

### **7.2. SDS-PAGE y análisis de transferencia Western del anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

La pureza del scFv-Fc anti-hIFN- $\alpha$ 2b soluble se detectó en los medios de cultivos mediante SDS-PAGE seguido de transferencia Western. El rendimiento de la purificación del se analizó mediante SDS-PAGE usando un gel de resolución de poliacrilamida al 12%(p/v) y un gel

de apilamiento al 5%(p/v). Las muestras se diluyeron en buffer con betamercaptoetanol al 5%(v/v) (J.T. BackerTM).

La separación se realizó a 200V durante 75 min. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se decoloraron con una solución de metanol al 15%(v/v) y ácido acético al 10%(v/v). Para la transferencia Western, las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF), se bloquearon con leche descremada al 5%(p/v) en Tris-Buffer con solución salina (TBS) durante 2 hs a temperatura ambiente y se incubaron con la dilución apropiada del anticuerpo de conejo anti-IgG humana (Abcam, Reino Unido) durante 1 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con una dilución apropiada de inmunoglobulina anti-conejo de cabra policlonal marcada con HRP (DAKO, Dinamarca) durante 1 hs a temperatura ambiente.

Se detectaron bandas inmunorreactivas utilizando el kit de detección de transferencia Western ECL-Plus (Thermo Scientific). La membrana quimioluminiscente se expuso a una película Kodak BioMax MS (Kodak, Rochester, NY). Los lavados entre los pasos se realizaron con TBS con 0,05%(v/v) de Tween 20 (TBS-T). Las diluciones se prepararon en TBS-T con leche descremada al 0,5%(p/v).

### **7.3. Cuantificación por ELISA del anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

El ELISA indirecto se realizó en placas de 96 pocillos (Greiner Bio One, Kremsmünster, Austria). Se cubrió cada pocillo de la placa con 50 ng de una solución de rhIFN- $\alpha$ 2b en buffer carbonato/bicarbonato 50 mM (pH 9,6) y se incubó durante 1 hs a 37°C y luego a 4°C toda la noche. Después de bloquear 1 hs a 37°C con 200  $\mu$ l/pocillo de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 14 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), la placa se incubó 1 hs a 37°C con diluciones seriadas al 1/2 del anticuerpo quimérico estándar o con las muestras tomadas de los dispositivos microfluídicos o botellas-T. Luego, las placas se incubaron con una inmunoglobulina policlonal de conejo anti-IgG humana adecuadamente diluida (DAKO, Dinamarca) durante 1 hs a 37°C. Finalmente, se añadió a los pocillos la inmunoglobulina policlonal de cabra anti-conejo marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluida 1:2000. Después de 1 hs de incubación, las placas se incubaron durante 10 minutos con solución de sustrato (3 mg/ml de o-fenilendiamina, 0,12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer fosfato-citrato 50 mM). La

absorbancia se midió a 492 nm con un lector de placas (Labsystems Multiskan MCC/340, Finlandia). Entre cada paso, las placas se lavaron 6 veces con 200  $\mu$ l/pocillo de PBS con Tween 20 al 0,05% (PBS-T). Se prepararon diluciones de las muestras y de anticuerpos en PBS-T con BSA al 0,1%. Como estándar se usó una curva de diluciones seriadas al 1/2 de 1000 ng/ml a 7,8 ng/ml del mAb purificado por afinidad a proteína A. El ensayo se reprodujo por triplicado.

## **7.4. Evaluación de los atributos de calidad del anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

### **7.4.1. Inhibición de la actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b por el anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

La actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b se determinó mediante su capacidad para inhibir el crecimiento de células Daudi (Nederman *et al.*, 1990; Ceaglio *et al.*, 2008). Por el contrario, el efecto neutralizante del mAb se evaluó como la capacidad de permitir el crecimiento celular. Los sobrenadantes de los dispositivos microfluídicos o de las botellas-T que contienen el anti-rhIFN-2 $\alpha$ b (scFv-Fc) se diluyeron en serie 1:2 y se preincubaron durante 2 hs a 37°C con un volumen igual de 20 U/ml de rhIFN- $\alpha$ 2b en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Después de eso, se añadieron células Daudi lavadas previamente ( $10^4$  células/pocillo) y las placas se incubaron a 37°C durante 96 hs. La proliferación celular se determinó usando CellTiter 96™ AQueous, un ensayo de proliferación celular no radiactivo (Promega, Madison, WI, EE. UU.).

Los valores de absorbancia se leyeron a 492 nm utilizando un lector de microplacas (Lab systems, Multiskan MCC/340, Finlandia) y se representaron gráficamente las curvas dosis-respuesta frente a las concentraciones de mAb, para determinar la IC<sub>50</sub> (concentración del mAb necesaria para inhibir el 50% de la actividad antiproliferativa máxima inducida por rhIFN- $\alpha$ 2b). El ensayo se reprodujo por triplicado. La concentración de mAbs en los sobrenadantes se determinó mediante ELISA indirecto específico. Para eso, se utilizó como estándar, una curva de dilución en serie al 1/2 de 2500 ng/ml a 19,5 ng/ml del anti-rhIFN-2 $\alpha$ b purificado por afinidad a proteína A.



### **7.4.2. Inhibición de la señalización de células de rhIFN- $\alpha$ 2b por el anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

Para evaluar la inhibición de la señalización de células por rhIFN- $\alpha$ 2b, se sembraron células reporteras HeLa Mx2/eGFP (Burgi *et al.*, 2011) en placas de 96 pocillos ( $10^4$  células/pocillo) y se incubaron durante 24 hs a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Esta línea celular fue generada en el Laboratorio de Cultivos Celulares, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL (Burgi *et al.*, 2011), introduciendo el gen reportero eGFP (proteína de fluorescencia verde mejorada) bajo el control del promotor Mx2 teniendo en cuenta que los genes Mx son inducidos rápida y específicamente por los IFN de tipo I (IFN-I). Los sobrenadantes del cultivo de células HeLa se descartaron y se agregaron diluciones en serie 1:2 de los sobrenadantes de los dispositivos microfluídicos o botellas-T que contienen anti-rhIFN- $\alpha$ 2b y se incubaron previamente durante 2 hs a 37°C con un volumen igual de 50 U/ml de rhIFN- $\alpha$ 2b. Luego, las células se incubaron durante 24 hs a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se tripsinizaron, se suspendieron cuidadosamente en 0,2 ml de PBS y luego se midió la expresión de eGFP por citometría de flujo.

La concentración de mAbs en los sobrenadantes se determinó mediante ELISA indirecto específico. Para ello, se usó como estándar, una curva de dilución en serie al 1/2 de 5000 ng/ml a 39,1 ng/ml del anti-rhIFN- $\alpha$ 2b purificado por afinidad a proteína A. La citometría de flujo se realizó en un citómetro Guava® Easy Cyte™ (MilliporeSigma, Hayward, EE. UU.). Este citómetro tiene un láser azul de 488 nm para acceder a los tintes fluorescentes de uso común y detectores para medir cinco parámetros diferentes: 3 canales fluorescentes y las 2 dispersiones de luz, lateral (SSC) y directa (FSC). Además, este equipo puede medir muestras de placas de 96 pocillos. La adquisición y el análisis de los datos se realizaron con el software Guava CytoSoft™ 3.6.1. Para cada muestra, se recolectaron 5000 eventos en el gating del diagrama de puntos FSC vs SSC. La calibración de flujo y la alineación óptica se realizaron con la ayuda de Fluorosferas de control de flujo (kit Guava® Check MilliporeSigma, Hayward, EE.UU.) antes de cada determinación. Las células fueron evaluadas para la señal de eGFP (significa intensidad de fluorescencia multiplicada por el porcentaje de células positivas para eGFP) que es altamente proporcional a los niveles de ARNm (Paillusson *et al.*, 2005).

Se determinaron las relaciones entre la absorbancia media de los pocillos incubados en presencia de cada mAb-citoquina preincubada y la absorbancia media de los pocillos incubados sólo en presencia de la citoquina. Estas proporciones se representaron gráficamente en las curvas dosis-respuesta frente a las concentraciones del mAb. La potencia del anti-rhIFN- $\alpha$ 2b se determinó como la concentración de mAb necesaria que produjo la inhibición del 50% de la fluorescencia máxima utilizando células HeLa Mx2/eGFP (FRC<sub>50</sub>) inducida por rhIFN- $\alpha$ 2b. Los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces.

### **7.4.3. Inhibición de la actividad antiviral de rhIFN por el anti-hIFN- $\alpha$ 2b**

Para evaluar la actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b, se utilizó un ensayo basado en la línea celular MDBK (ATCC CCL-22) desafiada con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) cepa Indiana (ATCC VR-158). Brevemente, las células MDBK se cultivaron durante la noche en placas de 96 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo). Al día siguiente, se preincubaron con diluciones seriadas 1:2 de mAb de los dispositivos microfluídicos o botellas-T durante 2 hs a 37°C con un volumen igual de 4 U/ml de rhIFN- $\alpha$ 2b y se agregaron a cada pocillo que contenía las células. Después de un período de incubación de 6 hs, se eliminó el sobrenadante y se añadió a cada pocillo una suspensión de VSV apropiada (que genera un efecto citopático del 100% después de 24 hs). Después de incubar durante toda la noche, las células viables se midieron mediante el método de tinción con violeta cristal.

Se representó gráficamente en una curva dosis-respuesta la absorbancia media de la relación (anticuerpo-citoquina preincubada / citoquina libre) frente a la concentración del mAb y se calculó la potencia de cada muestra. La potencia se determinó como la concentración del mAb que inhibe el 40% de la actividad antiviral (IC<sub>40</sub>) inducida por rhIFN- $\alpha$ 2b. Los ensayos se reprodujeron por triplicado (variación intraensayo) y se repitieron dos veces (variación interensayo).

#### 7.4.4. Determinación de constantes de afinidad del anti-rhIFN- $\alpha$ 2b

Se utilizó un ELISA competitivo considerando el efecto bivalente descrito por Friguet y col. (Friguet *et al.*, 1985) para determinar las constantes de afinidad ( $K_A$ ) de los complejos producidos entre el rhIFN- $\alpha$ 2b y los mAbs (Stevens, 1987). Para la competencia, se preincubaron diferentes concentraciones de rhIFN- $\alpha$ 2b soluble durante toda la noche a temperatura ambiente con una cantidad constante de mAb. Luego, se incubó una alícuota de la mezcla en placas de 96 pocillos recubiertas en primer lugar con 50 ng de la citoquina diluida en buffer bicarbonato (50 mM, pH 9,6) por pocillo y luego se bloqueó los sitios de unión no específicos con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (p/v) (PBS-BSA). Las placas se incubaron durante 2 hs a 37°C. Después de lavar con PBS con 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T), se detectaron los mAbs unidos utilizando inmunoglobulina anti-humana de conejo policlonal adecuadamente diluida (DAKO, Dinamarca) durante 1 hs a 37°C, seguido de una dilución adecuada de inmunoglobulina de cabra anti-conejo marcada con peroxidasa (DAKO, Dinamarca). Los conjugados de enzima se diluyeron adecuadamente con PBS-T con BSA (PBS-T-BSA) al 0,1% (p/v) y se incubaron durante 1 hs a 37°C. Las placas se lavaron y se incubaron en la oscuridad con buffer fosfato de ácido cítrico 50 mM, pH 5,3, que contenía 3 mg/ml de o-fenilendiamina y 0,12% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solución de sustrato) y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Los lavados entre los pasos se realizaron 6 veces con PBS-T. La absorbancia se midió a 492 nm con un lector de placas (Labsystems Multiskan MCC/340, Finlandia). El ensayo se reprodujo por triplicado. La constante de afinidad se determinó mediante análisis de gráfico de Scatchard.

## 8. Cuantificación de Glucosa y Lactato del medio de cultivo del DMGV

Se cuantificó la concentración de glucosa en el medio de cultivo consumido por las células durante los 18 días del experimento en el DMGV y en las botellas-T. Para esto se utilizó el medidor Accu-Chek Performa (Roche, Alemania) con las tiras reactivas Accu-Chek Performa

para mediciones cuantitativas de glucosa. Con una micropipeta se colocó una gota de 0,6  $\mu$ l como mínimo en el borde delantero de la tira reactiva, el resultado de cada medición apareció en la pantalla del medidor. También se midió la concentración de glucosa en el medio de cultivo de crecimiento y en el de producción sin uso.

La concentración de lactato en el medio de cultivo consumido se cuantificó con el kit Lactate (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El lactato de la muestra es oxidado por la enzima específica lactato oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado en esta reacción es luego utilizado por la peroxidasa para generar un cromógeno. La intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de L-lactato en la muestra y se determina midiendo el aumento de absorbancia a 540-550 nm. El Calibrador A plus es procesado de la misma manera que las muestras y a partir de él se calcula el factor correspondiente. la reacción es lineal hasta 130 mg/dl. Este kit tiene un límite de detección de 0,7 mg/dl y un límite de cuantificación de 1,8 mg/dl. Se siguió el protocolo del kit en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia de las muestras a 545nm en un lector de placas multiwell (Labsystems Multiskan MCC/340, Finlandia).

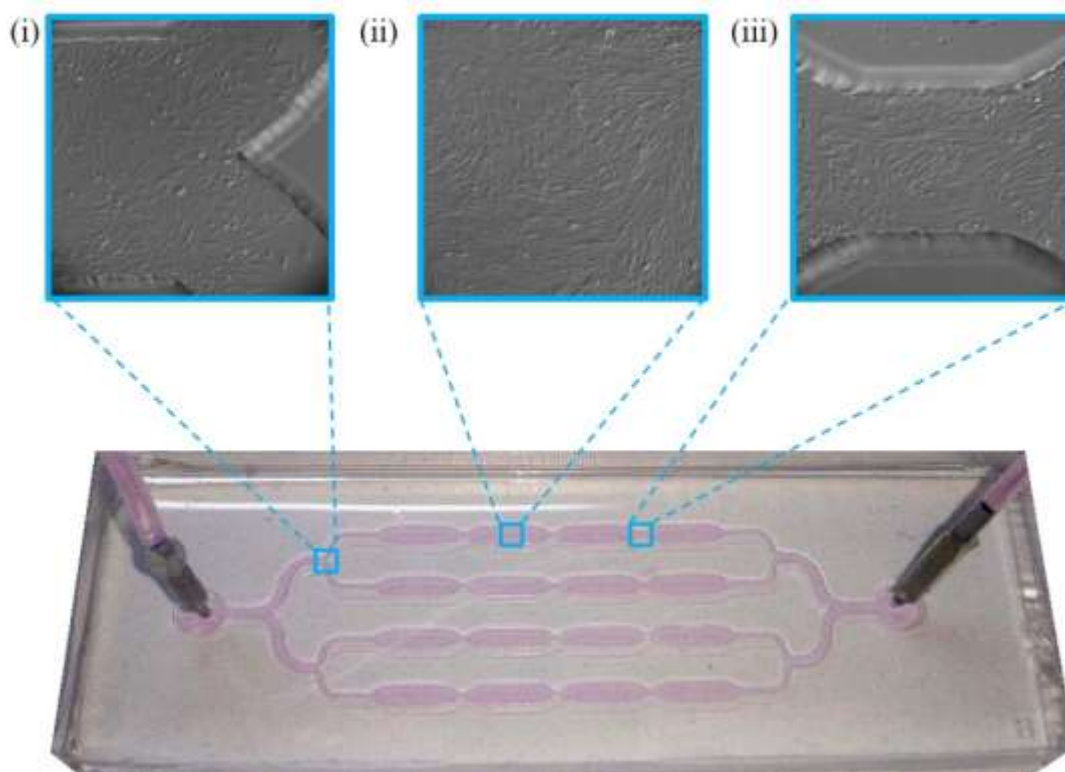
# Resultados

---

## 1. Dispositivos de microfluídica de pequeño volumen (DMPV)

### 1.1. DMPV de 4 canales

El cultivo de células adherentes en superficies de vidrio o plástico generalmente requieren un recubrimiento hidrofílico cargado para fomentar la reticulación de la matriz extracelular, que es necesaria para la unión y expansión celular (Barbulovic-Nad *et al.*, 2010). Estudios anteriores en nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con plasma de O<sub>2</sub> y el recubrimiento de microcanales con poli-D-lisina promueve adecuadamente la adhesión celular al piso de un dispositivo de microfluídica con distintas configuraciones de serpentina de células HEK-293T (Peñaherrera *et al.*, 2016). Pese a que se lograron cultivar células en este



**Figura 20: Dispositivo de PDMS/vidrio con recubrimiento de poli-D-lisina.** Se muestra el DMPV con los canales de entrada y salida más anchos que los canales del centro, lleno con medio de cultivo. E imágenes de microscopía óptica de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) de los microcanales, al día 7 de cultivo de una monocapa de células en (i) una bifurcación del canal de entrada, (ii) en una cisterna y (iii) en un conector de cisternas. Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio invertido Olympus a un aumento de 100X. Las células se cultivaron en las siguientes condiciones: flujo discontinuo de DMEM, atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C.

dispositivo, el diseño de los bordes lineales y ángulos rectos de los canales causaban una mala circulación del flujo, que llevaba a una distribución no homogénea de las células y las burbujas que quedaban atrapadas no se desprendían con facilidad. Dadas las limitaciones del dispositivo creado anteriormente, se diseñó un nuevo dispositivo de microfluídica de pequeño volumen (DMPV) con 4 canales y 16 cisternas con un volumen total de 32,22  $\mu\text{l}$ , cuyos canales variaban de mayor ancho en la entrada y salida, a un menor ancho en el centro de los canales, lo que produce menos resistencia y con bordes curvos que permiten un flujo con distribución homogénea a lo largo del DMPV (**Figura 20**).

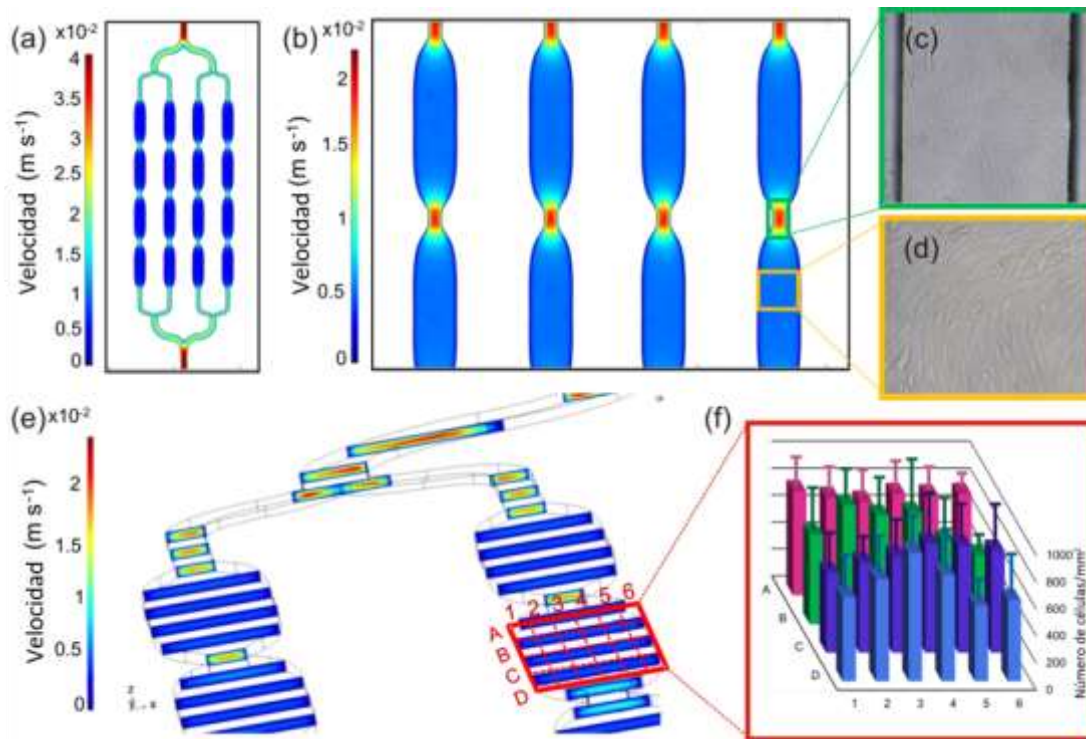
### 1.1.1. Modelado computacional de flujo en el DMPV de 4 canales

La configuración geométrica de los microcanales diseñados se planificó para optimizar la velocidad de flujo del medio de cultivo para que sea homogénea a través de la superficie de cultivo celular en cada una de las cuatro canales en paralelo con cuatro series de cisternas cada uno (**Figura 21**). El canal de entrada se bifurca en dos niveles disminuyendo su ancho y a su vez cada nivel desemboca en dos microcanales con cisternas, después de lo cual los flujos se unen de forma simétrica aumentando su ancho para desembocar en una sola salida del DMPV.

Para el llenado y cambios de medio de cultivo en el DMPV, se utilizó el método de bombeo del flujo inducido por gravedad en el sistema microfluídico abierto, generando un flujo pasivo por la diferencia de altura de los reservorios, como se ha realizado en otros trabajos (Huang *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2014; Shemesh *et al.*, 2015).

Las velocidades de flujo en el DMPV (**Figura 21.a y 21.b**) y el esfuerzo o tensión de corte (**Figura 22**) que fueron modeladas, mostraron áreas de flujo reducido (áreas azules) en las cisternas con un entorno adecuado para el crecimiento celular, lo que permite la generación de una monocapa celular homogénea continua en el DMPV (**Figura 21.c y 21.d**). Aunque se observan perfiles de velocidad más bajos en las cisternas de  $5 \times 10^{-3}$  m/seg en comparación con los canales de  $2 \times 10^{-2}$  m/seg (**Figura 21.b y 21.e**), se ha informado que el flujo laminar general asegura un transporte de masa difusora consistente que puede dar como resultado un microambiente uniforme para el crecimiento celular (Huang *et al.*, 2010). Para evaluar si a los 7 días de cultivo las células sembradas crecen distribuidas homogéneamente en las cisternas, se realizó una cuadrícula imaginaria para separar en cuadrantes las cisternas, se contó el número

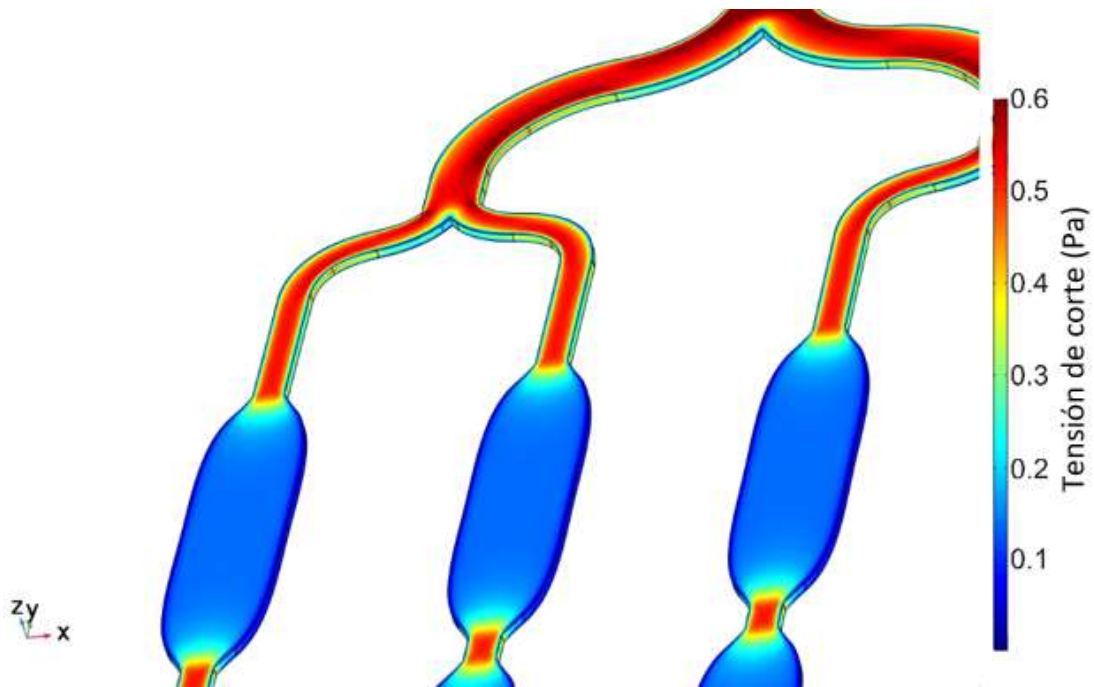
de células en cada cuadrante de la cuadrícula y se determinó la desviación promedio y estándar entre cada cuadrante (**Figura 21.e y 21.f**). Como se esperaba, el análisis estadístico que compara la densidad de las células en los cuadrantes en diferentes cisternas del DMPV no mostró diferencias significativas en la distribución celular.



**Figura 21:** (a, b) Magnitud de velocidad máxima (m/seg) a 75 μm de altura en un DMPV en una simulación 3D (Comsol 5.2a). Proliferación de células CHO-K1 en un DMPV en (c) un conector de microcanal y (d) una cisterna después de 7 días de cultivo. (e) Magnitud de la velocidad en la simulación de microcanales 3D y (f) distribución promedio del número de células en cuadrantes de cuatro cisternas. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

El esfuerzo/tensión de corte calculada (**Figura 22**) muestra valores en el rango de 0,1 a 0,6 Pa. Las áreas de tensión de corte reducido (áreas azules) se muestran en las cisternas y los valores más altos de tensión de corte (áreas rojas) en los canales y coinciden con la simulación de velocidad de flujo, valores que están dentro de los observados en el entorno fisiológico del epitelio ovárico, donde la tensión de corte está en el rango de 0,014 Pa a 1,1 Pa (Avraham-Chakim *et al.*, 2013).





**Figura 22:** Tensión de corte superficial (Pa) en los microcanales de un DMPV a una velocidad de flujo de  $3,28 \text{ mm}^3/\text{seg}$  de una simulación 3D (Comsol 5.2a).

Estudios previos se ha observado que el flujo continuo podría afectar la morfología y la estructura de las células adherentes, lo que lleva a un crecimiento heterogéneo (Azuaje-Hualde *et al.*, 2017). Para minimizar el estrés en las células cultivadas, en lugar del flujo continuo, se adoptó un protocolo periódico de intercambio de medios con ciclos pulsados a intervalos de 24 hs. Esto permitiría un tiempo de residencia suficiente de los factores liberados por las células que favorecen la estabilidad, el crecimiento y la comunicación célula-célula. Al mismo tiempo, el flujo de medios pulsados proporciona los nutrientes necesarios y elimina la acumulación de subproductos metabólicos (Azuaje-Hualde *et al.*, 2017). Los estudios de flujo realizados hasta aquí nos demuestran la factibilidad del sistema propuesto para cultivar células homogéneamente.

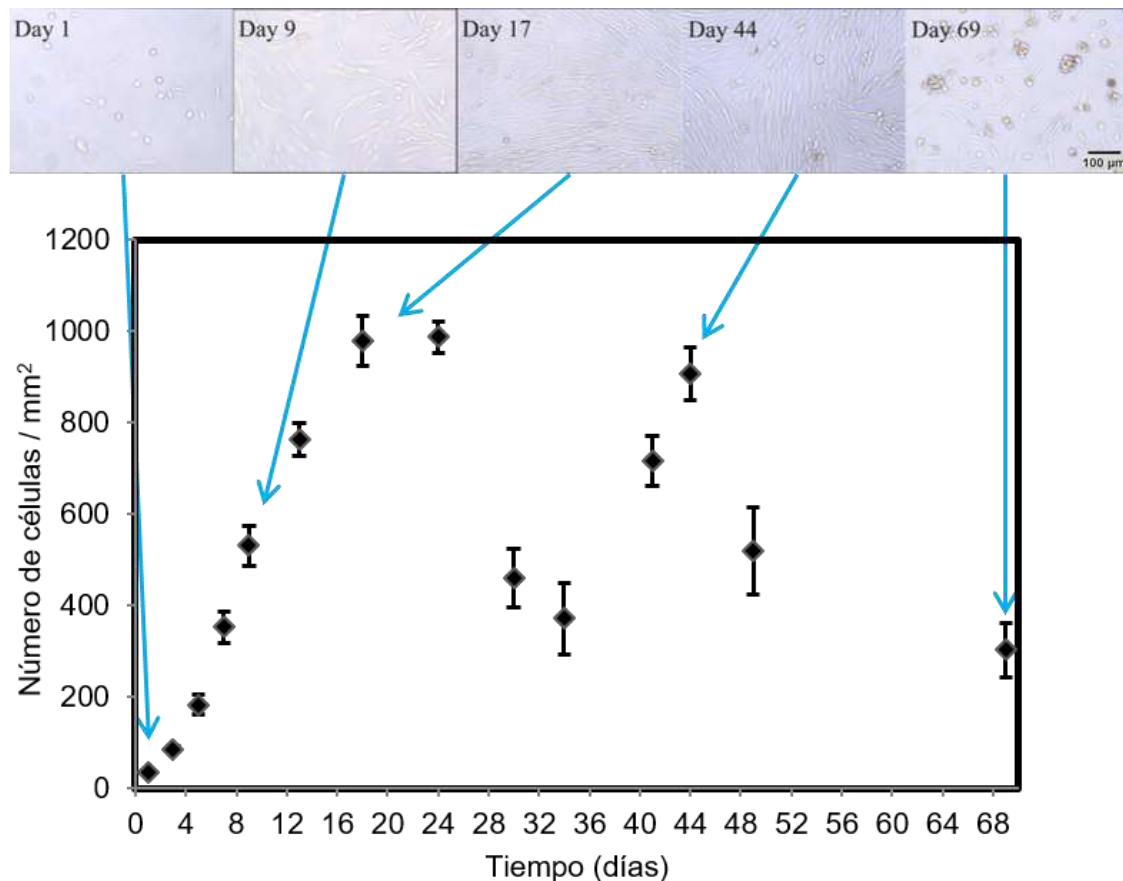
### 1.1.2. Cultivo celular en los DMPV de 4 canales

En este trabajo se realizó el estudio de la adhesión de células CHO-K1 en DMPVs de PDMS de 16 cisternas en 4 canales paralelos, con un volumen interno de 32,22  $\mu\text{l}$ . La elección de las células CHO-K1 se debe a que son células que se utilizan para la expresión de proteínas de interés farmacéutico. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/ml de medio de cultivo en los DMPVs. Una vez que las células se adhirieron al piso de los microcanales en forma de monocapa en todo el DMPV al día 7 de cultivo (**Figura 23**), se fue renovando cada 24 hs con 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo. Este volumen total se utilizó ya que se incluyó al volumen del dispositivo, el volumen muerto de los reservorios de entrada y salida del DMPV.

La morfología celular es una característica importante en las células adherentes y es un determinante importante del crecimiento y la función celular (Jaccard *et al.*, 2014). Para establecer las condiciones óptimas para el cultivo celular en los DMPVs, se sembraron las células y se estudió su proliferación en un cultivo a largo plazo mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía de campo claro (**Figura 23 y 24**). En todos los casos, los DMPVs fueron tratados con plasma de  $\text{O}_2$  y recubiertos con poli-D-lisina. Luego, se sembraron las células a una concentración inicial de  $2 \times 10^5$  células/ml, mostrando un amplio rango de diámetros (entre 12,2 y 22,5  $\mu\text{m}$ ) después de la adhesión celular al piso del DMPV. Las imágenes obtenidas indican que las células cambiaron de su morfología esférica característica de los cultivos en suspensión observados en el día 1, a la morfología fusiforme de propagación desde el día 3 con apariencia de bordes que sugieren una fuerte adhesión al piso en monocapa (**Figura 24**).

El crecimiento celular se determinó cuantificando el número de células por  $\text{mm}^2$  en el tiempo de cultivo mediante análisis de imágenes tomadas a partir de microscopía de campo claro (**Figura 23**). Se observó un crecimiento lento del número de células CHO-K1 en los DMPVs durante las primeras 48 hs, esto puede deberse al tiempo de adaptación al nuevo sistema que necesitan las células. Del día 3 al 7 se observó una proliferación logarítmica con una tasa de crecimiento de  $0,0148 \text{ hs}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 46,82 hs ( $R^2 = 0,99$ ). Después de 7 días de cultivo con cambios diarios de medio, las células con una morfología fusiforme, alcanzaron casi el 100% de confluencia en las cisternas (**Figura 23 y 24**). Las células exhibieron una disposición de monocapa hasta el día 21 de cultivo, en cuyo momento se visualizó por primera vez la formación de grupos de células desprendidas del sustrato. Desde el día 24 hasta el día 30, el número de células disminuyó y en el día 31 una fracción significativa de las células se lavaron

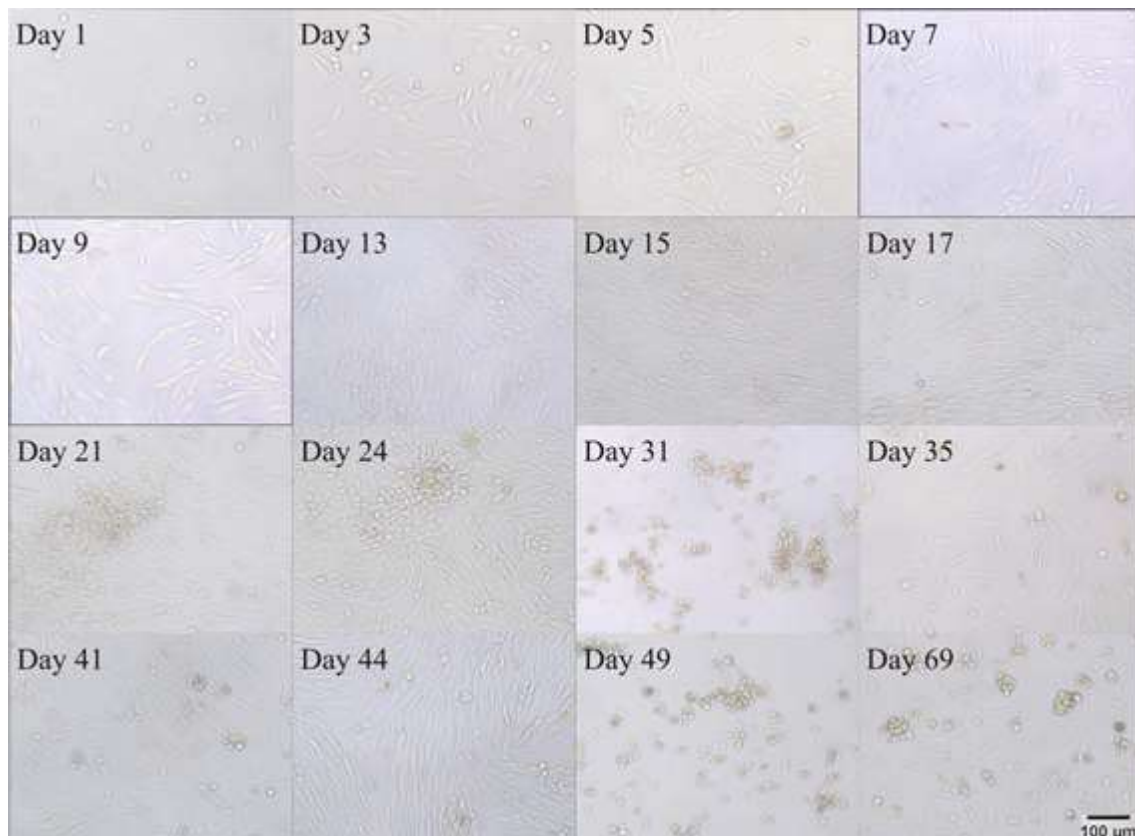
del sistema (**Figura 24**). Las que permanecieron dentro de los microcanales presentaron signos de estrés celular que mostraban una forma esférica y un citoesqueleto desorganizado. Luego, desde el día 35 hasta el día 41 de cultivo, las células comenzaron a cubrir la superficie nuevamente, para formar monocapa en el día 44 (**Figura 24**).



**Figura 23:** Densidad celular de la línea CHO-K1 cultivada durante 69 días en el DMPV. En la parte superior se muestran imágenes de microscopía de campo claro (aumentos de 100X, barra: 100 µm) de las células CHO-K1 adheridas en las cisternas de los microcanales. Las barras de error indican determinaciones del error estándar de la media (SEM).

En el día 49, se observaron signos de estrés y pérdida de adhesión celular a la superficie, mientras que en el momento en que se terminó el cultivo en el día 69, pocas células nuevas se adhirieron, distribuyeron y crecieron mostrando los rasgos morfológicos de las células viables, incluidas la orientación superficial en extensión, alargamiento del cuerpo celular y adherencia al

sustrato (Zhu *et al.*, 2004) (**Figura 23 y 24**). Estos resultados confirman que la configuración geométrica de los microcanales del DMPV otorgaría el flujo laminar y perfil de velocidad reducido en las cisternas. Lo que resultaría en un microambiente adecuado para el crecimiento y proliferación de células adherentes a largo plazo utilizando la estrategia de bombeo pasivo en ciclos de 24 hs. Además, el sistema es adecuado para mantener ciclos sucesivos de cultivo celular durante un período prolongado sin la necesidad de una nueva inoculación, lo que permite el cultivo continuo con el mismo inóculo sin necesidad de realizar un repique.



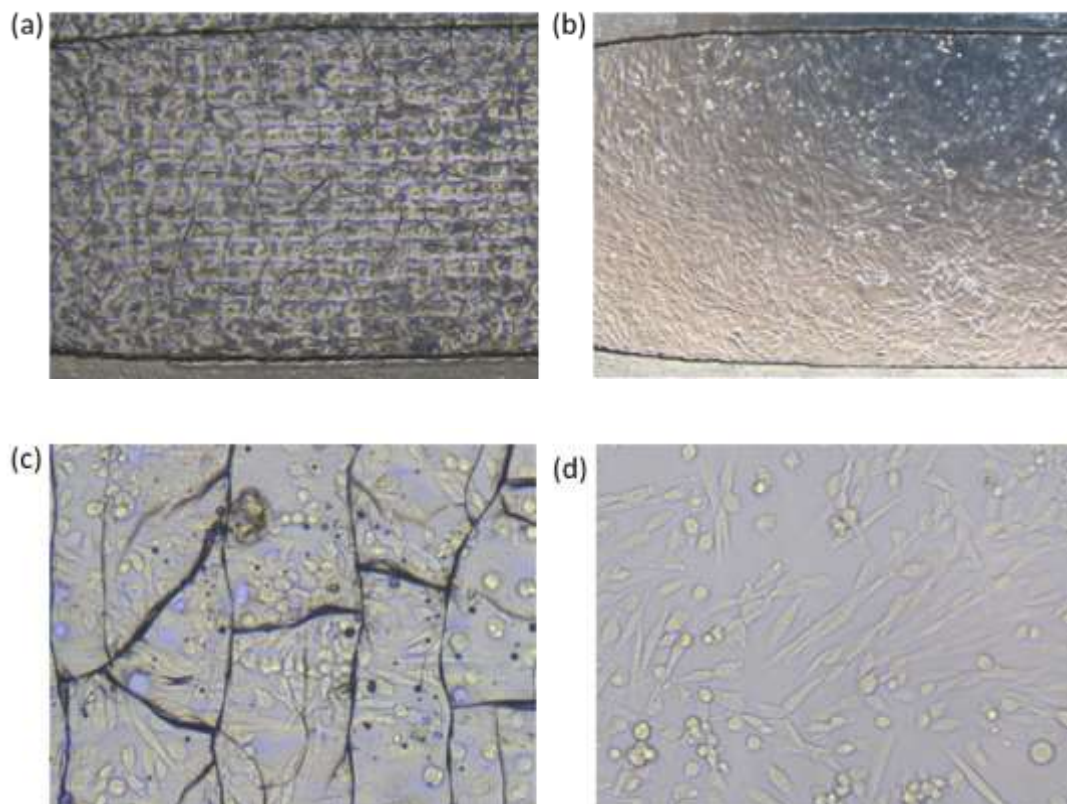
**Figura 24:** Imágenes de microscopía de campo claro (aumento de 100X) del crecimiento y la proliferación de células CHO-K1 en microcanales recubiertos de poli-D-lisina por el lapso de 69 días. Aumento 100X, Barra: 100 $\mu$ m.

### 1.1.2.1. Comparación de los cultivos celulares en los DMPV de 4 canales con y sin Ablación Láser

Ya se ha comentado que el tratamiento con plasma de O<sub>2</sub> y posterior recubrimiento de los microcanales con poli-D-lisina favorece la adhesión celular al piso de un dispositivo microfluídico. Para evaluar si es posible estabilizar aún más la adhesión celular y mejorar la distribución de las células en el piso de los DMPVs, además del tratamiento con plasma y poli-D-lisina, se modificó la superficie del vidrio con ablación láser. Este tratamiento forma una rugosidad superficial de micrómetros en el vidrio de dos microcanales del DMPV. En un estudio (Jeon *et al.*, 2015) se realizó un tratamiento de ablación láser para modelar cráteres a microescala en cuarzo. Estos cráteres afectaron la adhesión y la distribución de fibroblastos, su morfología celular, migración y la localización de los mismos (Jeon *et al.*, 2015). En otro trabajo de cultivo de células U87 en dispositivos microfluídicos, la velocidad de migración celular, calculada como la distancia total recorrida en el tiempo, demostró que las células migraron más lentamente en una superficie de poliestireno con ablación láser de 10 µm en comparación con la misma superficie sin el tratamiento. La velocidad de migración más lenta en la superficie sometida a ablación láser podría deberse a un aumento en la adhesión a la superficie. Por otro lado, encontraron una circularidad de las células U87 significativamente mayor en la superficie de poliestireno plano en comparación con el ablacionado, por lo que este tratamiento afecta la morfología de las células (Hisey *et al.*, 2019).

Se evaluó y comparó la adhesión de las células sobre el vidrio con y sin la modificación por ablación láser. Se sembraron células CHO-K1 y se cultivaron en estos DMPVs por 18 días. Las células se adhirieron adecuadamente al vidrio tratado con ablación láser al igual que al no tratado (**Figura 25**). El problema que se presentó en estos DMPVs fue que en las microfotografías a un aumento de 40X, la monocapa celular que se formó al día 6 de cultivo, no se pudo visualizar bien por la red de microfisuras de geometría variable, generadas en la superficie del vidrio por la ablación láser (**Figura 25.a**). Los estudios de cuantificación de células en los microcanales tratados no se pudieron realizar por la complejidad de las microporosidades que interferían con el análisis de imágenes de las células en las microfotografías de campo claro (**Figura 25.c**). Al darle al vidrio una textura, quizás se mejoraría la adhesión celular por inducción mecánica, sin embargo, es posible que el tratamiento con plasma de O<sub>2</sub> y poli-D-lisina hayan compensado esta ventaja, ya que no se observó mejora evidente en la adhesión celular con ablación láser

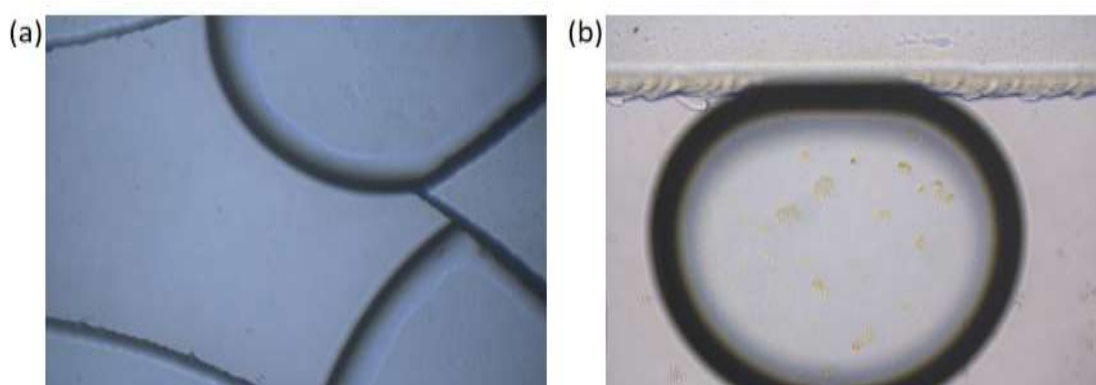
comparado con el vidrio sin ablación láser. Por otro lado, el hecho de que la textura generada dificulta el análisis de las imágenes de las células para un seguimiento continuo de las mismas, se decidió realizar los siguientes dispositivos de microfluídica sin tratamiento con ablación láser por la dificultad que se presenta en la cuantificación de células.



**Figura 25:** Microfotografías de los dispositivos de microfluídica en el día 6 de cultivo de CHO-K1, con el vidrio tratado o no con ablación láser. (a) Cisterna con el piso tratado con ablación láser (40x; contraste de fase), (b) Cisterna con el piso no tratado con ablación láser (40x; contraste de fase), (c) Detalle de una cisterna con el piso tratado con ablación láser (100x; campo claro), (d) Detalle de una cisterna con el piso no tratado con ablación láser (100x; campo claro).

### 1.1.2.2. Comparación de los cultivos celulares en los DMPV de 4 canales con piso de vidrio y de PDMS

Aunque los dispositivos de microfluídica que se diseñaron hasta aquí presentan una gran robustez, el soporte de vidrio es propenso a fisurarse, por tal motivo se fabricaron DMPVs con el mismo diseño de 4 canales y 16 cisternas de PDMS uniéndose irreversiblemente por exposición al plasma de oxígeno a un piso de PDMS. Se sembraron células CHO-K1 y se cultivaron durante 7 días en estos DMPVs, las cuales se adhirieron con la misma efectividad al piso de PDMS que al de vidrio. Sin embargo, la unión de PDMS-PDMS es más débil que la de PDMS-vidrio y los sucesivos cambios de medio de cultivo realizados en los DMPVs totalmente de PDMS condujo, a que de a poco se vayan despegando y que con los días comienzan a aparecer burbujas en los microcanales. Una vez observado este fenómeno se probaron estos mismos DMPVs PDMS-PDMS, pero sin unión entre ellos por plasma de oxígeno, sino que se juntaron por presión con un soporte de acrílico que permitían que el DMPV fuera reutilizable. Si bien los dispositivos de microfluídica individualmente no son muy costosos, producirlos en gran cantidad lleva a un gran costo. La ventaja de este tipo de DMPV es que se puede reutilizar el PDMS al no estar pegado, por este otro motivo producir dispositivos microfluídicos con capacidad de ser reutilizables brindarían una gran ventaja.



**Figura 26:** Microfotografías del dispositivo de microfluídica reutilizable en el soporte de acrílico en el día 1 de cultivo de células CHO-K1. (a) Burbujas en la bifurcación de dos canales, (b) Burbujas en una cisterna. (Aumento 100x, campo claro).

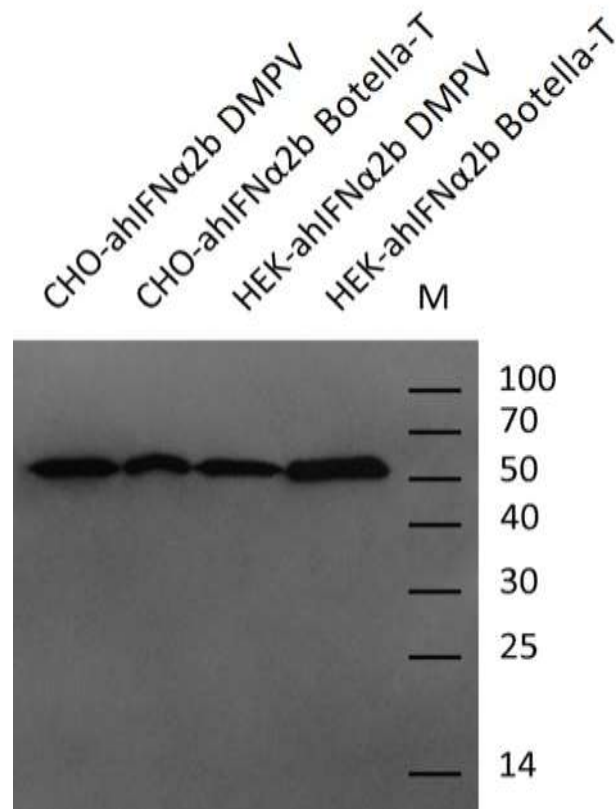
Se sembraron y cultivaron células CHO-K1 durante 9 días en el DMPV reutilizable, pero a lo largo del tiempo de cultivo no fue posible eliminar las burbujas de los microcanales. El soporte de acrílico finalmente no logró un sellado óptimo en todo el DMPV, lo que condujo a la entrada de aire y formación de burbujas (**Figura 26**). La formación de burbujas es un problema constante en la microfluidica y los dispositivos de microfluídica reutilizables probados en este trabajo no se escapan de este problema. Por todas estas dificultades, se siguieron empleando los DMPVs de PDMS-vidrio sin tratamiento con ablación láser.

### **1.1.3. Producción de anticuerpos monoclonales en los DMPV de 4 canales**

Una vez establecido que las células CHO-K1 pueden cultivarse adecuadamente en los DMPVs de PDMS-Vidrio, se evaluó el cultivo de dos líneas celulares que expresan el anticuerpo quimérico anti-hIFN- $\alpha$ 2b, el cual tendría potenciales aplicaciones para la terapia de enfermedades autoinmunes (Attallah *et al.*, 2017). Las líneas celulares CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b se cultivaron en tres DMPVs independientes en las mismas condiciones de cultivo previamente caracterizadas. Ambas líneas celulares se cultivaron en el medio de crecimiento durante 3 y 5 días respectivamente, hasta alcanzar casi el 100% de confluencia. A continuación, el medio de crecimiento se cambió por el medio de producción que tiene menor porcentaje de suero. Cada día se cambió el volumen total de medio de cultivo de los DMPVs. Se recogió a la salida del dispositivo el medio utilizado y se renovó con medio fresco, dejando a los canales siempre con medio de cultivo para que no entre aire en los DMPVs.

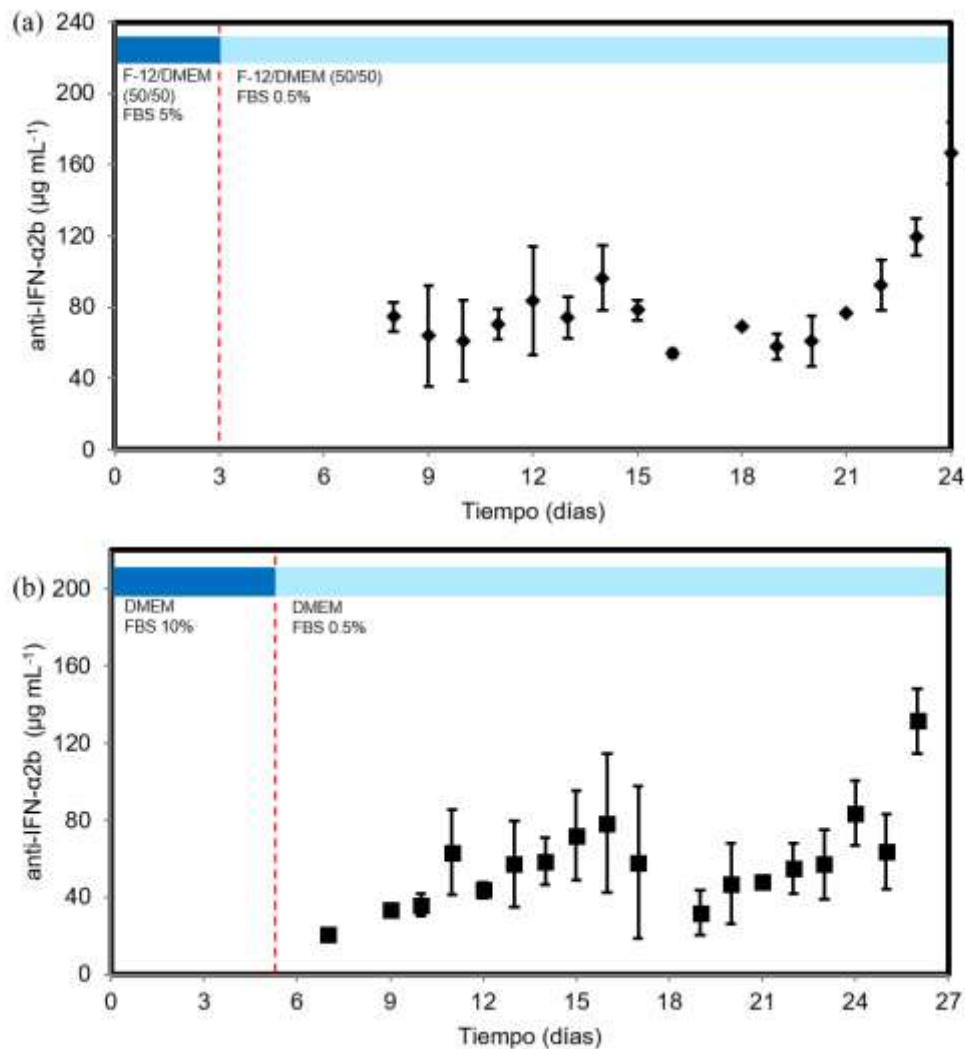
Del medio de cultivo utilizado cada día, se tomó una muestra para confirmar la producción del anti-hIFN- $\alpha$ 2b tanto en el cultivo de los DMPVs o en el cultivo en botellas-T, mediante un análisis de transferencia Western, se detectó el mAb en los cuatro casos. (**Figura 27**). Por otro lado, con las muestras recogidas se determinó la concentración de anticuerpos funcionales mediante ELISA indirecto específico (**Figura 28**).





**Figura 27:** Análisis de transferencia Western del anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido en el cultivo de los DMPV o en el cultivo en botellas T. Masa molecular aparente de scFv-Fc: 52,8 kDa. M: marcador estándar proteico Blue Plus<sup>®</sup> II (kDa) (Transgen Biotech, China). SDS-PAGE seguido de western blot para comparar el perfil de masa molecular de cada mAb scFv-Fc.

Para determinar la productividad de mAbs en el tiempo en los DMPVs, se monitoreo la concentración de anti-hIFN- $\alpha$ 2b producida diariamente por CHO-ahIFN $\alpha$ 2b (**Figura 28.a**) y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b (**Figura 28.b**) durante 24 y 26 días simultáneamente en los tres DMPVs independientes. En los primeros 2 días, la concentración de mAb secretada aumentó a aproximadamente 64  $\mu$ g/ml para CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y 33,3  $\mu$ g/ml para HEK-ahIFN $\alpha$ 2b, el momento en el que ambas líneas celulares alcanzaron una meseta de expresión de mAbs. Posteriormente, la producción aumentó nuevamente desde el día 19 hasta el final del cultivo. Durante la fase de cultivo de producción, se observó un aumento progresivo en las señales de estrés celular en la morfología celular, lo que se espera debido a la concentración reducida de suero en el medio de cultivo de producción. Esto puede afectar el crecimiento y la proliferación celular, redirigiendo el metabolismo celular principalmente a la producción de anticuerpos.



**Figura 28:** Nivel de concentración promedio de anti-hIFN- $\alpha$ 2b cosechado en ciclos de 24 hs de intercambio periódico de medios de líneas celulares (a) CHO ahIFN $\alpha$ 2b y (b) HEK ahIFN $\alpha$ 2b cultivadas en los DMPVs. Las barras de error indican determinaciones del SEM de tres experimentos independientes.

Este estudio demuestra que la concentración promedio del mAb producido por células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b fue mayor que en células HEK-ahIFN $\alpha$ 2b y que las CHO-ahIFN $\alpha$ 2b alcanzaron el valor máximo (166,4  $\mu\text{g/ml}$ ) el último día de cultivo (**Figura 28.a**, día 26). Es importante tener en cuenta que los cultivos de células adherentes en botellas-T también mostraron niveles de expresión significativamente más altos de mAbs producidos por la línea celular CHO que por HEK (Attallah *et al.*, 2017).

La producción promedio de anti-hIFN- $\alpha$ 2b observada en los DMPVs utilizando ambas líneas celulares fue superior en comparación con la obtenida en botellas-T en paralelo, con valores 1,36 y 1,70 veces más altos en CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b, respectivamente (**Tabla 1**).

Además, la productividad general en picogramos de anti-hIFN-a2b por célula y la productividad por día determinada en los DMPVs en ambas líneas celulares fueron más altas en comparación con la obtenida en botellas-T en paralelo, con valores de 5,89 y 7,31 veces mayor en CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b, respectivamente. Estos resultados sugieren que existen ventajas en el cultivo de células adherentes en los DMPVs, que muestran un aumento en el rendimiento del producto durante períodos de tiempo más largos en comparación con escalas más altas en condiciones de cultivo.

**Tabla 1:** Producción promedio, productividad y productividad por día de mAbs de las líneas celulares CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b en DMPVs y botellas-T.

Línea Celular	Producción promedio de mAbs			Productividad de mAbs			Productividad de mAbs por día		
	DMPV ( $\mu$ g/ml)	BotellaT ( $\mu$ g/ml)	Proporción (DMPV/Botella-T)	DMPV (pg/cél)	BotellaT (pg/cél)	Proporción (DMPV/Botella-T)	DMPV (pg/cél/día)	BotellaT (pg/cél/día)	Proporción (DMPV/Botella-T)
CHO-ahIFN $\alpha$ 2b	81,22	59,46	1,36	1120,28	118,92	9,4	70,02	11,89	5,89
HEK-ahIFN $\alpha$ 2b	54,72	32,27	1,70	754,76	64,54	11,7	47,17	6,45	7,31

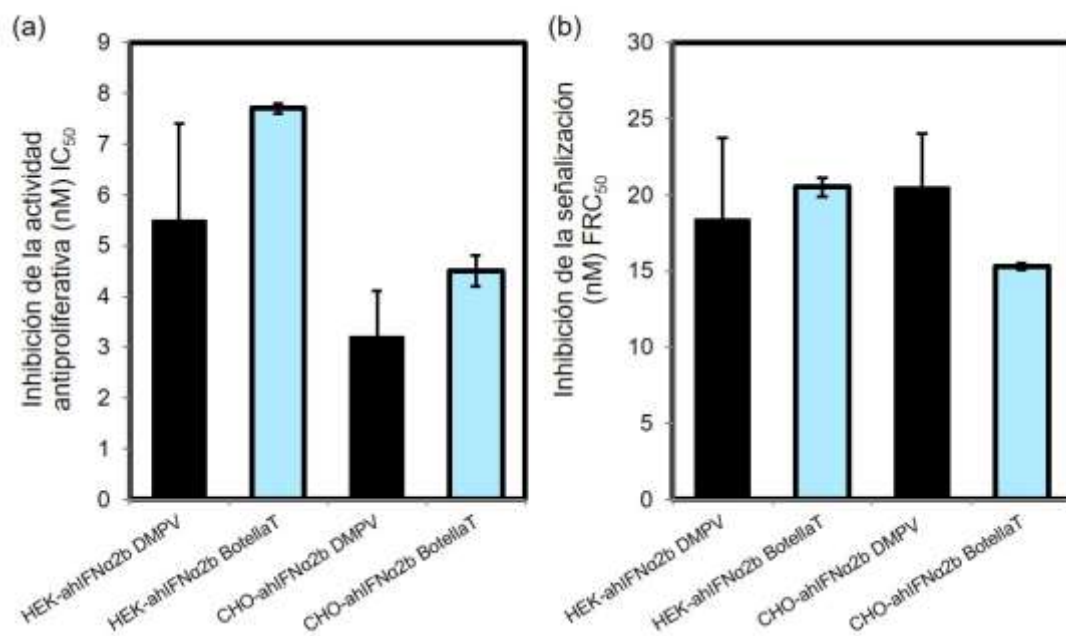
Aquí se demuestra que el cultivo celular en un dispositivo de microfluídica puede funcionar durante 69 días y que diferentes líneas celulares que expresan un nuevo mAb terapéutico pueden cultivarse al menos durante 24 días, logrando concentraciones significativamente mejores que las condiciones de cultivo estándar. Estos resultados respaldan la viabilidad del funcionamiento continuo del sistema a largo plazo y, por lo tanto, su uso potencial en la producción a escala piloto.

#### 1.1.4. Evaluación y comparación de los atributos de calidad del anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido en los DMPVs y en las botellas-T

Un parámetro importante a tener en cuenta al momento de desarrollar un sistema innovador para la producción de productos bioterapéuticos es si el proceso puede replicar las

propiedades biológicas de la molécula de referencia. Por este motivo, se evaluaron los atributos de calidad de los mAbs, específicamente la capacidad para inhibir la actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b o la señalización de rhIFN- $\alpha$ 2b por la acción del mAb producido en los DMPVs en comparación con el producido por las mismas líneas celulares usando el método de cultivo de células adherentes en botellas-T.

Para ello, se evaluó la capacidad de inhibición de la actividad antiproliferativa y de la señalización de células de rhIFN- $\alpha$ 2b de los mAbs producidos en los DMPVs comparado con el método tradicional de cultivo. La **Figura 29.a** muestra un gráfico de barras que representa la concentración de anticuerpos necesaria para inhibir el 50% de la actividad antiproliferativa de la citoquina ( $IC_{50}$ ) cuando las células Daudi se incuban con el anticuerpo producido por HEK-ahIFN $\alpha$ 2b y CHO-ahIFN $\alpha$ 2b utilizando los DMPVs o el método de cultivo convencional en botellas-T para células adherentes. La  $IC_{50}$  de los anticuerpos producidos en DMPVs no fue significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) a la  $IC_{50}$  de los anticuerpos producidos en las botellas-T determinado por ANOVA seguido del Test de Tukey.



**Figura 29:** Evaluación de los atributos de calidad de los mAbs producidos en DMPVs y en botellas-T. (a) Inhibición de la actividad antiproliferativa medida como la concentración de mAb necesaria para reducir el 50% de la potencia máxima de citoquina ( $IC_{50}$ ) usando células Daudi. (b) Inhibición de la señalización medida como la concentración de mAb necesaria para reducir el 50% de la fluorescencia ( $FRC_{50}$ ) usando células HeLaMx2 / eGFP. La barra de error representa el SEM.

Además, la capacidad del mAb para inhibir la señalización de rhIFN- $\alpha$ 2b se determinó mediante análisis de fluorescencia usando células indicadoras cuya expresión de eGFP está mediada por el promotor Mx inducible por rhIFN- $\alpha$ 2b. La **Figura 29.b** muestra un gráfico de barras de inhibición de señalización correspondiente a la concentración necesaria para reducir el 50% de la fluorescencia (FRC<sub>50</sub>) medida por citometría de flujo del mAb producido por HEK-ahIFN $\alpha$ 2b y CHO-ahIFN $\alpha$ 2b utilizando dispositivos microfluídicos o botellas-T. Al igual que en el experimento anterior, el FRC<sub>50</sub> de los mAbs producidos por ambas líneas celulares usando ambos métodos tampoco exhibió diferencias significativas ( $p > 0,05$ , Test de Tukey). Ésta es la primera vez que los atributos de calidad de bioterapéuticos producidos en dispositivos microfluídicos se prueban en paralelo con los producidos por el cultivo celular adherente en botellas-T. Estos resultados sugieren que la producción en dispositivos de microfluídica no altera significativamente la función biológica de los anticuerpos en términos de su capacidad de unión y neutralización de la citoquina, en comparación con los producidos con el método tradicional de cultivo de células adherentes.

## 1.2. DMPV multicámara de 20 canales

El diseño de los DMPV multicámara de 20 microcanales (**Figura 10**), se realizó con una entrada y una salida independiente para cada microcanal de 3  $\mu$ l (aprox.), cada uno con 6 cámaras con un volumen de 130 nL cada una, a diferencia de los DMPVs de 4 canales y 16 cisternas que poseen una entrada y una salida en común para todos los canales. En el DMPV multicámara se analizaron los efectos de concentraciones crecientes de SFB en la línea celular HEK-293T durante 10 días de cultivo celular. Este análisis nos acerca a las condiciones óptimas de SFB para cultivo de las células en este DMPV. Se desarrolló un software de procesamiento y análisis de imágenes basado en Python para el crecimiento celular (PIACG) y se utilizó este software para cuantificar el área total de las cámaras de los DMPVs ocupado por células, en respuesta a las diferentes concentraciones de SFB probadas, proporcionando información sobre la tasa de proliferación celular en respuesta a SFB por cada condición experimental por triplicado durante 10 días de cultivo.

### 1.2.1. Análisis de datos en el software PIACG

La primera parte del análisis de las imágenes se realizó por medio de lo que se denomina segmentación celular. La segmentación celular es el proceso mediante el cual en cada imagen tomada se separan las células con respecto al fondo del DMPV (**Figura 31**).

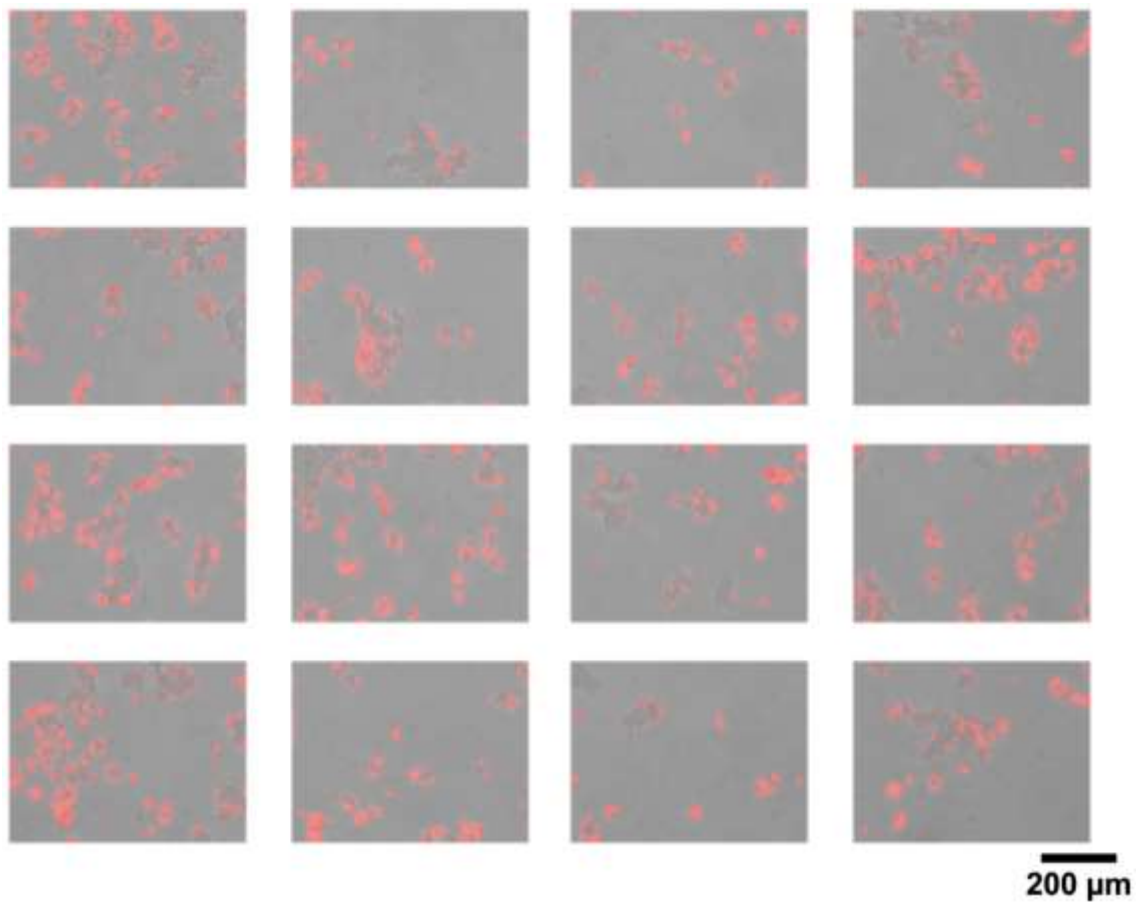
La segmentación automática de células es útil para el análisis de las imágenes obtenidas tanto por microscopía de fluorescencia como por campo claro, reduciendo el tiempo del análisis. Este procedimiento permite la cuantificación automática de un gran número de células. A través de la segmentación, se pueden monitorear características como el volumen y la forma celular en el tiempo. El análisis automatizado es un método más objetivo que el análisis manual de imágenes y, por lo tanto, mejora la reproducibilidad (Hodneland *et al.*, 2013).

Las **Figuras 30 a 32** presentan cómo el sistema analiza las imágenes obtenidas por segmentación celular y calcula el porcentaje del área de la cámara ocupada por las células, estimando el número de células existentes en cada condición experimental.

La **Figura 30** muestra cómo se produce la segmentación en 16 porciones de las imágenes de las células en el cultivo 2D en el DMPV multicámara. En rojo se observa el área detectada como células por el software PIACG con respecto al fondo gris del DMPV.

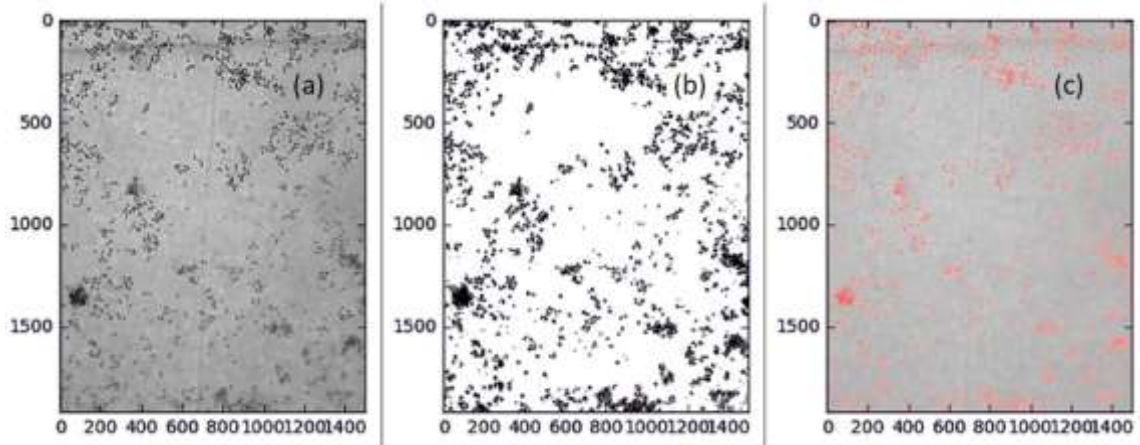
Algunos autores (Hodneland *et al.*, 2013) argumentan que la segmentación celular en imágenes de células no coloreadas es ventajosa para cuantificar células individuales, pero los límites no se observan fácilmente, especialmente en cultivos donde las células están densamente agrupadas. Para evitar estos problemas, el cultivo celular en el DMPV se mantuvo controlando la confluencia para que no se dificultara la diferenciación de los límites celulares.

La **Figura 31** muestra cómo el software es capaz de discriminar las células individuales con respecto al fondo en escala de grises, el umbral convierte al modo binario y marca las áreas seleccionadas comparándolas con respecto al fondo del DMPV. Este procedimiento permite calcular el área unicelular y el área total de la cámara ocupada por el cultivo celular y se compara con la imagen original.

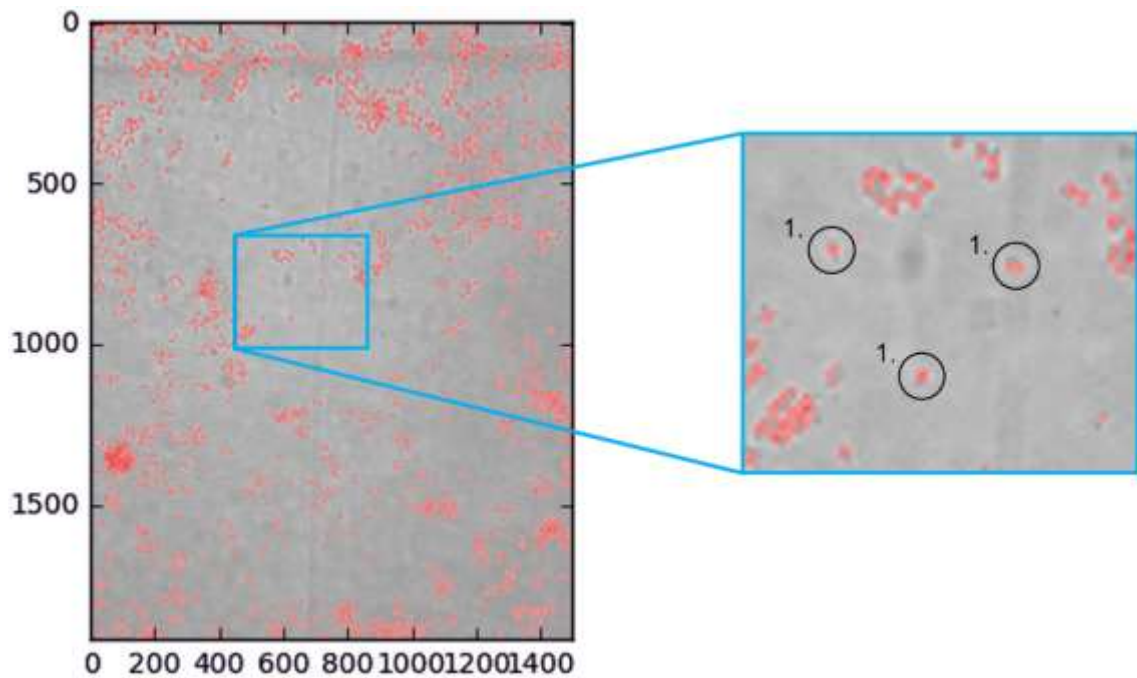


**Figura 30:** Segmentación en 16 porciones de las imágenes de las células en un cultivo 2D. En rojo se observa el área detectada como células por el software PIACG con respecto al fondo gris. Imágenes tomadas en campo claro. Barra: 200  $\mu\text{m}$ .

A partir de la segmentación celular, el software PIACG primero determina el tamaño de una célula promedio. Posteriormente, se realiza la estimación del área total de las células para determinar el área total de las cámaras del DMPV ocupada por células. Finalmente, el software traduce las dimensiones de píxeles en sistema métrico (**Figura 32**).



**Figura 31:** Procesamiento de segmentación celular de cada porción de la imagen. (a) Área celular detectada en escala de grises. (b) El umbral divide la imagen completa en dos áreas: célula / no célula (fondo del DMPV). (c) El área ocupada por las células se mide y se compara con el original. En este caso el 11,05% de la imagen.

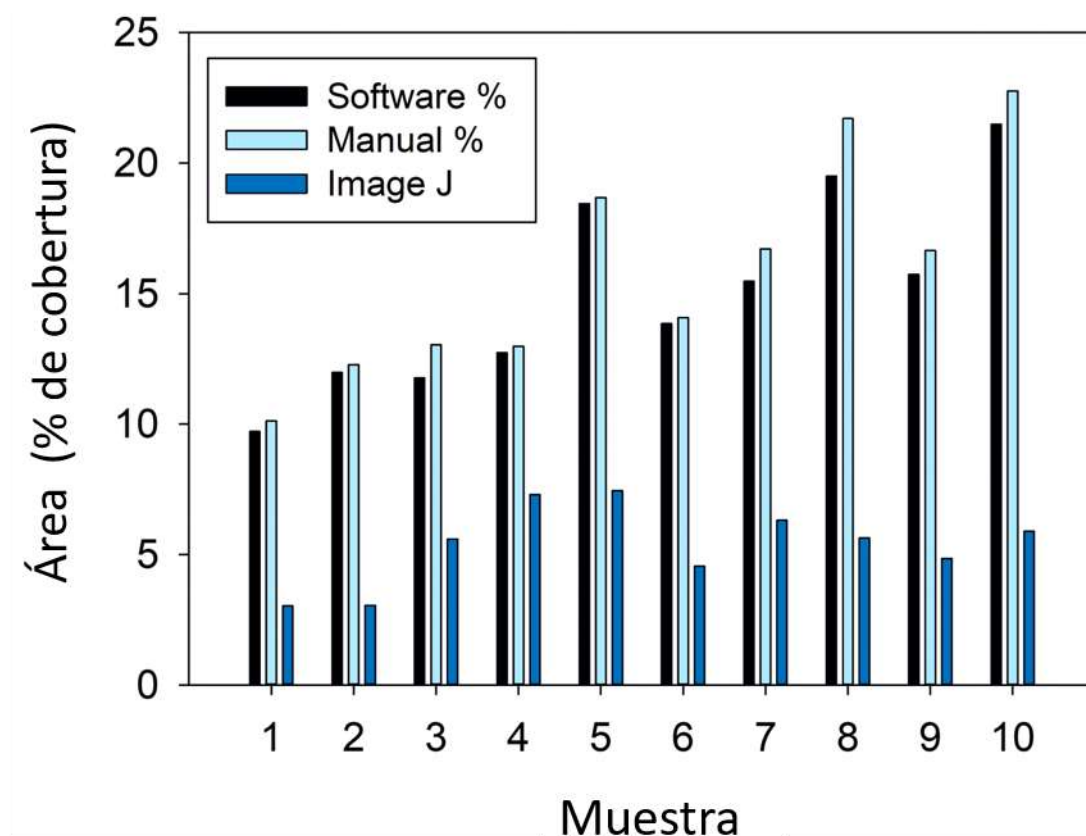


**Figura 32:** Determinación del porcentaje de área celular. A partir de la determinación del tamaño medio de las células, el software PIACG estima el área de una célula (1. círculo negro) para calcular el porcentaje del área total ocupada por las células en la cámara del DMPV.



### 1.2.2. Comparación entre el cálculo del software manual, ImageJ y PIACG

Se comparó el porcentaje del área celular obtenida por conteo manual, con ImageJ y por cuantificación con el software PIACG en las cámaras del DMPV (**Figura 33**). Se observó que las áreas con células cuantificadas por el software PIACG son muy similares a las cuantificadas manualmente. Esto se debe al ajuste preciso que logra el software a la morfología celular, alcanzando una alta precisión en la cuantificación. Sin embargo, al cuantificar con ImageJ se advierte que las áreas con células son siempre menores en comparación con las cuantificadas con PIACG y manualmente. Esto se debe a la necesidad de preprocesamiento de imágenes (ajustes de brillo-contraste) requerido por ImageJ frente a la cuantificación por PIACG.

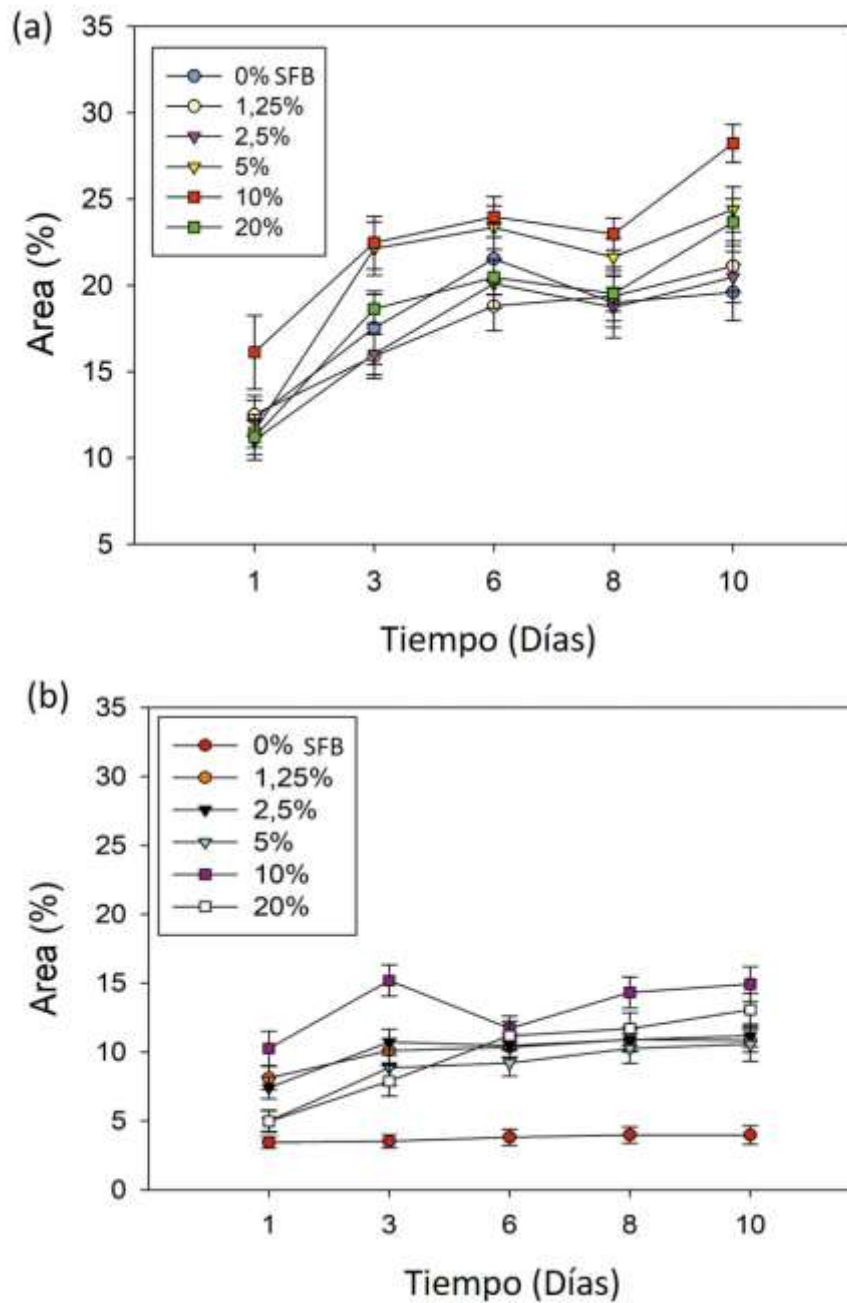


**Figura 33:** Comparación del porcentaje de cobertura del área celular por cuantificación manual y por las cuantificaciones automatizadas de las mismas imágenes utilizando PIACG e ImageJ. Cada muestra corresponde a 10 imágenes de las cámaras de los microcanales del DMPV por 10 días del cultivo.

Además, se realizó un análisis comparativo entre PIACG e ImageJ del área de las cámaras del DMPV ocupada por las células, en respuesta a diferentes concentraciones de SFB durante 10 días del cultivo de HEK-293T (**Figura 34**). En este análisis se comparó la precisión del área celular detectada por ambos softwares, utilizando curvas de crecimiento de la línea celular HEK-293T como parámetro comparativo. Como se puede apreciar en la **Figura 34**, el software PIACG presenta una capacidad similar con respecto al ImageJ en la detección del área celular ocupada en las cámaras del DMPV en respuesta a los tratamientos con concentraciones crecientes de SFB.

Las curvas de crecimiento celular tienen perfiles similares en el análisis con ambos softwares. Desde el punto de vista biológico, el área se ha utilizado como medida de la tasa de proliferación celular. Las células sometidas a tratamientos con 10% de SFB durante 10 días de cultivo celular fueron las que ocuparon la mayor superficie de la cámara y, por tanto, presentan mayor tasa de proliferación celular.

Este resultado coincide con el hecho de que, en los cultivos convencionales, se utiliza 10% de SFB para complementar el medio de cultivo de células HEK-293T. Con la ausencia o con concentraciones más bajas de SFB, se observa una disminución del área ocupada por las células en las cámaras, en comparación con la concentración de SFB al 10% y, por lo tanto, una reducción en la tasa de proliferación celular. Este resultado también se detecta en células cultivadas con 20% de SFB durante 10 días de cultivo.



**Figura 34:** Comparación de la precisión de la detección de células con las curvas de crecimiento celular de la línea HEK-293T evaluada por PIACG e ImageJ. Se inocularon células HEK-293T en un DMPV con medio de crecimiento que contenía 0; 1,25; 2,5; 5; 10 y 20% de SFB. Las imágenes para el cálculo del área celular se tomaron cada 48 hs, coincidiendo con el cambio de medio de cultivo, hasta los 10 días de cultivo. (a) Análisis con PIACG de las curvas de crecimiento celular de la línea HEK-293T tratada con concentraciones crecientes de SFB cultivadas en el DMPV. (b) Análisis con ImageJ de las curvas de crecimiento celular de la línea HEK-293T tratada con concentraciones crecientes de SFB cultivadas en el DMPV. Las barras de error indican determinaciones del SEM de tres experimentos independientes.

### 1.2.3. Análisis biológico en el DMPV multicámara

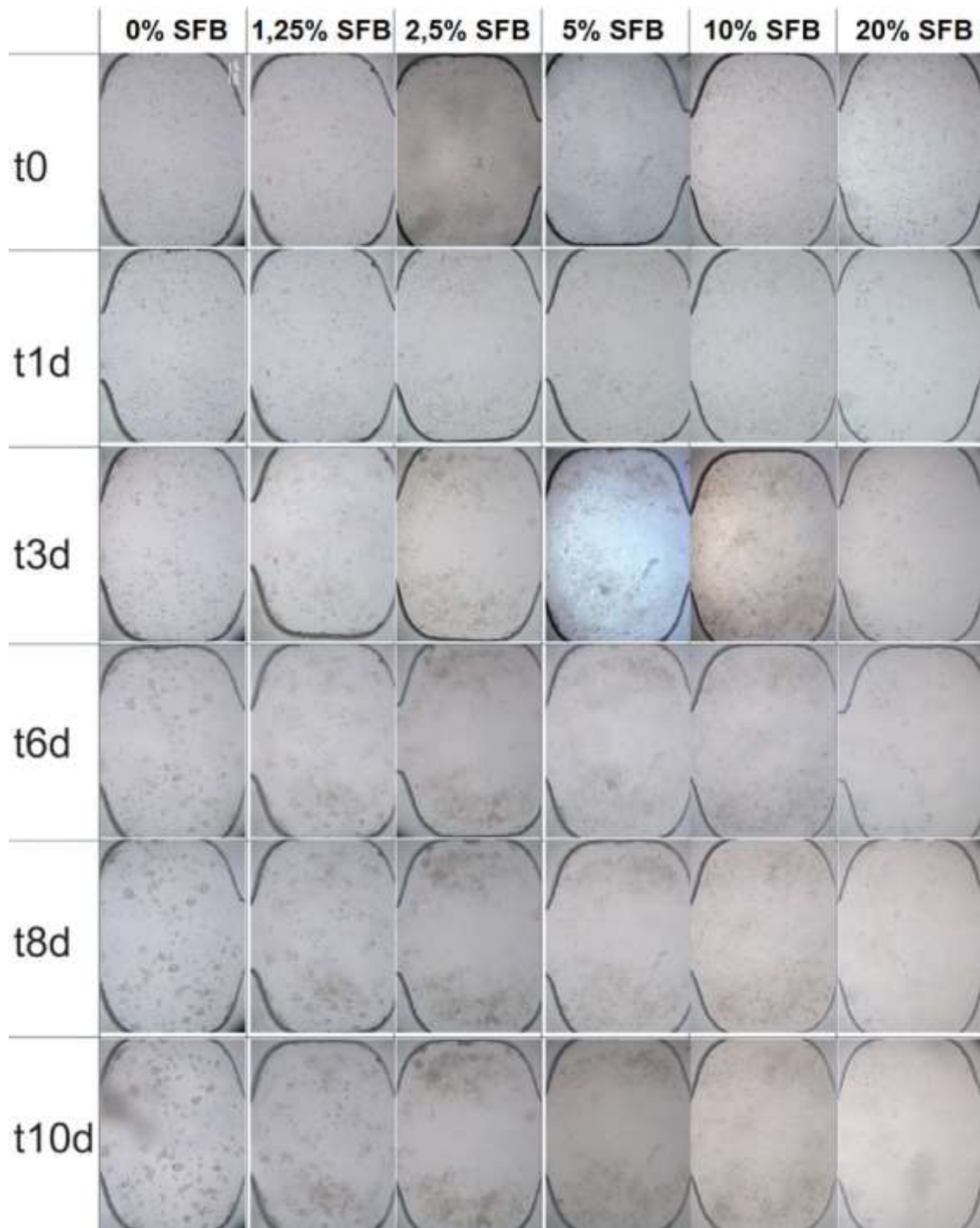
Los efectos sobre la unión de las células al sustrato debido a una exposición prolongada a bajas concentraciones de SFB, es debido probablemente a los efectos que se ejercen sobre las proteínas de anclaje/citoesqueleto de las células (Su *et al.*, 2013). Un análisis comparativo de los diferentes porcentajes de SFB utilizados para cada día de cultivo (**Figura 35**), muestra que la falta de suero (0% SFB) no afecta a las células durante el primer día hasta el tercer día de cultivo. Sin embargo, parece afectar a partir del día número 6 de cultivo ya que se observa una desorganización citoesquelética, las células comienzan a agregarse y formar racimos como resultado de la pérdida de adherencia al sustrato (**Figura 36.A**).

Los tratamientos con porcentajes séricos de 1,25 y 2,5% no afectan la proliferación celular durante el primer día de cultivo. Sin embargo, al tercer día se observa la formación de racimos celulares como consecuencia de la pérdida de adhesión al sustrato por la desorganización del citoesqueleto (**Figuras 36.B y 36.C**).

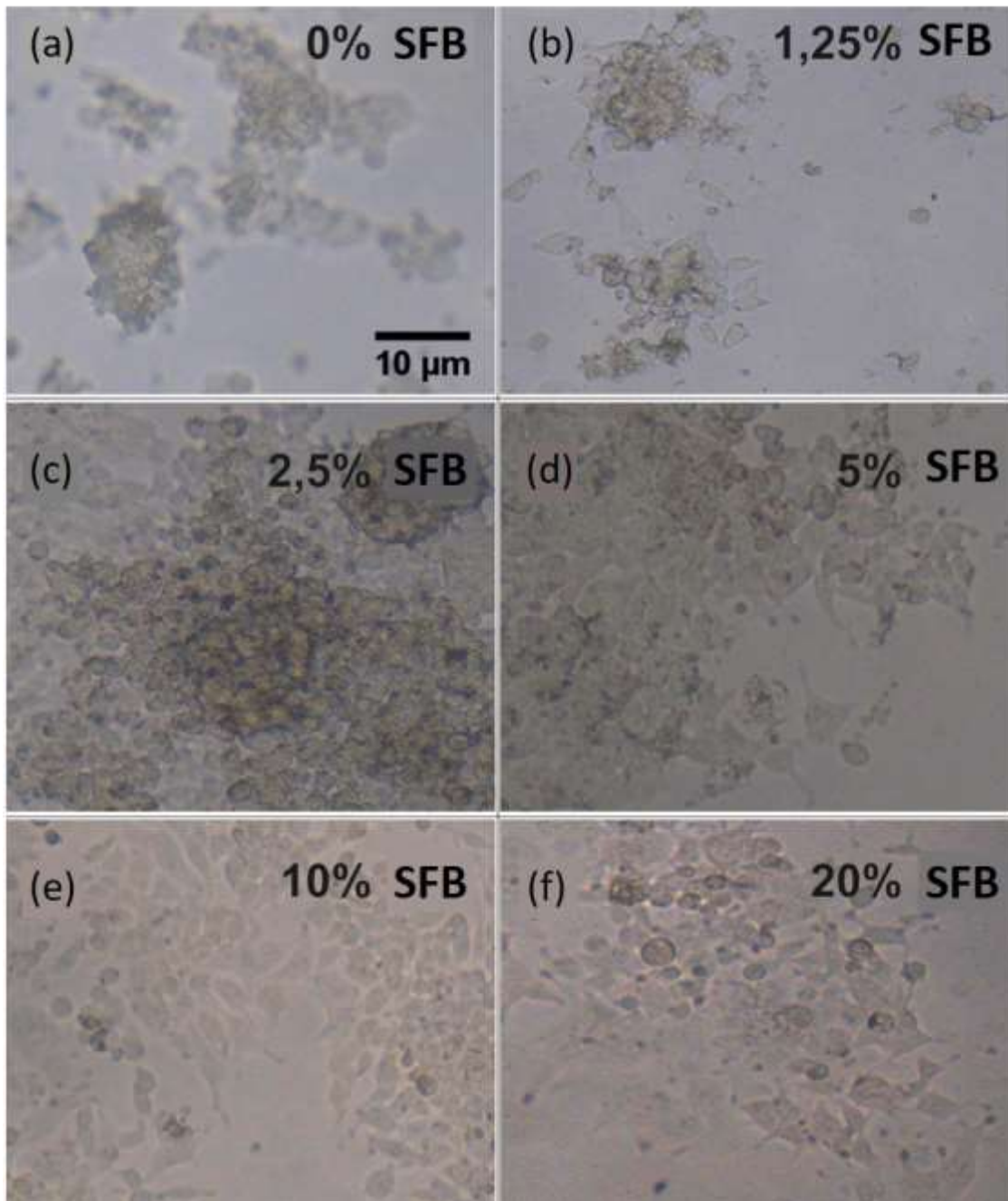
Cuando el medio de cultivo contiene 5% de SFB, se observa una tasa de proliferación celular normal. Las células tienen un citoesqueleto organizado y una buena adhesión celular. Sin embargo, después de 3 días de cultivo celular, se observa una alta densidad celular simultáneamente con signos de desorganización del citoesqueleto que aparece en numerosas células y consecuentemente la formación de racimos debido a la falta de adherencia al sustrato (**Figura 36.D**).

Con el tratamiento con suero al 10%, las células mantienen una tasa de proliferación celular y una densidad celular óptimas en todo el cultivo celular, manteniendo la adherencia al sustrato y la organización celular en todo momento (**Figura 36.E**).

Cuando el medio de cultivo contiene 20% de SFB, se observa que después de 1 día de cultivo se pierde la adhesión de las células al sustrato, disminuyendo la densidad celular en la cámara. Sin embargo, después de 3 días de cultivo se observa que las células que permanecieron unidas al sustrato comienzan a dividirse con una tasa normal de proliferación celular (**Figura 36.F**). Todos los efectos descritos para los tratamientos con diferentes concentraciones séricas se han observado en todas las réplicas experimentales que se realizaron.



**Figura 35:** Análisis comparativo de los efectos de las concentraciones de SFB en la línea celular HEK-293T en el DMPV multicámara. Imágenes de contraste de fase de células HEK-293T durante 10 días de cultivo celular en las cámaras de los microcanales, en un rango de concentraciones séricas de 0 a 20%. Cada imagen es representativa de 6 cámaras de 3 microcanales independientes. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 36:** Efectos de la concentración de SFB en la adhesión al vidrio del DMPV de la línea celular HEK-293T. Imágenes de contraste de fase de las células HEK-293T unidas al sustrato, cultivadas con (a) 0% de SFB, (b) 1,25% de SFB, (c) 2,5% de SFB, (d) 5% de SFB, (e) 10% de SFB y (f) 20% de SFB. Las imágenes muestran un área del mismo campo que las imágenes de la **Figura 35**, con un mayor aumento. Barra: 10 µm.

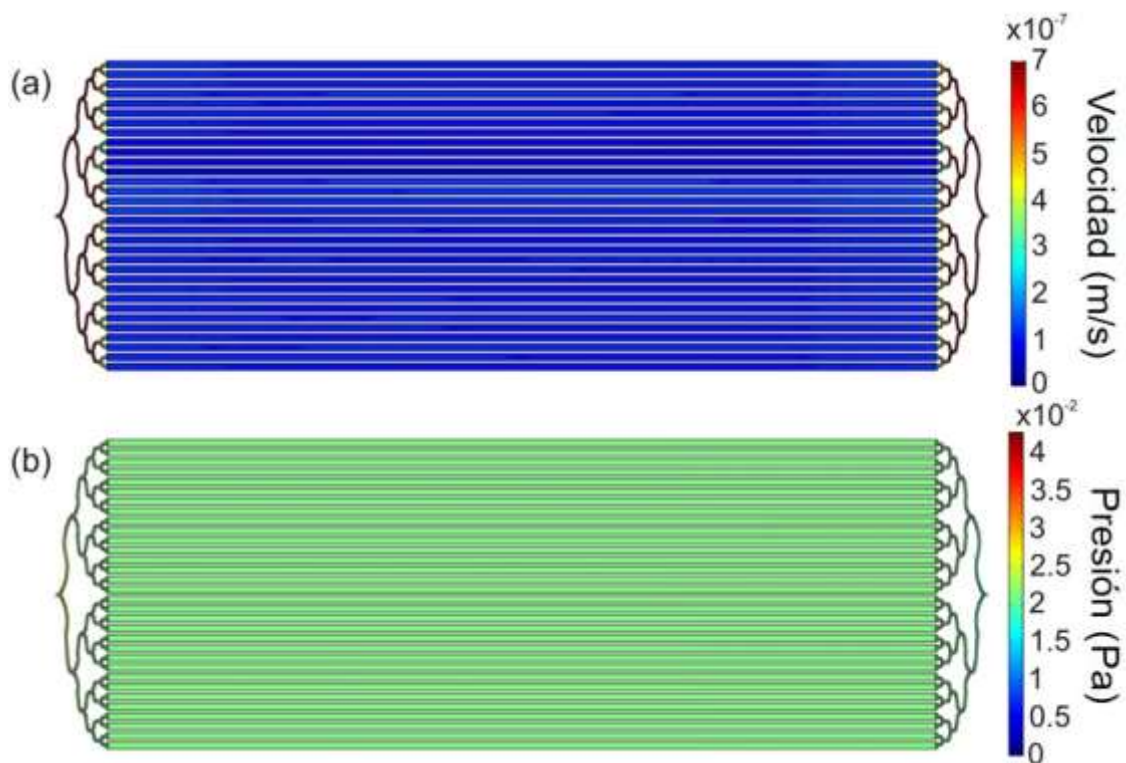
## 2. Dispositivos de microfluídica de gran volumen (DMGV) de 32 canales

Al comprobar la gran utilidad y buen rendimiento de los DMPV, se decidió escalarlos aumentando el volumen total del dispositivo, pero manteniendo la dimensión de los microcanales. Para realizarlo, se diseñó un Dispositivo de Microfluídica de Gran Volumen (DMGV) de 32 Cisternas. El diseño del DMGV de PDMS-Vidrio de volumen 2,8 ml, consta de un canal de entrada que se bifurca 5 veces y desemboca en 32 cisternas continuas en paralelo por donde el flujo hace su recorrido y que luego van convergiendo de a pares en un solo canal de salida, en forma simétrica al canal de entrada. Este diseño con cisternas largas con ángulos suaves sin conectores de cisternas se realizó para comprobar si de esta forma mejora la distribución de las células en el dispositivo microfluídico con flujos más homogéneos dentro de los canales.

### 2.1. Modelado computacional del flujo en el DMGV

A diferencia de los DMPV de 16 cisternas donde se utilizó el método de bombeo por gravedad del flujo, para este DMGV se utilizó el método de bombeo discontinuo del flujo cada 24 hs en el sistema microfluídico cerrado con bomba de presión a jeringa. Se modeló computacionalmente el flujo dentro del DMGV a partir de un flujo de entrada arbitrario de 600  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las velocidades de flujo calculadas muestran áreas de flujo reducido de  $10^{-7}$  m/seg (áreas azules) en las cisternas (**Figura 37.a**) con un entorno adecuado para el crecimiento celular, lo que permite la generación de una monocapa celular homogénea continua. El flujo laminar general en este DMGV asegura un transporte de masa difusora que genera un microambiente homogéneo para el crecimiento de la monocapa celular (Huang *et al.*, 2010).

La presión calculada en las cisternas muestra valores de  $\sim 0,02$  Pa (**Figura 37.b**). Las áreas de presión reducida (áreas azules) se muestran en la salida del dispositivo y los valores más altos (áreas rojas) en la entrada. Estos valores al igual que los del DMPV están dentro de los observados en el entorno fisiológico del epitelio ovárico humano (Avraham-Chakim *et al.*, 2013).



**Figura 37:** Modelado computacional del flujo en el DMGV de 32 cisternas. (a) Magnitud de velocidades (m/seg) (b) y presión (Pa) a una altura de  $75 \mu\text{m}$  de los microcanales del DMGV. Figuras generadas a partir de un flujo de entrada arbitrario de  $1\text{e-}8 \text{ m}^3/\text{s}$  ( $600 \mu\text{l}/\text{min}$ ). La velocidad de flujo en las cisternas centrales 14 a 16 se reduce en comparación con las demás, esto puede deberse al ruido en el modelo.

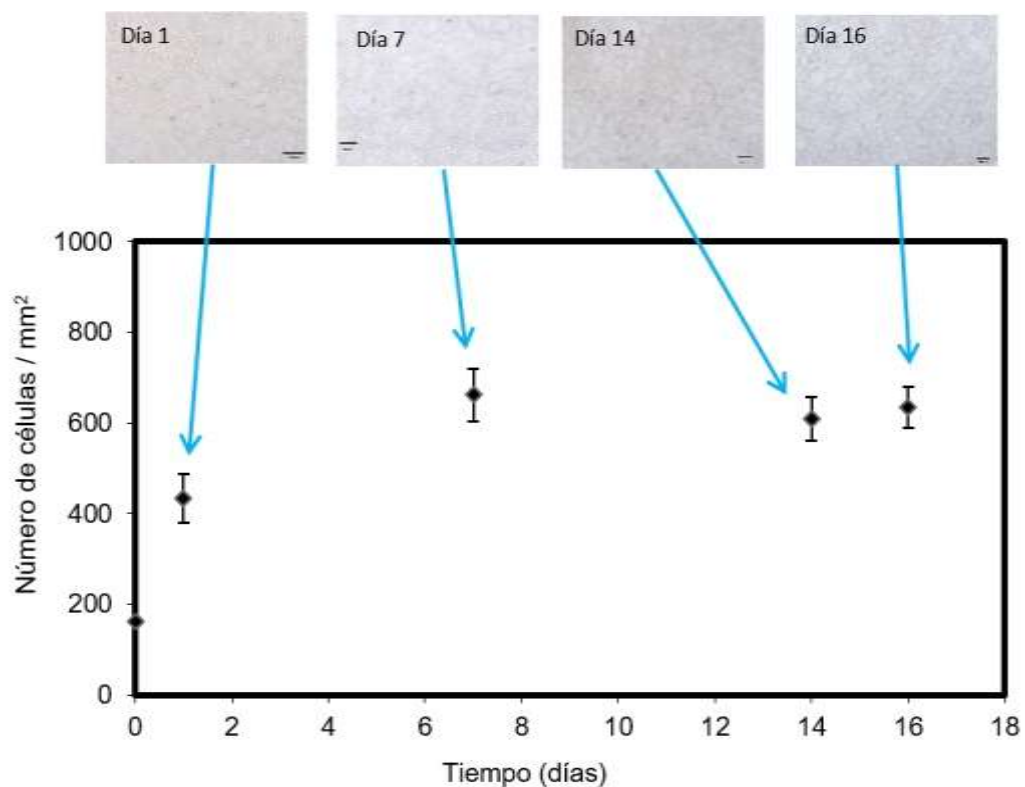
Estos resultados sugieren que la configuración de los microcanales en el DMGV otorgaría el flujo laminar y perfil de velocidad reducido en las cisternas. Lo que resulta en un microambiente adecuado para el crecimiento y proliferación de células adherentes a largo plazo con bombeo discontinuo en ciclos de 24 hs. El modelado computacional del flujo dentro del DMGV brindaría evidencia que éste sería un método adecuado para el cultivo de células adherentes.

## 2.2. Crecimiento celular en el DMGV de 32 canales

La línea celular con mayor productividad de mAbs en los DMPV de 4 canales fue CHO-ahIFN $\alpha$ 2b, es por este motivo que se decidió cultivar solo esta línea celular en el DMGV y



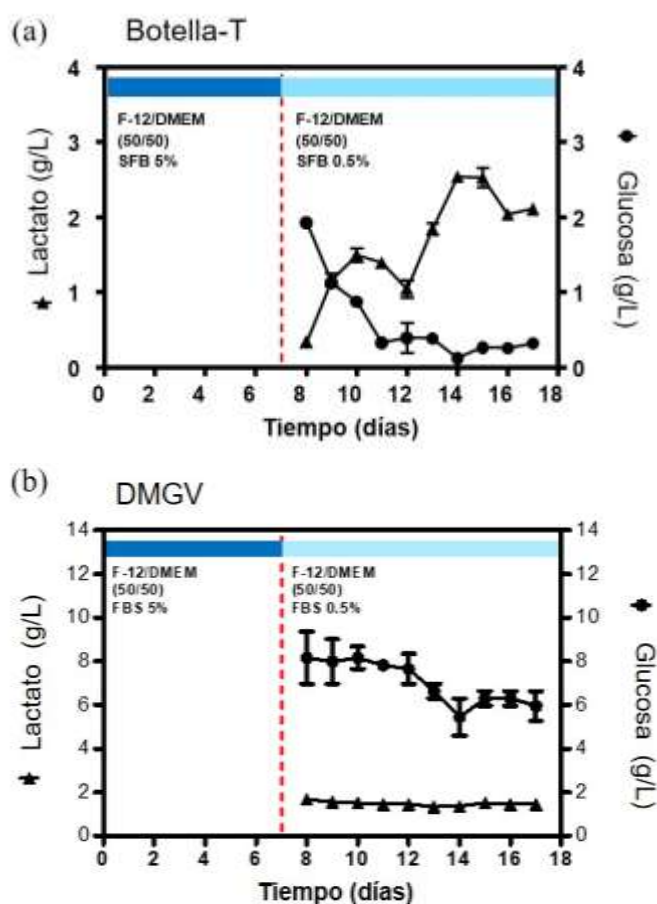
estudiar su proliferación en un cultivo a largo plazo mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía de campo claro. El DMGV recubierto con poli-D-lisina se sembró con las células a una concentración inicial de  $10^6$  células/ml y se permitió la adhesión celular en el piso del DMGV. Las imágenes obtenidas desde el día 1 de cultivo indican que la morfología de la mayoría de las células fue fusiforme con apariencia de bordes que sugieren una fuerte adhesión al piso del DMGV, llegando a una monocapa al día 7 de cultivo manteniéndose constante por los siguientes 11 días, finalizando el experimento a los 18 días de cultivo (**Figura 38**). El número de células máximo en el DMGV fue de 670 células/mm<sup>2</sup> y se mantuvo constante a lo largo de los 18 días del cultivo. En el día 7 se cambió el medio de cultivo de crecimiento con 5% de SFB por el de producción con 0,5% de SFB y se recogieron muestras de la salida del dispositivo para determinar la concentración de anticuerpos funcionales mediante ELISA indirecto específico.



**Figura 38:** Densidad celular en el DMGV. El número de células máximo en el DMGV fue de 670 células/mm<sup>2</sup>. El número de células se mantuvo constante a lo largo del cultivo. En el día 7 se cambió el medio de cultivo de crecimiento al de producción. Aumento de las imágenes: 100X, Barra: 100µm. Las barras de error indican determinaciones del SEM.

### 2.3. Cuantificación de glucosa y lactato del medio del DMGV

En este DMGV y en los cultivos tradicionales de las células adherentes (botellas-T), se cuantificaron los niveles de glucosa y lactato del medio de cultivo en el tiempo (**Figura 39**). En las botellas-T en el día 8 la concentración de glucosa fue de 2,5 g/l y fue descendiendo hasta llegar a 1 g/l en el día 26, en cambio, la concentración de lactato fue menor a 0,5 g/l al día 8 hasta alcanzar los 2 g/l en el día 26 (**Figura 39.a**). Por otro lado, la concentración de glucosa del DMGV fue de 8 g/l en el día 8 y desciende hasta 6 g/l al día 17, en cambio, la concentración de lactato fue de 1,5 g/l al día 8 y se mantuvo constante hasta el día 17 (**Figura 39.b**).

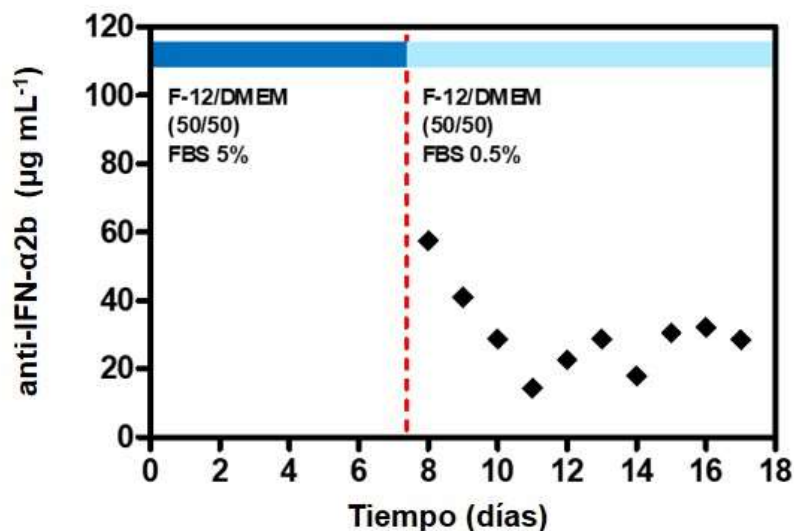


**Figura 39:** (a) Concentración de Glucosa y Lactato en Botellas-T y (b) en el DMGV a lo largo del tiempo del experimento. La concentración de glucosa del DMGV se mantiene alta y la concentración de lactato se mantiene bajo a lo largo del cultivo respecto del cultivo en botella-T. Las barras de error indican determinaciones del SEM.

La concentración de glucosa del DMGV se mantiene alta respecto del cultivo en botella-T y la concentración de lactato se mantiene baja a lo largo del tiempo de cultivo. Hay que tener en cuenta que el cambio de medio de cultivo en el caso del DMGV fue cada 24 hs mientras que en las botellas-T fue cada 48 hs. Además, la densidad celular fue de  $6,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en el DMGV y de  $1,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en la botella-T. Esto quiere decir que al haber mayor densidad celular en las botellas-T que en el DMGV hay un consumo mayor de glucosa en las botellas-T contrariamente, en el DMGV siempre hay glucosa disponible para el consumo de las células.

## 2.4. Producción de anticuerpos monoclonales en el DMGV

Al igual que con el DMPV, se evaluó la producción diaria del anti-hIFN- $\alpha$ 2b secretado por las células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b durante el periodo de cultivo en el DMGV. La **Figura. 40** muestra la producción diaria del mAb a lo largo de los 18 días del cultivo.



**Figura 40:** Análisis de concentración de mAbs en sobrenadantes de cada uno de los días del cultivo en el DMGV hasta el día 18 que finalizó el cultivo. Al día 7 se cambió el medio de cultivo de crecimiento por el de producción. A partir del día 12, se llega a una meseta en la cantidad de anticuerpo producido por unidad volumétrica.

En los primeros días de producción, la concentración de anti-hIFN- $\alpha$ 2b secretada por las células fue aproximadamente de 57  $\mu$ g/ml, luego la producción del mAb fue descendiendo hasta el día 12 en que la línea celular alcanzó una meseta de expresión de anti-hIFN- $\alpha$ 2b aproximadamente de 32  $\mu$ g/ml hasta el final del cultivo en el día 18. Durante la fase de cultivo de producción, se observaron las señales de estrés celular en la morfología de las células, lo que se esperaba debido a la concentración reducida de SFB en el medio de cultivo de producción. Esto puede afectar el crecimiento y la proliferación celular, redirigiendo el metabolismo celular principalmente a la producción de anticuerpos.

Se comparó la productividad específica por día del anti-hIFN- $\alpha$ 2b en los cultivos en botella-T y en el DMGV. En contraste con lo observado en los DMPV, la productividad específica de la línea celular CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en el DMGV resultó menor que en la botella-T (**Tabla 2**). Por otro lado, se evaluó la constante de afinidad ( $K_A$ ) de anti-hIFN- $\alpha$ 2b en el DMGV en comparación con el producido en botellas-T para analizar si las condiciones de cultivo podrían afectar la capacidad de los mAbs de unirse a la citoquina soluble. La evaluación de la  $K_A$  de anti-hIFN- $\alpha$ 2b fue medida por el ensayo de Friguet y col. (Friguet *et al.*, 1985).

Sorprendentemente, en el DMGV se logró producir anticuerpos que presentan mayor constante de afinidad respecto de los producidos en botellas-T. El anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido en el DMGV presentó valores de  $K_A$  2 veces mayor respecto al mAb producido en botellas-T ( $p < 0,05$ , **Tabla 2**). Los mAbs exhibieron una capacidad de unión significativamente mayor cuando éstos y las citoquinas estaban en fase líquida en condiciones experimentales.

**Tabla 2:** Productividad específica de mAbs en los cultivos en botella-T y en el DMGV y la proporción DMGV/Botella-T. Constante de afinidad ( $K_A$ ) de los mAbs de la botella-T y del DMGV y la proporción DMGV/Botella-T. \* Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se determinaron por el test de Student.

anti-hIFN- $\alpha$ 2b	Productividad (pg/ $10^6$ cél/día)	$K_A$ ( $10^9$ M $^{-1}$ )
Botella-T	$8,5 \times 10^{-6}$	$1,8 \pm 0,1$ *
DMGV	$0,6 \times 10^{-6}$	$3,6 \pm 0,3$ *
Proporción (DMGV/Botella-T)	0,07	2

## 2.5. Inhibición de la actividad antiproliferativa, inhibición de la señalización de células e inhibición de la actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b por los anticuerpos producidos en el DMGV y en botellas-T

Ya que la producción en el DMGV mejora significativamente la capacidad de unión del anti-hIFN- $\alpha$ 2b en términos de una mayor  $K_A$ , se analizaron otros atributos de calidad del mAbs vinculados a su actividad biológica. En particular, se evaluó la capacidad para inhibir la actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b, la señalización de rhIFN- $\alpha$ 2b y la capacidad de inhibir la actividad biológica antiviral del rhIFN- $\alpha$ 2b por la acción del mAb producido en el DMGV por células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en comparación con la producida por la misma línea celular usando el método de cultivo de células adherentes en botellas-T (**Figura 41**).

La capacidad del mAb para inhibir la señalización de rhIFN- $\alpha$ 2b se determinó mediante análisis de fluorescencia usando células indicadoras cuya expresión de eGFP está mediada por el promotor Mx inducible por rhIFN- $\alpha$ 2b. En la **Figura 41.a** se muestra un gráfico de las curvas dosis-respuesta de inhibición de señalización correspondiente a la concentración necesaria del mAb producido por CHO-ahIFN $\alpha$ 2b usando DMGV o botellas-T, para reducir el 50% de la fluorescencia ( $FRC_{50}$ ) medida por citometría de flujo. En la **Figura 41.b** se muestra un gráfico de barras que representa las  $FRC_{50}$  de los mAbs producidos por ambos métodos. Los anticuerpos producidos por la línea celular usando el cultivo en botella-T exhibió el  $FRC_{50}$  significativamente mayor que en el DMGV ( $p < 0,05$ ; Test de Tukey).

En la **Figura 41.c** se muestra un gráfico de las curvas dosis-respuesta donde se calculan las concentraciones de mAbs necesaria para inhibir el 50% de la actividad antiproliferativa de la citoquina IFN $\alpha$ 2b ( $IC_{50}$ ) cuando las células Daudi se incuban con el mAb producido por CHO-ahIFN $\alpha$ 2b usando el DMGV o el método de cultivo en botellas-T. En la **Figura 41.d** se muestra un gráfico de barras que representa la  $IC_{50}$  de los mAbs producidos por ambos métodos. Como en el experimento anterior, en el DMGV la  $IC_{50}$  fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a la de los anticuerpos producidos en las botellas-T determinado por ANOVA seguido del Test de Tukey.

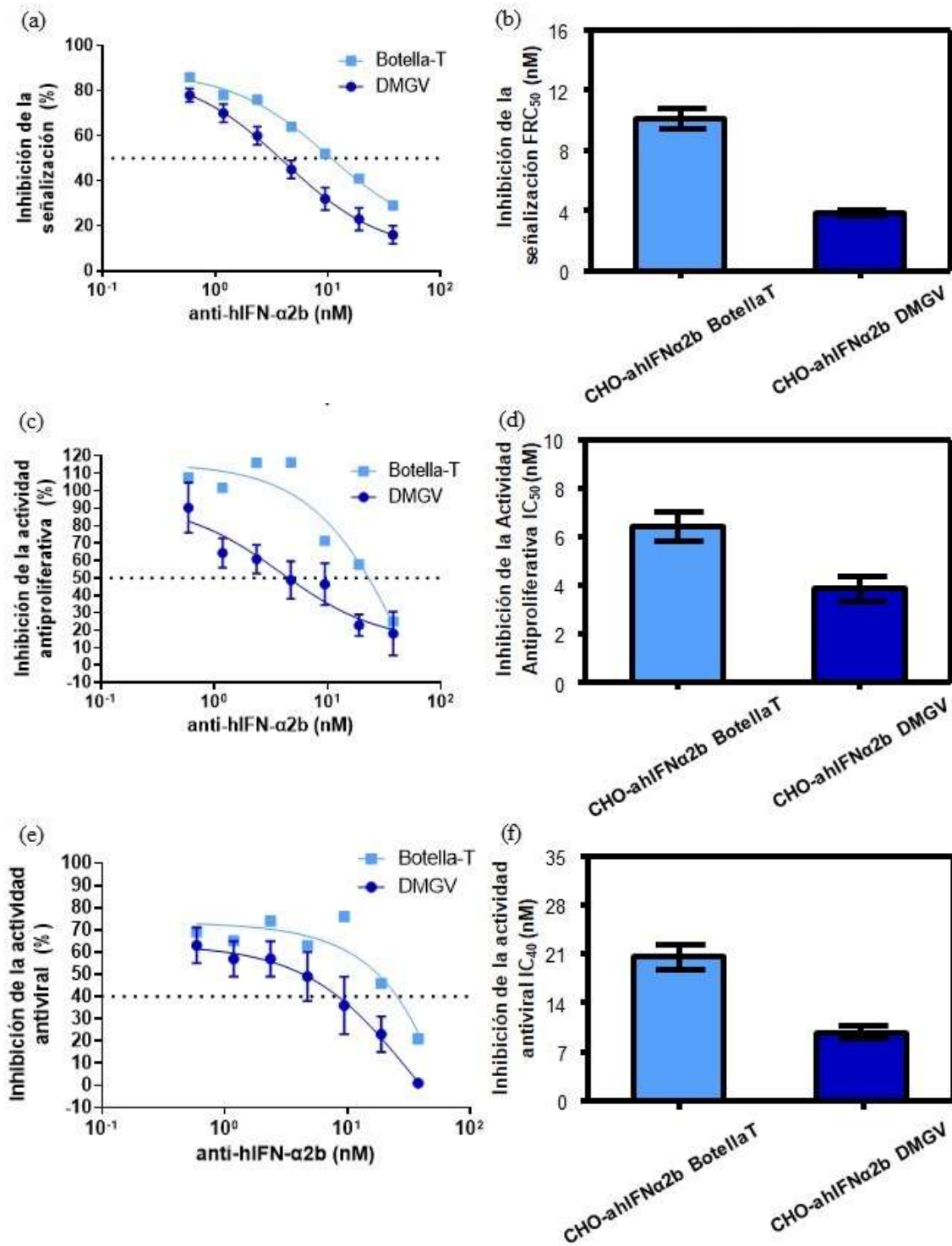
Estos resultados sugieren que la producción en el DMGV mejora significativamente la función biológica del anticuerpo anti-hIFN- $\alpha$ 2b en términos de su capacidad de unión y

neutralización de la citoquina, en comparación con los producidos con el método tradicional de cultivo de células adherentes.

Se investigó también la capacidad del anti-hIFN- $\alpha$ 2b para inhibir la actividad biológica antiviral del rhIFN- $\alpha$ 2b. La actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b se evaluó en presencia de los mAbs producidos en el DMGV o en botellas-T. El título de anticuerpo neutralizante se definió como la concentración de anticuerpo que inhibe el 40% del efecto antivírico ( $IC_{40}$ ) inducido por 4 U/ml de rhIFN- $\alpha$ 2b (**Figura 41.e y 41.f**).

Los mAbs neutralizaron la actividad biológica de rhIFN- $\alpha$ 2b mostrando, los producidos en el DMGV capacidad de inhibición significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que los producidos en botellas-T. Estos resultados deben considerarse con precaución ya que la actividad neutralizante depende de la afinidad del mAb por área de unión al receptor de la citoquina.

Además, para los anticuerpos que reconocen un epítipo común, se supone que su creciente afinidad está relacionada con su creciente neutralización. En este caso, el anti-hIFN- $\alpha$ 2b con la mayor afinidad por rhIFN- $\alpha$ 2b mostró la mayor actividad neutralizante. La actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b se vio significativamente menos afectada ( $p < 0,05$ ) por los mAbs de las botellas-T que por los del DMGV (**Figura 41.e y 41.f**), lo que respalda la idea de una fuerte correlación entre la afinidad del mAb por la citoquina y la neutralización de la actividad de la misma.



**Figura 41: Evaluación de la capacidad neutralizante de la actividad biológica del mAb anti-hIFN-α2b producidos en DMGV y en botellas-T.** (a) Curva dosis-respuesta de la inhibición de la actividad antiproliferativa de rhIFN-α2b con concentraciones crecientes del mAb producido en DMGV y en botellas-T. (b) Inhibición de la actividad antiproliferativa medida como la concentración de mAb necesaria para reducir el 50% de la potencia máxima de rhIFN-α2b (IC<sub>50</sub>) usando células Daudi. (c) Curva dosis-respuesta de la inhibición de la señalización de rhIFN-α2b con concentraciones crecientes del mAb producido en

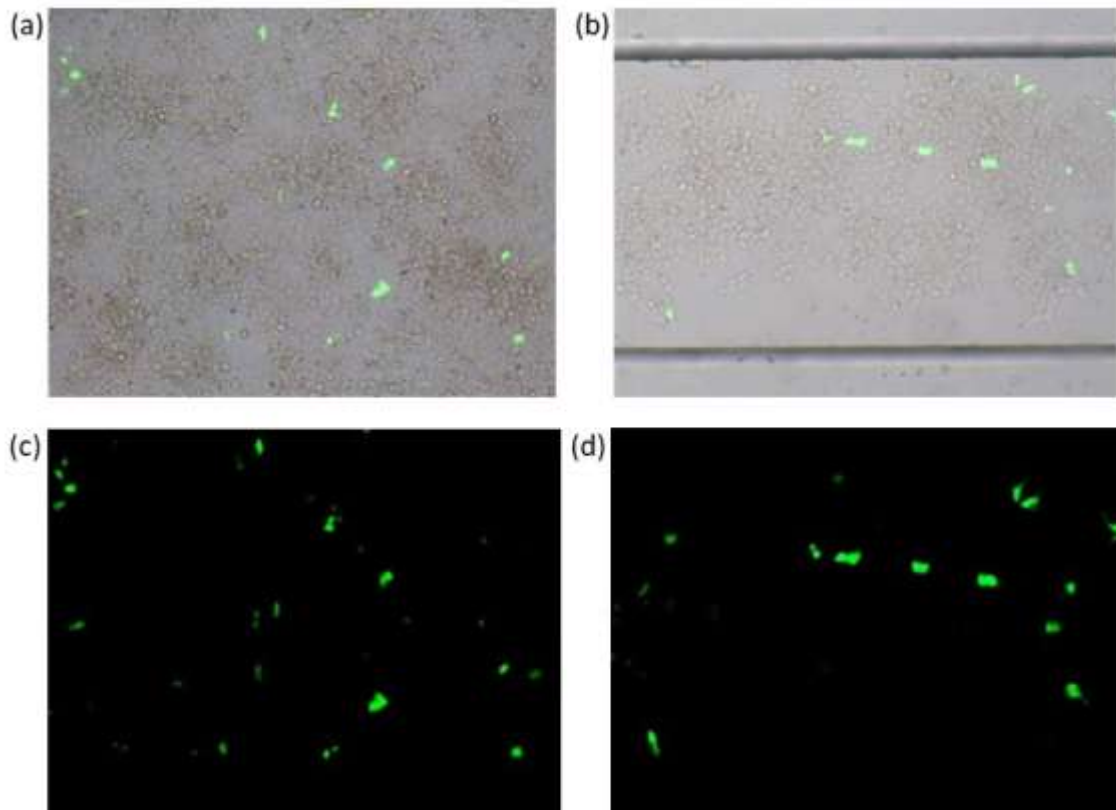
DMGV y en botellas-T. (d) Inhibición de la señalización medida como la concentración de mAb necesaria para reducir el 50% de la fluorescencia ( $FRC_{50}$ ) usando células HeLa Mx2 / eGFP. (e) Curva dosis-respuesta de la inhibición de la actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b con concentraciones crecientes del mAb producido en DMGV y en botellas-T. (f) Inhibición de la actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b medida como la concentración de mAb necesaria para reducir el 40% de la potencia máxima de citoquina ( $IC_{40}$ ). La performance de los anticuerpos producidos en el DMGV es tal que tienen una mayor capacidad neutralizante del rhIFN- $\alpha$ 2b que los mAbs producidos en botellas-T. La barra de error representa el SEM. Los p-valores fueron determinados por el t-test de Student

### 3. Estudio de internalización de pseudovirus de VSV en DMPVs de 4 canales

Una aplicación novedosa para los dispositivos de microfluídica, son los estudios con pseudovirus, los cuales están siendo utilizados como herramientas poderosas para estudiar la infectividad de diversos virus (Helguera *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2020; Ferrero *et al.*, 2021). Sin embargo, estos estudios se llevan a cabo en cultivos en placas de 24 o 48 pocillos (en volúmenes entre 200 y 500  $\mu$ l). En contraste, los dispositivos microfluídicos tienen dimensiones de micrómetros, los cuales se asemejarían en mayor medida a la escala dimensional de los sistemas biológicos.

Con el objetivo de evaluar la factibilidad de emplear los DMPVs para realizar los estudios de internalización de pseudovirus en sus células target, se realizó una incubación de pseudovirus de VSV con células HEK-293T sembradas y cultivadas en DMPVs de 4 canales. Se utilizaron células HEK-293T que poseen el receptor de LDL en la membrana celular al cual se unen los pseudovirus de VSV mediante la glicoproteína G de superficie. Una vez que los pseudovirus interaccionan con el receptor de LDL, las partículas pseudovirales son internalizadas induciendo la expresión de GFP dentro de la célula. Se lograron obtener imágenes de células HEK-293T fluorescentes expresando GFP en un DMPV a lo largo de 9 días de cultivo, a diferencia de las placas de cultivo estándar en las cuales los cultivos no superan las 72hs. No se observó ninguna interferencia por la presencia de la capa de PDMS, en las imágenes tomadas tanto de campo claro como de fluorescencia (**Figura 42**).





**Figura 42: Visualización de la internalización de pseudovirus de VSV en células HEK-293T en el día 8 de cultivo.** (a) Microfotografías de superposición de campo claro y de fluorescencia de células HEK-293T fluorescentes en una cisterna del DMPV. (b) Microfotografías de superposición de campo claro y de fluorescencia de células HEK-293T fluorescentes en un microcanal del DMPV. (c) Microfotografías de fluorescencia de células HEK-293T en una cisterna del DMPV. (d) Microfotografías de superposición de fluorescencia de células HEK-293T en un microcanal del DMPV. Imágenes tomadas con un aumento 100x.

# Discusión

---

Los dispositivos de microfluídica pueden definirse como microbiorreactores ya que poseen un volumen de trabajo inferior a 1 ml, estos se han utilizado en múltiples aplicaciones, entre las que se incluye el cultivo de células de mamífero para producir proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales (Garza-García *et al.*, 2013; Garza-García *et al.*, 2014; Mozdierz *et al.*, 2015; Ladner *et al.*, 2017). El uso de dispositivos de microfluídica para la expresión de proteínas recombinantes destinadas al uso terapéutico proporciona varias ventajas, incluyendo un tiempo de respuesta más corto, una relación superficie/volumen alta, un microambiente más homogéneo y controlable, reducción de volúmenes de muestra, rentabilidad, reproducibilidad, visualización simple y precisa, velocidad de prueba y versatilidad de diseños, portabilidad y bajo costo de fabricación para la optimización del proceso (Karadimitriou and Hassanizadeh, 2012; Jang *et al.*, 2015). Además, en algunos casos han demostrado un aumento de la productividad volumétrica para las moléculas sintéticas, con un entorno más controlado y un tiempo de permanencia corto del producto en el dispositivo, minimizando el impacto de los productos metabólicos no deseados o las modificaciones enzimáticas durante el proceso (Haswell *et al.*, 2001).

Los cultivos celulares producidos en dispositivos de microfluídica pueden mantener las condiciones de cultivo bien definidas y a la vez permiten proporcionar continuamente a las células medios frescos que contienen oxígeno y nutrientes al tiempo que eliminan los productos metabólicos a un flujo controlado (Leclerc *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2013; Mäki *et al.*, 2015). El control hidrodinámico del microambiente en estos dispositivos afecta la tasa de entrega de nutrientes, su reabastecimiento y define la tasa de dispersión de moléculas extracelulares así como del estrés mecánico como la fuerza de corte sobre las células adheridas al dispositivo (Huber *et al.*, 2018). Además, los volúmenes pequeños de los microcanales aumentan la concentración de las proteínas secretadas (Lecault *et al.*, 2012).

Estudios previos en el laboratorio, demostraron que es posible cultivar células en un dispositivo de microfluídica por ocho días (Peñaherrera *et al.*, 2016). El diseño de este dispositivo contaba con bordes lineales y ángulos rectos de los canales que causaban una circulación del flujo con torbellinos, que llevaba a una distribución no homogénea de las células y que dificultaba la eliminación de las burbujas que quedaban atrapadas. Dadas las limitaciones del dispositivo creado anteriormente, en esta tesis se diseñó un nuevo dispositivo de microfluídica de pequeño volumen (DMPV) con 4 canales y 16 cisternas con un volumen total de 32,22  $\mu$ l, cuyos canales variaban de mayor ancho en la entrada y salida, a un menor ancho en el centro de los canales, con bordes curvados y sin ángulos rectos, lo que produce menos resistencia y

permite un flujo con distribución homogénea a lo largo de los canales del DMPV, sin la formación de burbujas (**Figura 20**).

Para el llenado y cambios de medio de cultivo en el DMPV, se utilizó el método de bombeo del flujo inducido por gravedad en el sistema microfluídico abierto, generando un flujo pasivo por la diferencia de altura de los reservorios. En trabajos previos (Huang *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2014; Shemesh *et al.*, 2015) se ha utilizado un sistema de perfusión similar en dispositivos de microfluídica operados por flujo inducido por gravedad. En uno de esos trabajos, los dispositivos microfluídicos abiertos han sido diseñados con una entrada común que divide el flujo en cuatro corrientes paralelas que alcanzan las cuatro cámaras mediante perfusión, lograda a través de una diferencia en el nivel de volumen entre la entrada y las cuatro salidas. En las cuatro cámaras lograron cultivar diferentes poblaciones de células primarias del sistema nervioso central. Bajo esta configuración, se podrían imitar condiciones fluidicas fisiológicas y observar una mejor reproducibilidad de la densidad celular durante el recubrimiento, ya que el número de células por cámara podría controlarse con precisión (Ruiz *et al.*, 2014).

En otros estudios de dispositivos de microfluídica con microcanales de ángulos rectos o con forma de zig-zag se observó distribución inhomogénea de las células (Garza-García *et al.*, 2014; Peñaherrera *et al.*, 2016), esto puede deberse a la mala circulación del flujo de medio de cultivo. Para corroborar que el flujo circula homogéneamente en todo el DMPV, se llevó a cabo un modelado computacional del flujo del interior del DMPV. Los modelados computacionales de la velocidad de flujo (**Figura 21.a y 21.b**) y la tensión de corte en el DMPV (**Figura 22**), mostraron áreas de flujo reducido en las cisternas, lo que permite un crecimiento celular adecuado para la generación de una monocapa celular homogénea y continua en el DMPV (**Figura 21.c y 21.d**). Aunque se observan perfiles de velocidad más bajos en las cisternas de en comparación con los canales (**Figura 21.b y 21.e**), el flujo laminar general asegura un transporte de masa difusora consistente que puede dar como resultado un microambiente uniforme para el crecimiento celular (Huang *et al.*, 2010).

La tensión de corte calculada (**Figura 22**) mostro valores en el rango de 0,1 a 0,6 Pa. Estos valores están dentro de los observados en el entorno fisiológico del epitelio ovárico, donde la tensión de corte está en el rango de 0,014 Pa a 1,1 Pa (Avraham-Chakim *et al.*, 2013). En las cisternas se mostraron áreas de tensión de corte reducido y en los canales se mostraron los valores más altos de tensión de corte, coincidentes con la simulación de velocidad de flujo. Además, se ha informado en otros trabajos (Brás *et al.*, 2017) que las células CHO son altamente tolerantes a la tensión mecánica en los dispositivos microfluídicos y muestran un daño

morfológico con una tensión de corte superior a  $\sim 250$  Pa. Dado que los valores de tensión de corte en los dispositivos de este trabajo son mucho más bajos, se esperaba que no afecte significativamente la producción de proteínas recombinantes en el sistema utilizado. El aumento de la tensión de corte puede afectar la división celular y otras propiedades mecánicas de la célula, como se ha observado en distintos trabajos (Liu and Tai, 2011; Wang *et al.*, 2016).

Algunos estudios han observado que el flujo continuo podría afectar la morfología y la estructura de las células adherentes, lo que lleva a un crecimiento heterogéneo (Azuaje-Hualde *et al.*, 2017). Para minimizar el estrés en las células cultivadas, en lugar del flujo continuo, se adoptó un protocolo periódico de intercambio de medio con ciclos pulsados a intervalos de 24 hs. Esto permitiría un tiempo de residencia suficiente de los factores liberados por las células que favorecen la estabilidad, el crecimiento y la comunicación célula-célula. Al mismo tiempo, el flujo de medios pulsados proporciona los nutrientes necesarios y elimina la acumulación de subproductos metabólicos (Azuaje-Hualde *et al.*, 2017). Los estudios de flujo realizados hasta aquí nos demuestran la factibilidad del sistema propuesto para cultivar células homogéneamente.

Para establecer si efectivamente se cumplen las predicciones del modelo que apuntan a una distribución homogénea de células en los microcanales, se realizó el análisis estadístico que compara la densidad de las células en los cuadrantes en varias cisternas del DMPV de esta tesis. Como se esperaba, no se observaron diferencias significativas en la distribución celular en los canales. En contraste, otros estudios que utilizaron configuraciones de microcanales de cultivo celular en forma de zigzag y rosquillas dieron como resultado un vórtice de flujo y una distribución celular no homogénea (Garza-García *et al.*, 2014), lo que sugiere que el flujo laminar más homogéneo en el diseño que se utilizó en este trabajo puede contribuir a la ocupación celular completa de la superficie de los microcanales.

La morfología celular es una característica importante en las células adherentes y es un determinante importante del crecimiento y la función celular (Su *et al.*, 2013; Jaccard *et al.*, 2014). Para establecer las condiciones óptimas para el cultivo celular en los DMPVs, se sembraron células CHO-K1 y se estudió su proliferación en un cultivo que duro 69 días, mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía de campo claro (**Figura 23 y 24**). Las imágenes obtenidas indican que las células cambiaron de su morfología esférica característica de los cultivos en suspensión observados en el día 1, a la morfología fusiforme de propagación desde el día 3 con apariencia de bordes que sugieren una fuerte adhesión al piso en monocapa (**Figura 24**). Estos resultados confirman que la configuración geométrica de los microcanales del DMPV

otorgaría el flujo laminar y perfil de velocidad reducido en las cisternas. Lo que resultaría en un microambiente adecuado para el crecimiento y proliferación de células adherentes a largo plazo utilizando la estrategia de bombeo pasivo en ciclos de 24 hs. Además, el sistema es adecuado para mantener ciclos sucesivos de cultivo celular durante un período prolongado sin la necesidad de una nueva inoculación, lo que permite el cultivo continuo con el mismo inóculo sin necesidad de realizar un repique. En contraste, estudios previos con cultivo en dispositivos de microfluídica con perfusión continua lograron no más de 5 días de cultivo (Garza-García *et al.*, 2014).

En un trabajo de cultivo de células en dispositivos microfluídicos, se observó un aumento en la adhesión de las células a una superficie de poliestireno con ablación láser (medida como una menor velocidad de migración celular) en comparación con la misma superficie sin el tratamiento (Hisey *et al.*, 2019). El tratamiento de ablación láser forma una rugosidad superficial de micrómetros en el vidrio de los microcanales. En otro estudio (Jeon *et al.*, 2015) se realizó un tratamiento de ablación láser para modelar cráteres a microescala en cuarzo, los cuales, afectaron la adhesión, distribución, morfología y migración de las células. Para evaluar si es posible estabilizar aún más la adhesión celular y mejorar la distribución de las células en el piso de los DMPVs, además del tratamiento con plasma y poli-D-lisina, se modificó la superficie del vidrio con ablación láser. Se evaluó y comparó la adhesión de las células sobre el vidrio con y sin la modificación por ablación laser. Las células se adhirieron adecuadamente al vidrio tratado con ablación laser al igual que al no tratado (**Figura 25**). El problema que se presentó en estos DMPVs fue que en las microfotografías a un aumento de 40X, la monocapa celular no se pudo visualizar bien por la red de microfisuras de geometría variable, generadas en la superficie del vidrio por la ablación láser (**Figura 25.a**). Al darle al vidrio una textura, quizás se mejoraría la adhesión celular por inducción mecánica, sin embargo, no se observó mejora evidente en la adhesión celular con ablación láser comparado con el vidrio sin ablación láser. Por otro lado, la textura generada dificultó el análisis de las imágenes de las células para un seguimiento continuo de las mismas.

Dado que el soporte de vidrio de los DMPVs es propenso a fisurarse, como alternativa se fabricaron DMPVs con el mismo diseño de 4 canales y 16 cisternas de PDMS uniéndose irreversiblemente por exposición al plasma de oxígeno a un piso de PDMS. Las células CHO-K1 se adhirieron con la misma efectividad al piso de PDMS que al de vidrio. Sin embargo, la unión de PDMS-PDMS es más débil que la de PDMS-vidrio y los sucesivos cambios de medio de cultivo realizados en los DMPVs totalmente de PDMS condujo, a que de a poco se vayan despegando y que con los días comiencen a aparecer burbujas en los microcanales.

Como otra alternativa al piso de vidrio del DMPV, se ensayó la realización de DMPVs totalmente de PDMS, pero unidos por presión con un soporte de acrílico. En el trabajo de Liu y Tai (Liu and Tai, 2011) presentaron el desarrollo de un dispositivo de microfluídica para cultivo celular tridimensional (3-D) con mezclador combinatorio integrado de tres entradas, ocho salidas y cámaras de cultivo celular. El dispositivo ensamblado final 3-D se compone de una membrana porosa integrada entre un chip de parileno y otro de PDMS. El PDMS y el parileno se sujetaron mediante dos piezas de acrílico transparente que se fresaron con una máquina de control numérico por computadora. El PDMS de este dispositivo proporcionó un sellado adecuado, donde se cultivaron células neuronales de rata B35 y células de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Los DMPVs con piso de PDMS desarrollados en esta tesis se sellaron por presión con un soporte de acrílico. La ventaja de este tipo de DMPV es que se podría reutilizar el PDMS al no estar pegado, por este motivo producir dispositivos microfluídicos con capacidad de ser reutilizables brindarían una gran ventaja. En contraste con lo reportado en el trabajo de Liu y Tai (Liu and Tai, 2011), el soporte de acrílico que se utilizó en esta tesis no logró un sellado óptimo en todo el PDMS del DMPV, lo que condujo a la entrada de aire y formación de burbujas (**Figura 26**). La formación de burbujas es un problema constante en la microfluidica y los dispositivos de microfluídica reutilizables probados en este trabajo no se escapan de este problema. Por todas estas dificultades, se siguieron empleando los DMPVs de PDMS-vidrio sin tratamiento con ablación láser por la dificultad que se presenta en la cuantificación de células.

Una vez establecido que las células CHO-K1 pueden cultivarse adecuadamente en los DMPVs de PDMS-Vidrio, se evaluó el cultivo de dos líneas celulares, CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b. Estas células CHO-K1 y HEK-293 fueron modificadas para la expresión del anti-hIFN- $\alpha$ 2b, que tendría potenciales aplicaciones para la terapia de enfermedades autoinmunes como el LES (Attallah *et al.*, 2017). Este mAb consiste en un fragmento variable de anticuerpo de cadena única fusionado para el dominio cristalizante de la IgG1 humana (proteína de fusión scFv-Fc recombinante) contra el interferón  $\alpha$  humano 2b recombinante (rhIFN- $\alpha$ 2b) (**Figura 16**). El formato scFv-Fc del mAb consta de dos regiones scFv, una región bisagra y dominios C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 que le permiten reconocer específicamente el antígeno y también unirse a los receptores Fc $\gamma$ Rs, que regula las concentraciones del mAb en suero (Albrecht and DeNardo, 2006). Un ejemplo de un anticuerpo scFv-Fc, es el agente terapéutico scFv-FcC21 completamente humano candidato para atacar los muchos tipos de tumores que expresan el proteoglicano 4 de sulfato de condroitina de la superficie celular, este mAb reconoce tumores de origen neuroectodérmico, carcinomas, mesoteliomas y sarcomas, así como leucemias mieloides (Wang *et al.*, 2011).

La producción del anti-hIFN- $\alpha$ 2b tanto en el cultivo de los DMPVs o en el cultivo en botellas-T, se confirmó con un análisis de transferencia Western, en las cuatro condiciones se detectó el mAb. (**Figura 27**). El scFv-Fc producido por células CHO-K1 y producido por células HEK-293 en el análisis de transferencia Western mostró una banda homogénea de aproximadamente 52,8 kDa (**Figura 27**).

Para determinar la concentración de mAbs funcionales en el tiempo (la productividad) en los DMPVs, se monitoreo la concentración de anti-hIFN- $\alpha$ 2b producida diariamente por CHO-ahIFN $\alpha$ 2b (**Figura 28.a**) y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b (**Figura 28.b**) durante 26 y 24 días simultáneamente en los tres DMPVs independientes mediante ELISA indirecto específico (**Figura 28**). En los primeros 2 días, la concentración de mAb secretada aumentó a aproximadamente 64  $\mu$ g/ml para CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y 33,3  $\mu$ g/ml para HEK-ahIFN $\alpha$ 2b, el momento en el que ambas líneas celulares alcanzaron una meseta de expresión de mAbs. Posteriormente, la producción aumentó nuevamente desde el día 19 hasta el final del cultivo. Durante la fase de cultivo de producción, se observó un aumento progresivo en las señales de estrés celular en la morfología celular, lo que se espera debido a la concentración reducida de suero en el medio de cultivo de producción. Esto puede afectar el crecimiento y la proliferación celular, redirigiendo el metabolismo celular principalmente a la producción de anticuerpos (Metallo and Vander Heiden, 2013; Young, 2013).

En este estudio se demuestra que la concentración promedio del mAb producido por células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b fue mayor que por células HEK-ahIFN $\alpha$ 2b y que las CHO-ahIFN $\alpha$ 2b alcanzaron el valor máximo (166,4  $\mu$ g/ml) el día 24 de cultivo (**Figura 28**). Los cultivos de células adherentes en botellas-T también mostraron niveles de expresión significativamente más altos de mAbs producidos por la línea celular CHO que por HEK (Attallah *et al.*, 2017).

La producción promedio del anti-hIFN- $\alpha$ 2b como candidato terapéutico observada en los DMPVs utilizando ambas líneas celulares fue superior en comparación con la obtenida en botellas-T en paralelo, con valores 1,36 y 1,70 veces más altos en CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b, respectivamente (**Tabla 1**). Además, la productividad general en picogramos de anti-hIFN- $\alpha$ 2b por célula y la productividad por día determinada en los DMPVs en ambas líneas celulares fueron más altas en comparación con la obtenida en botellas-T en paralelo, con valores de 5,89 y 7,31 veces mayor en CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b, respectivamente. Estos resultados sugieren que existen ventajas en el cultivo de células adherentes en los DMPVs, que muestran un aumento en el rendimiento del producto durante períodos de tiempo más largos en comparación con escalas más altas en condiciones de cultivo. Garza García y col. (Garza-García *et al.*, 2014), informaron que la concentración más alta de mAb que obtuvieron, producida en un dispositivo



microfluídico con una configuración de cámaras en serie en forma de donas, fue de 7,2  $\mu\text{g/ml}$  con tiempos de residencia de flujo constante de menos de un minuto, siendo las tasas de producción de 3 órdenes de magnitud superiores a los observados en biorreactores de tanques alimentados que utilizan células en suspensión. En comparación, el sistema utilizado en esta tesis alcanzó un valor máximo de concentración de mAb 23 veces mayor que el informado por Garza García y col. (Garza-García *et al.*, 2014), con valores de producción promedio (**Tabla 1**) entre 11 y 7 veces más altos que los reportados por estos autores.

La ventaja de producir mAbs en cultivos celulares adherentes en DMPVs puede explicarse porque los dispositivos microfluídicos exhiben una alta relación superficie/volumen, muchas veces mayor que los métodos de cultivo celular estándar, lo que conduce a un suministro de nutrientes más eficiente y evita la dilución de moléculas secretadas. Los volúmenes del medio de cultivo en microlitros y la muy baja relación de volumen de célula a célula son los factores que caracterizan tanto los microcanales de los dispositivos como los micronichos celulares *in vivo* (Ziółkowska *et al.*, 2011).

Una preocupación con respecto al uso de dispositivos de microfluídica es la estabilidad y robustez del sistema de cultivo durante períodos prolongados de operación para la producción piloto de productos biofarmacéuticos (Garza-García *et al.*, 2014). Un informe anterior sobre la producción de mAbs en dispositivos microfluídicos mostró un tiempo de cultivo máximo de 5 días (Garza-García *et al.*, 2014). En contraste, aquí se demuestra que el cultivo celular en un dispositivo de microfluídica puede funcionar durante 69 días y que diferentes líneas celulares que expresan un nuevo mAb terapéutico pueden cultivarse al menos durante 24 días, logrando concentraciones significativamente mejores que las condiciones de cultivo estándar. Estos resultados respaldan la viabilidad del funcionamiento continuo del sistema a largo plazo y, por lo tanto, su uso potencial en la producción a escala piloto.

Además de comparar la producción promedio del anti-hIFN- $\alpha$ 2b entre los DMPVs y las botellas-T, se compararon los atributos de calidad vinculados a la actividad biológica del anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido por ambos métodos. Se evaluó la capacidad de inhibición de la actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b, de los mAbs producidos en los DMPVs y en botellas-T. La actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b se determinó mediante su capacidad para inhibir el crecimiento de células Daudi (Nederman *et al.*, 1990; Ceaglio *et al.*, 2008). Por el contrario, el efecto neutralizante del mAb se evaluó como la capacidad de permitir el crecimiento celular. La concentración necesaria para neutralizar el 50% de la actividad antiproliferativa máxima

inducida por rhIFN- $\alpha$ 2b ( $IC_{50}$ ) de los anticuerpos producidos en DMPVs no fue significativamente diferente a la  $IC_{50}$  de los anticuerpos producidos en las botellas-T (**Figura 29.a**).

También, se evaluó la capacidad de los mAbs producidos en los DMPVs y en botellas-T para neutralizar la señalización de rhIFN- $\alpha$ 2b. La señalización de células HeLa reporteras (Mx2/eGFP) de rhIFN- $\alpha$ 2b, se evidencia mediante el gen reportero eGFP que está bajo el control del promotor Mx2 que es inducido por rhIFN- $\alpha$ 2b. La expresión de eGFP en las células fue evaluada por citometría de flujo. Se determinó la concentración de mAb necesaria que produjo la neutralización del 50% de la fluorescencia máxima utilizando células HeLa ( $FRC_{50}$ ) inducida por rhIFN- $\alpha$ 2b. El  $FRC_{50}$  de los mAbs producidos por ambas líneas celulares usando ambos métodos tampoco exhibió diferencias significativas (**Figura 29.b**).

Esta es la primera vez que los atributos de calidad de bioterapéuticos producidos en dispositivos microfluídicos se prueban en paralelo con los producidos por el cultivo celular adherente en botellas-T. Los resultados sugieren que la producción en el DMPV no altera significativamente la función biológica de los anticuerpos en términos de su capacidad de unión y neutralización de la citoquina, en comparación con los producidos con el método tradicional de cultivo de células adherentes.

Hasta aquí se presenta una prueba de concepto para un DMPV de 4 canales con diseño de cisternas secuenciales para el cultivo de células de mamíferos adherentes con un intercambio de medio periódico para expresar proteínas recombinantes (**Figura 43**). La simulación computacional de la velocidad del flujo en los microcanales del dispositivo diseñado mostró la distribución uniforme del fluido. Asimismo, la cuantificación de células CHO-K1 en los diferentes dominios del dispositivo estableció una distribución celular homogénea, evidenciando condiciones óptimas para la adhesión y crecimiento celular. Curiosamente, las células podrían cultivarse en el dispositivo durante más de dos meses. Además, los atributos de calidad del mAb producido en los DMPV no mostraron diferencias significativas en comparación con el mAb producido con el método tradicional a mayor escala, lo que sugiere que el sistema es adecuado y puede ser ventajoso para el desarrollo del mAb destinado a uso terapéutico.



de cámaras y canales interconectados (Ballesteros Hernando *et al.*, 2019). Asimismo, los dispositivos de microfluídica diseñados para albergar cultivos celulares están lejos de ser el nuevo estándar, ya que aún presentan inconvenientes. Particularmente, en su mayoría funcionan como dispositivos de una sola réplica. Esto es altamente incompatible con grandes procesos experimentales que exigen un alto rendimiento y un alto número de réplicas (por ejemplo, exámenes preclínicos de fármacos *in vitro*) (Visone *et al.*, 2019). La necesidad de paralelización es primordial para permitir la detección rápida de múltiples compuestos y concentraciones con un número estadísticamente significativo de réplicas y controles. Dicho avance debe estar disponible a través de operaciones fáciles de usar, compatibles con equipos y procedimientos de laboratorio estándar para facilitar la adopción de cultivos en dispositivos de microfluídica como nuevos estándares en la investigación básica o la detección traslacional de drogas.

El DMPV multicámara diseñado en esta tesis (**Figura 10**) trata de reproducir de alguna manera las placas multipocillos, para aumentar el rendimiento de cultivos celulares en sistemas microfluídicos. En el DMPV multicámara se analizaron los efectos de concentraciones crecientes de Suero Fetal Bovino (SFB) en la línea celular HEK-293T durante 10 días de cultivo celular. Además, se desarrolló un software de procesamiento y análisis de imágenes basado en Python para el crecimiento celular (PIACG) y se utilizó este software para cuantificar el área total de las cámaras de los DMPVs ocupado por células, en respuesta a las diferentes concentraciones de SFB analizadas, proporcionando información sobre la tasa de proliferación celular en respuesta cada condición experimental por triplicado durante 10 días de cultivo.

El análisis automatizado es un método más objetivo que el análisis manual de imágenes y por lo tanto, mejora la reproducibilidad (Hodneland *et al.*, 2013). A través de la segmentación celular que realiza PIACG, se pueden monitorear características como el volumen y la forma celular en el tiempo. Algunos autores (Hodneland *et al.*, 2013) argumentan que la segmentación celular en imágenes de células no coloreadas es ventajosa para cuantificar células individuales, pero los límites no se observan fácilmente, especialmente en cultivos donde las células están densamente agrupadas. Para evitar estos problemas, el cultivo celular en el DMPV se mantuvo controlando la confluencia para que no se dificultara la diferenciación de los límites celulares. El software PIACG es capaz de discriminar las células individuales con respecto al fondo en escala de grises. Este software permitió calcular el área unicelular y el área total de las cámaras del DMPV ocupada por el cultivo celular.

A su vez, se comparó el porcentaje del área celular obtenida por conteo manual, con ImageJ y por cuantificación con el software PIACG en las cámaras del DMPV (**Figura 33**). Los resultados obtenidos por el análisis PIACG coinciden con el análisis manual de las imágenes realizado, validando la efectividad del sistema. En cambio, al cuantificar con ImageJ se advierte que las áreas con células son siempre menores en comparación con las cuantificadas con PIACG y manualmente. Esto se debe a la necesidad de preprocesamiento de imágenes (ajustes como brillo y contraste) requerido por ImageJ frente a la cuantificación por PIACG que no necesita un preprocesamiento de la imagen. Si bien la cuantificación manual y otros softwares de análisis de imágenes requieren condiciones óptimas de brillo/contraste en la imagen y, por ende, la manipulación previa de las imágenes a cuantificar, PIACG permite la cuantificación del área celular sin necesidad de ajustes previos en las imágenes, ahorrándole al investigador un tiempo considerable de análisis y ofreciendo resultados más precisos. En esta tesis, el software PIACG se propone como una herramienta para la cuantificación del área ocupada en cultivos celulares de un tipo celular específico. En el futuro, se podría implementar un plugging para discriminar entre fenotipos celulares en cultivos celulares mixtos por segmentación.

Para probar la efectividad del software PIACG, se realizó un análisis comparativo con el software ImageJ del área de las cámaras del DMPV ocupada por las células, en respuesta a diferentes concentraciones de SFB durante los 10 días de cultivo de células HEK-293T. Se comparó la precisión del área celular detectada por ambos softwares, utilizando curvas de crecimiento de la línea celular HEK-293T como parámetro comparativo. Las curvas de crecimiento celular tienen perfiles similares en el análisis con ambos softwares (**Figura 34**). Los softwares ImageJ (Arena *et al.*, 2017) y Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) son herramientas analíticas muy útiles para el análisis de imágenes y cuantificación celular. Sin embargo, a pesar de ser útiles para el procesamiento de imágenes de fluorescencia y contraste de fase, a menudo no brindan buenos resultados a partir de imágenes de microscopía óptica de transmisión, debido a la variación intrínseca de la técnica de adquisición en sí y a la variabilidad introducida entre la adquisición de imágenes por parte de los operadores y por equipo (Buggenthin *et al.*, 2013). El software PIACG desarrollado en este trabajo permite un análisis automático y cuantificación celular de cientos de imágenes simultáneamente. El objetivo de este software es ofrecer una solución general y un ahorro de tiempo considerable en el análisis de datos, a través de una interfaz de usuario sencilla y sensible.

Desde el punto de vista biológico, el área de las células en el DMPV multicámara se ha utilizado como medida de la tasa de proliferación celular. Las células sometidas a tratamientos con 10% de SFB durante 10 días de cultivo celular (**Figura 36.E**) fueron las que ocuparon la mayor

superficie de la cámara y, en consecuencia, presentan mayor tasa de proliferación celular. Este resultado coincide con el hecho de que, en los cultivos convencionales, se utiliza 10% de SFB para complementar el medio de cultivo de células HEK-293T. Con la ausencia (**Figura 36.A**) o con concentraciones más bajas de SFB (**Figuras 36.B, 36.C y 36.D**), se observa una disminución del área ocupada por las células en la cámara, en comparación con la concentración de SFB al 10% y, en consecuencia, una reducción en la tasa de proliferación celular. Este resultado también se detecta en células cultivadas con 20% de SFB durante 10 días de cultivo (**Figura 36.F**). Los efectos sobre la unión de las células al sustrato debido a una exposición prolongada a bajas concentraciones de SFB, es debido probablemente a los efectos que se ejercen sobre las proteínas de anclaje/citoesqueleto de las células (Su *et al.*, 2013). Con respecto a las curvas de crecimiento celular obtenidas en dispositivos de microfluídica en comparación con otro tipo de sustratos, algunos estudios (Paguirigan and Beebe, 2009) han demostrado que la tasa de proliferación celular varía significativamente entre cultivos en dispositivos microfluídicos y macrocultivo. Estos autores observan una inhibición significativa de la tasa de proliferación celular en los dispositivos de microfluídica en comparación con los macrocultivos y explican este hecho debido al aumento de la tasa metabólica, incremento de marcadores de estrés celular, así como interacciones célula/medio con el material del dispositivo de microfluídica que observan en estos cultivos celulares frente a los cultivos celulares en otro tipo de soportes.

En esta tesis se presenta un nuevo método para restaurar imágenes microscópicas libres de artefactos que son adecuadas para la segmentación por umbralización directa. Este método está orientado a contar el número total de células, por lo que no hace una segmentación completa de la morfología celular, solo del soma, no delimitando la estructura completa de la célula. Aunque genera una comparación en imágenes de contraste de fase, el software PIACG es capaz de segmentar completamente la morfología celular, cuantificando otro parámetro de interés: el área total ocupada por la población celular en las cámaras del DMPV y, por consiguiente, la confluencia del cultivo celular en el DMPV.

Recientemente, luego de desarrollar PIACG, se lanzó DeepImageJ (Gómez-de-Mariscal *et al.*, 2021). Este software es una solución fácil de usar que permite el uso genérico de modelos de aprendizaje profundo previamente entrenados para el análisis de imágenes biomédicas en ImageJ. DeepImageJ da acceso al mayor repositorio de bioimágenes de modelos de aprendizaje profundo previamente entrenados (BioImage Model Zoo). Por lo tanto, los no expertos pueden realizar fácilmente tareas comunes de procesamiento de imágenes en la investigación de las ciencias de la vida con herramientas basadas en el aprendizaje profundo que incluyen clasificación de píxeles y objetos, segmentación de instancias, eliminación de ruido o tinción

virtual. El complemento StarDist hace que la herramienta más poderosa para la detección y segmentación de núcleos celulares en imágenes de microscopía sea accesible en ImageJ (Gómez-de-Mariscal *et al.*, 2021). Los programas para cuantificación de células desde fotografías de microscopía de campo claro siguen siendo un área de gran crecimiento y desarrollo progresivo.

Al comprobar la gran utilidad y buen rendimiento de los DMPVs con los experimentos anteriores, se decidió escalar los dispositivos incrementando el número de canales y su largo, y de esta manera aumentar el volumen total del dispositivo, manteniendo la dimensión de los microcanales. En la literatura se han reportado escasos trabajos de dispositivos de microfluídica de gran volumen para cultivo de células (Thorsen *et al.*, 2002; Mozdierz *et al.*, 2015). Los biorreactores con un volumen de trabajo entre 1 y 250 ml se considerarán minibiorreactores (Ladner *et al.*, 2017). En esta tesis se diseñó un dispositivo de microfluídica de gran volumen (DMGV), de 32 canales con un volumen de trabajo total de 2,8 ml con canales de entrada y salida del flujo con bordes curvados y sin ángulos rectos. Una vez realizado el dispositivo de PDMS/vidrio, el llenado y los cambios de medio de cultivo en el DMGV se realizaron automáticamente con una bomba de jeringa, este método es ampliamente utilizado en la literatura para el llenado de dispositivos de microfluídica (Chen *et al.*, 2018; Christoffersson and Mandenius, 2019; Komen *et al.*, 2020; Rahman *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). El flujo de medio de cultivo de entrada al DMGV se programó con la bomba de jeringa a 300  $\mu\text{l}/\text{min}$  por 10 min, para que cada 24 hs se renueve medio de cultivo en un circuito cerrado estéril.

Para constatar que el flujo circula homogéneamente en todo el DMGV diseñado, se realizó una simulación computacional del flujo del interior del DMGV. Las velocidades de flujo calculadas dentro del DMGV muestran áreas de flujo reducido en las cisternas (**Figura 37.a**). El flujo laminar general en el DMGV al igual que en el DMPV asegura un transporte de masa difusora que permite la generación de una monocapa celular homogénea continua (Huang *et al.*, 2010). Las áreas de presión reducida se muestran en la salida del dispositivo y los valores más altos en la entrada del DMGV (**Figura 37.b**). Estos valores al igual que los del DMPV están dentro de los observados en el entorno fisiológico del epitelio ovárico humano (Avraham-Chakim *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que los microcanales del DMGV otorgarían flujo laminar, perfil de velocidad y presión reducidos. Lo que resultaría en un microambiente adecuado para el crecimiento y proliferación de las células adherentes a largo plazo con bombeo discontinuo en ciclos de 24 hs. Las células CHO que se sembraran y cultivaran en el DMGV serían tolerantes a la presión que se ejercería dentro del dispositivo (Brás *et al.*, 2017) y se esperaría que no afecte significativamente la producción de proteínas recombinantes en este sistema.

El modelado computacional del flujo dentro del DMGV brindaría evidencia que éste sería un método adecuado para cultivo de células adherentes. Por ello, se sembró y cultivó la línea celular CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en el DMGV y se estudió su proliferación durante 18 días mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía de campo claro. La morfología de la mayoría de las células fue fusiforme con apariencia de bordes que sugieren una fuerte adhesión al piso del DMGV (Su *et al.*, 2013), llegando a una monocapa al día 7 de cultivo, manteniéndose constante por los siguientes 11 días, finalizando el experimento a los 18 días de cultivo (**Figura 38**). El número de células máximo en el DMGV fue de 670 células/mm<sup>2</sup> y se mantuvo constante a lo largo del tiempo. El cultivo de células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b dentro del DMGV tuvo una duración de 18 días. Si bien es un periodo de tiempo menor a comparación del cultivo de células en los experimentos en los DMPV que fueron de 69 días para el cultivo de células CHO-K1, 26 días para las CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y 24 días para las HEK-ahIFN $\alpha$ 2b. Es un tiempo mayor al que se ha reportado anteriormente en la literatura (Garza-García *et al.*, 2014; Peñaherrera *et al.*, 2016; Ballesteros Hernando *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Visone *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2021), solo un trabajo se ha encontrado en la literatura que reporta un mayor tiempo de cultivo de células (28 días) encapsuladas en hidrogel de alginato en un dispositivo microfluídico (Enck *et al.*, 2020).

Las células de mamífero son el sistema de expresión preferido para los anticuerpos terapéuticos porque la maquinaria celular para la glicosilación es similar a la de las células humanas (Wacker *et al.*, 2011). En trabajos previos (Liu *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015) se ha demostrado que la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo puede afectar la glicosilación de un anticuerpo secretado por células CHO. Además, los intervalos periódicos de agotamiento de glucosa del medio de cultivo durante los cultivos por lotes alimentados provocan una producción de anticuerpos con niveles bajos de glicosilación o directamente no glicosilados (Liu *et al.*, 2014). Liu y col. (Liu *et al.*, 2014), también observaron una fuerte correlación positiva entre el período de tiempo en que las células estuvieron expuestas al agotamiento de la glucosa y la proporción de anticuerpos no glicosilados. Por otra parte, existen relaciones definidas entre la estructura y la función de los glicanos de los anticuerpos (Seo *et al.*, 2014), por eso es importante controlar la consistencia de la glicosilación en un bioproceso para garantizar la función deseada. Como ejemplo, recientemente se ha evidenciado que diferencias en la glicosilación de la región Fc del anti-hIFN- $\alpha$ 2b, tienden a modificar la capacidad de neutralización *in vitro* de este tipo de moléculas (Attallah *et al.*, 2020). Por estos antecedentes, se decidió cuantificar los niveles de glucosa y lactato de los medios de cultivo de CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en el tiempo, del DMGV y de las botellas-T en paralelo. La concentración de glucosa del DMGV se mantuvo alta y la concentración de lactato se mantiene baja respecto a las del cultivo en botella-T a lo largo de



los días del experimento (**Figura 39**). Cabe la aclaración que el cambio de medio de cultivo del DMGV fue cada 24 hs mientras que en las botellas-T fue cada 48 hs y la densidad celular en el DMGV fue de  $6,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y en la botella-T de  $1,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Al haber mayor densidad celular y menor frecuencia de renovación de medio de cultivo en la botella-T comparado con el DMGV, hay un mayor consumo de glucosa en las botellas-T y en cambio, en el DMGV se observa que siempre hay glucosa disponible para el consumo de las células. Al no haber agotamiento de glucosa en el DMGV, se espera entonces que los mAbs producidos, estén completa y correctamente glicosilados.

Se determinó también la producción diaria del anticuerpo anti-hIFN- $\alpha$ 2b funcional secretado por las células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b durante el periodo de cultivo en el DMGV mediante ELISA indirecto específico. Se comparó la productividad específica por día del anti-hIFN- $\alpha$ 2b en los cultivos en botella-T y en el DMGV. En contraste con lo observado en los DMPV, la productividad específica de la línea celular CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en el DMGV resultó menor que en la botella-T (**Tabla 2**). Esto puede deberse a que en el DMGV no se llegó a una densidad celular tan alta como en los DMPV (**Figura 38**), lo que puede haber afectado el estado metabólico de las células, reduciendo su productividad (Nolan and Lee, 2011; Metallo and Vander Heiden, 2013; Su *et al.*, 2013; Young, 2013; Pereira *et al.*, 2018).

Para caracterizar cuantitativamente las interacciones proteína-proteína es necesario determinar la constante de afinidad ( $K_A$ ) de equilibrio. Un método conveniente destinado a medir la  $K_A$  en solución de un mAb por su antígeno, es la técnica ELISA que se ha adaptado para determinar la especificidad epitópica de los mAbs (Friguet *et al.*, 1983). Un ELISA permite la determinación de la constante de disociación del equilibrio antígeno-mAb en solución, después de alcanzar el equilibrio para medir la cantidad de anticuerpo libre que queda en solución (Friguet *et al.*, 1985). Se evaluó la  $K_A$  por ELISA competitivo del anti-hIFN- $\alpha$ 2b en el DMGV en comparación con el producido en botellas-T para analizar si las condiciones de cultivo podrían afectar la capacidad de los mAbs de unirse a la citoquina soluble (Friguet *et al.*, 1985). Sorprendentemente en el DMGV se logró producir anticuerpos que presentan mayor constante de afinidad respecto de los producidos en botellas-T. El anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido en el DMGV presentó un valor de la  $K_A$  2 veces mayor respecto al anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido en botellas-T (**Tabla 2**), exhibiendo una capacidad de unión al rhIFN- $\alpha$ 2b significativamente mayor. Una posible explicación a lo observado aquí, es que la unión del mAb por el epítipo puede ser afectada por la glicosilación del anticuerpo, que a su vez, puede variar por la disponibilidad de glucosa (Attallah *et al.*, 2020).

Se analizaron, además, otros atributos de calidad del mAb vinculados a su actividad biológica. En particular, se evaluó la capacidad para neutralizar la actividad antiproliferativa de rhIFN- $\alpha$ 2b o la señalización de rhIFN- $\alpha$ 2b por la acción del mAb producido en el DMGV por células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en comparación con la producida por la misma línea celular utilizando el método de cultivo en botellas-T. Se calculó la concentración de mAbs necesaria para inhibir el 50% de la actividad antiproliferativa de la citoquina rhIFN- $\alpha$ 2b ( $IC_{50}$ ) producido por CHO-ahIFN $\alpha$ 2b utilizando el DMGV o botellas-T. La  $IC_{50}$  de los mAbs producidos en el DMGV fue significativamente menor a la  $IC_{50}$  de los anticuerpos producidos en las botellas-T (**Figura 41.c y 41.d**). Se calculó la inhibición de la señalización correspondiente a la concentración del mAb producido por CHO-ahIFN $\alpha$ 2b usando el DMGV o botellas-T, necesaria para reducir el 50% de la fluorescencia ( $FRC_{50}$ ) medida por citometría de flujo. Como en el experimento anterior, los anticuerpos producidos por la línea celular usando el cultivo en botella-T exhibió el  $FRC_{50}$  significativamente mayor que en el DMGV (**Figura 41.a y 41.b**). Estos resultados sugieren que la producción en el DMGV mejora significativamente la función biológica del anticuerpo anti-hIFN- $\alpha$ 2b en términos de su capacidad de unión y neutralización de la citoquina, en comparación con los producidos con el método tradicional de cultivo de células adherentes.

Para el caso del DMGV se analizó también otro atributo de calidad, se calculó la capacidad del anti-hIFN- $\alpha$ 2b para neutralizar la actividad biológica antiviral del rhIFN- $\alpha$ 2b. La actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b se evaluó en presencia de mAbs producidos en el DMGV o en botellas-T (**Figura 41.e y 41.f**). El título de anticuerpo neutralizante se definió como la concentración de anticuerpo que neutraliza el 40% del efecto antivírico inducido por rhIFN- $\alpha$ 2b ( $IC_{40}$ ). Los mAbs producidos en el DMGV mostraron capacidad de neutralización de la actividad biológica de rhIFN- $\alpha$ 2b significativamente mayor que los mAbs producidos en botellas-T. Estos resultados deben considerarse con precaución ya que la actividad neutralizante depende de la afinidad del mAb por área de unión al receptor de la citoquina. Además, para los anticuerpos que reconocen un epítipo común, se supone que su creciente afinidad está relacionada con su creciente neutralización. En este caso, el anti-hIFN- $\alpha$ 2b con la mayor afinidad por rhIFN- $\alpha$ 2b mostró la mayor actividad neutralizante. La actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b se vio significativamente menos afectada por los mAbs de las botellas-T que por los del DMGV, lo que respalda la idea de una fuerte correlación entre la afinidad del mAb por la citoquina y la neutralización de la actividad de la misma.

Estos últimos experimentos, evidencian que las mismas moléculas producidas por las mismas células de mamíferos en distintos métodos de cultivo, tienen diferente capacidad para neutralizar el rhIFN- $\alpha$ 2b. La actividad neutralizante depende tanto de la afinidad del anticuerpo

como de la capacidad del anticuerpo para bloquear un área de unión al receptor de la citoquina. Una forma de explicar lo observado con respecto a los atributos de calidad del mAb estudiado en esta tesis, es relacionándolo con los resultados obtenidos de las concentraciones de glucosa medidas en los dos métodos que se comparan aquí. Previamente, se ha informado que las diferencias estructurales en los dominios de las regiones constantes de la cadena pesada de los anticuerpos, son responsables de las diferencias en las constantes de afinidad y, en consecuencia, de las variaciones en la unión de antígeno (Torres *et al.*, 2007; Hovenden *et al.*, 2013). El mecanismo de este efecto podría implicar la transformación de la estructura del sitio de unión en una forma cinéticamente más competente en mAbs con afinidades de unión más altas (Pritsch *et al.*, 2000). Por otra parte, el anti-hIFN- $\alpha$ 2b posee sitios de N-glicosilación en su región Fc. La glicosilación de un anticuerpo puede verse afectada por las condiciones de cultivo en cuanto a la disponibilidad de glucosa y esto a su vez, puede afectar la unión del mAb por el epítipo (Attallah *et al.*, 2020). Como la N-glicosilación representa la principal modificación post-traduccional de los anticuerpos producidos por células de mamíferos (Wacker *et al.*, 2011), se puede plantear como hipótesis de que la N-glicosilación del Fc podría afectar la afinidad del mAb en la unión a rhIFN- $\alpha$ 2b (Attallah *et al.*, 2020). Aunque, en un trabajo de la literatura se informa lo opuesto: diferencias refinadas en la estructura del N-oligosacárido ligado al Fc, muestran la misma afinidad de unión al antígeno (Kanda *et al.*, 2007).

Existe entonces la hipótesis de que alguna modificación, principalmente en la región Fc, podría tener un impacto sobre las propiedades de unión antígeno-mAb (Attallah *et al.*, 2020). Aunque varios factores pueden influir en la capacidad neutralizante del anti-hIFN- $\alpha$ 2b, esta tesis presenta el probable impacto de la N-glicosilación del Fc sobre la capacidad de unión al antígeno. La glicosilación en la región Fc del anticuerpo se considera una característica importante que influye en las propiedades efectoras, pero su impacto en la unión al antígeno no se estudia con regularidad.

# Conclusiones

---

- Se desarrolló un método innovador para la producción de mAbs mediante un DMPV de perfusión discontinua, compuesto por 4 microcanales con 16 cisternas.
- La simulación computacional del flujo en el DMPV de 4 microcanales brindó información de velocidad de flujo y tensión de corte reducidas y distribución uniforme del fluido en las cisternas, lo que permitirían un crecimiento celular adecuado para la adhesión y el crecimiento de células que generarían una monocapa celular homogénea y continua dentro del DMPV.
- Se lograron cultivar células CHO-K1 en los DMPVs de 4 microcanales por un plazo de 69 días, la distribución celular en los canales se observó homogénea y sin formación de burbujas.
- No se observó mejora evidente en la adhesión celular con ablación láser comparado con el vidrio sin ablación láser en DMPVs de 4 cisternas y, además, el soporte de acrílico no logró un sellado óptimo en todo el PDMS del DMPV, ya que condujo a la entrada de aire y formación de burbujas. Por estos motivos, se siguieron empleando los DMPVs de PDMS-vidrio sin tratamiento con ablación láser.
- Se estudió la producción del anticuerpo quimérico anti-hIFN- $\alpha$ 2b de las células productoras CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y HEK-ahIFN $\alpha$ 2b en DMPVs de 4 microcanales, por al menos 24 días. La concentración promedio del mAb producido por CHO-ahIFN $\alpha$ 2b alcanzó el valor máximo de 166,4  $\mu$ g/ml el último día de cultivo. La producción promedio de anti-hIFN- $\alpha$ 2b en los DMPVs fue superior en comparación con la obtenida en botellas-T, con valores 1,36 veces más altos en CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y 1,70 veces más altos en HEK-ahIFN $\alpha$ 2b. Además, la productividad de anti-hIFN- $\alpha$ 2b por célula, por día determinada en los DMPVs fue más alta en comparación con la obtenida en botellas-T, con valores 5,89 veces mayor en CHO-ahIFN $\alpha$ 2b y 7,31 veces mayor en HEK-ahIFN $\alpha$ 2b.
- La producción de anti-hIFN- $\alpha$ 2b en DMPVs de 4 microcanales no altera significativamente la función biológica de los mAbs en términos de su capacidad de unión y neutralización de la citoquina rhIFN- $\alpha$ 2b, en comparación con el mAb producido por el método estándar de cultivo de células adherentes en botella-T.

- Se observó que es posible realizar una transfección con pseudovirus en un cultivo de células adherentes, HEK-293T en DMPVs de 4 canales, por un lapso de 9 días.
- Se presentó un software de procesamiento de imágenes, el análisis de imágenes basado en Python para el crecimiento celular (PIACG), que es capaz de calcular de forma altamente eficiente el área total de cada cámara ocupada por células HEK-293T con morfología fusiforme y redondeada en respuesta a diferentes concentraciones de suero fetal bovino en el DMPV multicámara, a partir de imágenes de microscopía de campo claro. Se observó que las áreas con células cuantificadas por el software PIACG son muy similares a las cuantificadas manualmente. Por otra parte, PIACG tiene una capacidad similar al ImageJ en detectar el área celular ocupada en las cámaras del DMPV en respuesta a los tratamientos con concentraciones crecientes de SFB en cultivos de 10 días de duración.
- La simulación computacional del flujo en el DMGV de 32 canales brindó información de velocidad de flujo y presión reducidas y distribución uniforme del fluido en los canales, lo que permitirían un crecimiento celular adecuado para la adhesión y el crecimiento de células que generarían una monocapa celular homogénea y continua dentro del DMGV.
- Se lograron cultivar células CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en el DMGV de 32 canales por un período de 18 días, la distribución celular en los canales se observó homogénea.
- Se observó que la concentración de glucosa en el medio de cultivo del DMGV se mantiene alta respecto del cultivo en botella-T y la concentración de lactato se mantiene baja en el cultivo en el DMGV con respecto al cultivo en botella-T a lo largo de 18 días.
- Se observó que la productividad específica por día del anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido por la línea CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en el DMGV fue 14 veces menor que en los cultivos en botellas-T.
- El anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido por la línea CHO-ahIFN $\alpha$ 2b en el DMGV presentó valores de  $K_A$  2 veces mayor respecto al anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido por la línea misma línea en botellas-T.

- Se observó que la función biológica en términos de la capacidad neutralizante de la actividad antiproliferativa, de la señalización y de la actividad antiviral de rhIFN- $\alpha$ 2b por el anti-hIFN- $\alpha$ 2b producido en el DMGV de 32 canales fue significativamente mayor en comparación con el mAb producido con el método estándar de cultivo de células adherentes en botella-T.
- El anti-hIFN- $\alpha$ 2b con mayor afinidad por rhIFN- $\alpha$ 2b también mostró la mayor actividad neutralizante.

El anticuerpo quimérico scFv-Fc anti-hIFN- $\alpha$ 2b se empleó como modelo para estudiar la capacidad de las células adheridas en los dispositivos de microfluídica para expresar proteínas recombinantes funcionales con usos potencialmente terapéuticos. Desarrollando de esta manera distintos dispositivos LOC de utilidad práctica, teniendo en cuenta que los mAbs de uso terapéutico tienen un enorme valor agregado y gran número de aplicaciones en medicina. Con el desarrollo de los dispositivos de microfluídica para la producción de mAbs, se busca obtener prototipos novedosos e innovadores, contribuyendo de esta manera a la ciencia básica y tecnología nacionales. Los dispositivos fabricados en esta tesis están destinados a optimizar y reemplazar los equipos biorreactores actuales y también podrían utilizarse en la generación y selección de clones y desarrollo de ensayos biológicos, ahorrando tiempo y materiales y optimizando las metodologías tradicionales usadas actualmente en los laboratorios de biología.

# Referencias

---



Abaci, H.E., Devendra, R., Smith, Q., Gerecht, S., Drazer, G., 2012. Design and development of microbioreactors for long-term cell culture in controlled oxygen microenvironments. *Biomedical microdevices* 14, 145-152.

Abu-Absi, S.F., Yang, L., Thompson, P., Jiang, C., Kandula, S., Schilling, B., Shukla, A.A., 2010. Defining process design space for monoclonal antibody cell culture. *Biotechnol Bioeng* 106, 894-905.

Agrawal, V., Bal, M., 2012. *BioProcess Int* <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/expression-platforms/strategies-for-rapid-production-of-therapeutic-proteins-in-mammalian-cells-329018/>.

Ai, Y., Xie, R., Xiong, J., Liang, Q., 2020. Microfluidics for Biosynthesizing: from Droplets and Vesicles to Artificial Cells. *Small* 16, 1903940.

Albelda, S.M., Buck, C.A., 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4, 2868-2880.

Albrecht, H., Burke, P.A., Natarajan, A., Xiong, C.Y., Kalicinsky, M., DeNardo, G.L., DeNardo, S.J., 2004. Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand. *Bioconjug Chem* 15, 16-26.

Albrecht, H., DeNardo, S.J., 2006. Recombinant antibodies: from the laboratory to the clinic. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 21, 285-304.

Alt, F.W., Blackwell, T.K., Yancopoulos, G.D., 1987. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238, 1079-1087.

ANMAT, 2011a. ANMAT. Disposición N°7729/11

[http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/noviembre\\_2011/Dispo\\_7729-11.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/noviembre_2011/Dispo_7729-11.pdf).

ANMAT, 2011b. ANMAT. Disposición N° 7075/11

[http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/octubre\\_2011/Dispo\\_7075-11.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2011/Dispo_7075-11.pdf).

ANMAT, 2012. ANMAT. Disposición N°3397/12.

[http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/junio\\_2012/Dispo\\_3397-12.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/junio_2012/Dispo_3397-12.pdf)

ANMAT, 2018. ANMAT. Disposición N°N°3602/18

[http://www.anmat.gob.ar/boletin\\_anmat/BO/Disposicion\\_3602-2018.pdf](http://www.anmat.gob.ar/boletin_anmat/BO/Disposicion_3602-2018.pdf)

Arena, E.T., Rueden, C.T., Hiner, M.C., Wang, S., Yuan, M., Eliceiri, K.W., 2017. Quantitating the cell: turning images into numbers with ImageJ. *WIREs Developmental Biology* 6, e260.

Attallah, C., Aguilar, M.F., Forno, G., Etcheverrigaray, M., Brigido, M.M., Maranhão, A.Q., Oggero, M., 2020. The glycosylation of anti-rhIFN- $\alpha$ 2b recombinant antibodies influences the antigen-neutralizing activity. 42, 1369-1381.

- Attallah, C., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., Oggero, M., 2017. A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species. *Protein expression and purification* 132, 27-33.
- Avraham-Chakim, L., Elad, D., Zaretsky, U., Kloog, Y., Jaffa, A., Grisaru, D., 2013. Fluid-flow induced wall shear stress and epithelial ovarian cancer peritoneal spreading. *PloS one* 8, e60965.
- Azuaje-Hualde, E., García-Hernando, M., Etxebarria-Elezgarai, J., De Pancorbo, M.M., Benito-Lopez, F., Basabe-Desmots, L., 2017. Microtechnologies for cell microenvironment control and monitoring. *Micromachines* 8, 166.
- Bacabac, R.G., Smit, T.H., Cowin, S.C., Van Loon, J.J.W.A., Nieuwstadt, F.T.M., Heethaar, R., Klein-Nulend, J., 2005. Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers. *Journal of biomechanics* 38, 159-167.
- Ballesteros Hernando, J., Ramos Gómez, M., Díaz Lantada, A., 2019. Modeling Living Cells Within Microfluidic Systems Using Cellular Automata Models. *Scientific Reports* 9, 14886.
- Barbulovic-Nad, I., Au, S.H., Wheeler, A.R., 2010. A microfluidic platform for complete mammalian cell culture. *Lab on a Chip* 10, 1536-1542.
- Baselga, J., Perez, E.A., Pienkowski, T., Bell, R., 2006. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *The oncologist* 11 Suppl 1, 4-12.
- Batteux, F., Palmer, P., Daeron, M., Weill, B., Lebon, P., 1999. FCgammaRII (CD32)-dependent induction of interferon-alpha by serum from patients with lupus erythematosus. *European cytokine network* 10, 509-514.
- Beckman, R.A., Weiner, L.M., Davis, H.M., 2007. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* 109, 170-179.
- Beebe, D.J., Mensing, G.A., Walker, G.M., 2002. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering* 4, 261-286.
- Bhagat, A.A.S., Jothimuthu, P., Papautsky, I., 2007. Photodefinable polydimethylsiloxane (PDMS) for rapid lab-on-a-chip prototyping. *Lab on a Chip* 7, 1192-1197.
- Bhatia, S.N., Ingber, D.E., 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology* 32, 760-772.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- Bourguignon, N., Olmos, C.M., Sierra-Rodero, M., Peñaherrera, A., Rosero, G., Pineda, P., Vizuetete, K., Arroyo, C.R., Cumbal, L., Lasorsa, C., Perez, M.S., Lerner, B., 2018. Accessible and Cost-Effective Method of PDMS Microdevices Fabrication Using a Reusable Photopolymer Mold. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 56, 1433-1442.
- Brás, E.J.S., Chu, V., Aires-Barros, M.R., Conde, J.P., Fernandes, P., 2017. A microfluidic platform for physical entrapment of yeast cells with continuous production of invertase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92, 334-341.

Brody, J.P., Yager, P., Goldstein, R.E., Austin, R.H., 1996. Biotechnology at low Reynolds numbers. *Biophysical journal* 71, 3430-3441.

Brown, L., Koerner, T., Horton, J.H., Oleschuk, R.D., 2006. Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents. *Lab Chip* 6, 66-73.

Browne, S.M., Al-Rubeai, M., 2007. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol* 25, 425-432.

Bubendorfer, A., Liu, X., Ellis, A., 2007. Microfabrication of PDMS microchannels using SU-8/PMMA moldings and their sealing to polystyrene substrates. *Smart Materials and Structures* 16, 367.

Buggenthin, F., Marr, C., Schwarzfischer, M., Hoppe, P.S., Hilsenbeck, O., Schroeder, T., Theis, F.J., 2013. An automatic method for robust and fast cell detection in bright field images from high-throughput microscopy. *BMC Bioinformatics* 14, 297.

Burgi, M., Prieto, C., Oggero, M., Bollati-Fogolin, M., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., 2011. New reporter cell clones to determine the biological activity of human type I interferons. *BMC proceedings* 5 Suppl 8, P4.

Carter, P., 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6, 343-357.

Ceaglio, N., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., Oggero, M., 2008. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie* 90, 437-449.

Cooke, T., Reeves, J., Lanigan, A., Stanton, P., 2001. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 12 Suppl 1, S23-28.

Chen, C., Townsend, A.D., Hayter, E.A., Birk, H.M., Sell, S.A., Martin, R.S., 2018. Insert-based microfluidics for 3D cell culture with analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* 410, 3025-3035.

Chi, P.Y., Spuul, P., Tseng, F.G., Genot, E., Chou, C.F., Taloni, A., 2019. Cell Migration in Microfluidic Devices: Invadosomes Formation in Confined Environments. *Advances in experimental medicine and biology* 1146, 79-103.

Chin, C.D., Linder, V., Sia, S.K., 2006. Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab Chip* 7, 41-57.

Chin, C.L., Chin, H.K., Chin, C.S.H., Lai, E.T., Ng, S.K., 2015. Engineering selection stringency on expression vector for the production of recombinant human alpha1-antitrypsin using Chinese Hamster ovary cells. *BMC biotechnology* 15, 44.

Choy, E.H., 1998. Clinical pharmacology and therapeutic potential of monoclonal antibody treatment in rheumatoid arthritis. *Drugs & aging* 12, 139-148.

Christoffersson, J., Mandenius, C.-F., 2019. Using a Microfluidic Device for Culture and Drug Toxicity Testing of 3D Cells. In: Mandenius, C.-F., Ross, J.A. (Eds.), *Cell-Based Assays Using iPSCs for Drug Development and Testing*. Springer New York, New York, NY, pp. 235-241.

- DeMeester, S.L., Cobb, J.P., Hotchkiss, R.S., Osborne, D.F., Karl, I.E., Tinsley, K.W., Buchman, T.G., 1998. Stress-induced fractal rearrangement of the endothelial cell cytoskeleton causes apoptosis. *Surgery* 124, 362-371.
- Depetris, M., Casalis, P., Kratje, R., Etcheverrigaray, M., Oggero, M., 2008. A scFv antibody fragment as a therapeutic candidate to neutralize a broad diversity of human IFN- $\alpha$  subtypes. *Journal of immunological methods* 334, 104-113.
- Desai, S.P., Freeman, D.M., Voldman, J., 2009. Plastic masters-rigid templates for soft lithography. *Lab Chip* 9, 1631-1637.
- Dillman, R.O., 2001. The history and rationale for monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy. *Current pharmaceutical biotechnology* 2, 293-300.
- Dittrich, P.S., Tachikawa, K., Manz, A., 2006. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry* 78, 3887-3908.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., Alt, F.W., 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Advances in immunology* 86, 43-112.
- Duffy, D.C., McDonald, J.C., Schueller, O.J., Whitesides, G.M., 1998. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical chemistry* 70, 4974-4984.
- Eagle, H., 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501-514.
- Enck, K., Rajan, S.P., Aleman, J., Castagno, S., Long, E., Khalil, F., Hall, A.R., Opara, E.C., 2020. Design of an Adhesive Film-Based Microfluidic Device for Alginate Hydrogel-Based Cell Encapsulation. *Annals of Biomedical Engineering* 48, 1103-1111.
- Erickson, D., Li, D., 2004. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta* 507, 11-26.
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S.K., Kontoravdi, C., Weilguny, D., Andersen, M.R., 2015. Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering* 112, 521-535.
- Ferrero, S., Flores, M.D., Short, C., Vazquez, C.A., Clark, L.E., Ziegenbein, J., Zink, S., Fuentes, D., Payes, C., Batto, M.V., Collazo, M., García, C.C., Abraham, J., Cordo, S.M., Rodriguez, J.A., Helguera, G., 2021. Antibody-Based Inhibition of Pathogenic New World Hemorrhagic Fever Mammarenaviruses by Steric Occlusion of the Human Transferrin Receptor 1 Apical Domain. *Journal of virology* 95, e0186820.
- Florin, L., Pegel, A., Becker, E., Hausser, A., Olayioye, M.A., Kaufmann, H., 2009. Heterologous expression of the lipid transfer protein CERT increases therapeutic protein productivity of mammalian cells. *Journal of biotechnology* 141, 84-90.
- Frenzel, A., Hust, M., Schirrmann, T., 2013. Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in immunology* 4, 217.
- Friend, J., Yeo, L., 2010. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. *Biomicrofluidics* 4, 026502.

- Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M.E., 1985. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods* 77, 305-319.
- Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., Pages, J., Bussard, A., Goldberg, M., 1983. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the  $\beta$ 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase. *Journal of Immunological Methods* 60, 351-358.
- Gao, C.-Y., Guo, Y.-Y., He, J., Wu, M., Liu, Y., Chen, Z.-L., Cai, W.-S., Yang, Y.-L., Wang, C., Feng, X.-Z., 2012. L-3, 4-dihydroxyphenylalanine-collagen modified PDMS surface for controlled cell culture. *Journal of Materials Chemistry* 22, 10763-10770.
- Garza-García, L.D., Carrillo-Cocom, L.M., Araiz-Hernández, D., Soto-Vázquez, P., López-Meza, J., Tapia-Mejía, E.J., Camacho-León, S., García-López, E., Rodríguez-González, C.A., Alvarez, M.M., 2013. A biopharmaceutical plant on a chip: continuous micro-devices for the production of monoclonal antibodies. *Lab on a Chip* 13, 1243-1246.
- Garza-García, L.D., García-López, E., Camacho-León, S., del Refugio Rocha-Pizaña, M., López-Pacheco, F., López-Meza, J., Araiz-Hernández, D., Tapia-Mejía, E.J., Trujillo-de Santiago, G., Rodríguez-González, C.A., 2014. Continuous flow micro-bioreactors for the production of biopharmaceuticals: the effect of geometry, surface texture, and flow rate. *Lab on a Chip* 14, 1320-1329.
- Gilbert, A., McElearney, K., Kshirsagar, R., Sinacore, M.S., Ryll, T., 2013. Investigation of metabolic variability observed in extended fed batch cell culture. *Biotechnol Prog* 29, 1519-1527.
- Gómez-de-Mariscal, E., García-López-de-Haro, C., Ouyang, W., Donati, L., Lundberg, E., Unser, M., Muñoz-Barrutia, A., Sage, D., 2021. DeepImageJ: A user-friendly environment to run deep learning models in ImageJ. *Nature methods* 18, 1192-1195.
- Group\*, O.M.T.S., 1985. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *New England Journal of Medicine* 313, 337-342.
- Gutman, G.E., Lavarello, P.J., 2011. FORMAS DE ORGANIZACIÓN DE LAS EMPRESAS BIOTECNOLÓGICAS EN EL SECTOR FARMACÉUTICO ARGENTINO. *Desarrollo Económico* 51, 81-105.
- Gutterman, J.U., 1994. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 1198-1205.
- Haeberle, S., Zengerle, R., 2007. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* 7, 1094-1110.
- Haswell, S.J., Middleton, R.J., O'Sullivan, B., Skelton, V., Watts, P., Styring, P., 2001. The application of micro reactors to synthetic chemistry. *Chemical Communications*, 391-398.
- He, Z., Sun, X., Mei, G., Yu, S., Li, N., 2008. Nonclassical secretion of human catalase on the surface of CHO cells is more efficient than classical secretion. *Cell biology international* 32, 367-373.

Helguera, G., Daniels, T.R., Rodríguez, J.A., Penichet, M.L., 2010. Monoclonal antibodies, human, engineered. In: Flickinger, M.C. (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 3526-3542.

Helguera, G., Jemielity, S., Abraham, J., Cordo, S.M., Martinez, M.G., Rodríguez, J.A., Bregni, C., Wang, J.J., Farzan, M., Penichet, M.L., Candurra, N.A., Choe, H., 2012. An antibody recognizing the apical domain of human transferrin receptor 1 efficiently inhibits the entry of all new world hemorrhagic Fever arenaviruses. *Journal of virology* 86, 4024-4028.

Helguera, G., Penichet, M.L., 2005. Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer. *Adoptive Immunotherapy: Methods and Protocols*. Springer, pp. 347-373.

Hilal-Alnaqbi, A., Hu, A.Y., Zhang, Z., Al-Rubeai, M., 2013. Growth, metabolic activity, and productivity of immobilized and freely suspended CHO cells in perfusion culture. *Biotechnology and applied biochemistry* 60, 436-445.

Hisey, C.L., Mitxelena-Iribarren, O., Martínez-Calderón, M., Gordon, J.B., Olaizola, S.M., Benavente-Babace, A., Mujika, M., Arana, S., Hansford, D.J., 2019. A versatile cancer cell trapping and 1D migration assay in a microfluidic device. *Biomicrofluidics* 13, 044105.

Hitoshi, N., Ken-ichi, Y., Jun-ichi, M., 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.

Ho, C.M., Ng, S.H., Li, K.H., Yoon, Y.J., 2015. 3D printed microfluidics for biological applications. *Lab on a chip* 15, 3627-3637.

Hodneland, E., Kögel, T., Frei, D.M., Gerdes, H.-H., Lundervold, A., 2013. CellSegm - a MATLAB toolbox for high-throughput 3D cell segmentation. *Source Code for Biology and Medicine* 8, 16.

Holliger, P., Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology* 23, 1126-1136.

Hovenden, M., Hubbard, M.A., AuCoin, D.P., Thorkildson, P., Reed, D.E., Welch, W.H., Lyons, C.R., Lovchik, J.A., Kozel, T.R., 2013. IgG subclass and heavy chain domains contribute to binding and protection by mAbs to the poly  $\gamma$ -D-glutamic acid capsular antigen of *Bacillus anthracis*. *PLoS pathogens* 9, e1003306.

<http://www.klayout.de/index.php>, K., High Performance Layout Viewer and Editor.

Hu, S., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L.E., Wong, J.Y., Shively, J.E., Wu, A.M., 1996. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer research* 56, 3055-3061.

Huang, M., Fan, S., Xing, W., Liu, C., 2010. Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics. *Mathematical and Computer Modelling* 52, 2036-2042.

Huang, S., Ingber, D.E., 1999. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nature cell biology* 1, E131-138.

Huber, D., Oskooei, A., Casadevall i Solvas, X., deMello, A., Kaigala, G.V., 2018. Hydrodynamics in Cell Studies. *Chemical Reviews* 118, 2042-2079.

Hudson, P.J., Kortt, A.A., 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of immunological methods* 231, 177-189.

Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., et al., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5879-5883.

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. *Biotechnology and bioengineering* 111, 504-517.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Schlomchick, M., 2005. The generation of lymphocyte antigen receptors. In: Lawrwnce, E. (Ed.), *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing, New York, pp. 135-164.

Jang, M., Kwon, Y.J., Lee, N.Y., 2015. Non-photolithographic plastic-mold-based fabrication of cylindrical and multi-tiered poly (dimethylsiloxane) microchannels for biomimetic lab-on-a-chip applications. *RSC Advances* 5, 100905-100911.

Jayapal, K.P., Wlaschin, K.F., Hu, W., Yap, M.G.S., 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical engineering progress* 103, 40.

Jensen, K.F., 2011. Silicon-Based Microchemical Systems: Characteristics and Applications. *MRS Bulletin* 31, 101-107.

Jeon, H., Koo, S., Reese, W.M., Loskill, P., Grigoropoulos, C.P., Healy, K.E., 2015. Directing cell migration and organization via nanocrater-patterned cell-repellent interfaces. *Nature materials* 14, 918-923.

Jo, B., Lerberghe, L.M.V., Motsegood, K.M., Beebe, D.J., 2000. Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *Journal of Microelectromechanical Systems* 9, 76-81.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G., 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.

Jung, E.H., Sarpatwari, A., 2020. FDA and EMA Biosimilar Approvals. 35, 1908-1910.

Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., Kuni-Kamochi, R., Nakano, R., Yano, K., Kakita, S., 2007. Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* 17, 104-118.

Karadimitriou, N.K., Hassanizadeh, S.M., 2012. A Review of Micromodels and Their Use in Two-Phase Flow Studies. *Vadose Zone Journal* 11, vzt2011.0072.

Khan, S.U., Schröder, M., 2008. Engineering of chaperone systems and of the unfolded protein response. *Cytotechnology* 57, 207-231.

Khazaeli, M.B., Conry, R.M., LoBuglio, A.F., 1994. Human immune response to monoclonal antibodies. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology: official journal of the Society for Biological Therapy* 15, 42-52.

Kim, J.Y., Kim, Y.-G., Lee, G.M., 2012. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 917-930.

Kim, L., Toh, Y.C., Voldman, J., Yu, H., 2007. A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab on a chip* 7, 681-694.

Kim, S., Sojoudi, H., Zhao, H., Mariappan, D., McKinley, G.H., Gleason, K.K., Hart, A.J., 2016. Ultrathin high-resolution flexographic printing using nanoporous stamps. *Science Advances* 2, e1601660.

Kim, S.J., Park, Y., Hong, H.J., 2005. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Molecules and cells* 20, 17-29.

Kirou, K.A., Gkrouzman, E., 2013. Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clinical immunology* 148, 303-312.

Knappskog, S., Ravneberg, H., Gjerdrum, C., Tröbø, C., Stern, B., Pryme, I.F., 2007. The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide. *Journal of biotechnology* 128, 705-715.

Ko, H.C., Gelb, B.D., 2014. Concise review: drug discovery in the age of the induced pluripotent stem cell. *Stem cells translational medicine* 3, 500-509.

Kober, L., Zehe, C., Bode, J., 2013. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines. *Biotechnology and bioengineering* 110, 1164-1173.

Koch, M., Evans, A., Brunnschweiler, A., 2000. *Microfluidic technology and applications*. Research Studies Press Ltd., Baldock, England.

Kodak, 2017a. KODAK\_DITR\_Film [http://www.ratcliffe-sa.com.ar/documentos/Kodak\\_Peliculas\\_DITR.pdf](http://www.ratcliffe-sa.com.ar/documentos/Kodak_Peliculas_DITR.pdf)

Kodak, F.N., 2017b. [https://www.kodak.com/uploadedFiles/Flexcel\\_NXC\\_Plates\\_brochure.pdf](https://www.kodak.com/uploadedFiles/Flexcel_NXC_Plates_brochure.pdf)

Kohler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Komen, J., Westerbeek, E.Y., Kolkman, R.W., Roesthuis, J., Lievens, C., van den Berg, A., van der Meer, A.D., 2020. Controlled pharmacokinetic anti-cancer drug concentration profiles lead to growth inhibition of colorectal cancer cells in a microfluidic device. *Lab on a chip* 20, 3167-3178.

Kontsek, P., 1994. Human type I interferons: structure and function. *Acta virologica* 38, 345-360.

Kshirsagar, R., McElearney, K., Gilbert, A., Sinacore, M., Ryll, T., 2012. Controlling trisulfide modification in recombinant monoclonal antibody produced in fed-batch cell culture. *Biotechnol Bioeng* 109, 2523-2532.

Kunert, R., Reinhart, D., 2016. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 3451-3461.



- Kuo, T.T., Aveson, V.G., 2011. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *MAbs* 3, 422-430.
- Ladner, T., Grünberger, A., Probst, C., Kohlheyer, D., Büchs, J., Delvigne, F., 2017. Application of mini-and micro-bioreactors for microbial bioprocesses. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 433-461.
- Lars Rene, L., Jan, S., Torben, P.R., 2003. UV-assisted rotational molding of microstructures using a conventional flexographic printing machine. *Proc.SPIE*.
- Lasorsa, C., Morando, P.J., Rodrigo, A., 2005. Effects of the plasma oxygen concentration on the formation of SiOx/Cy films by low temperature PECVD. *Surface and Coatings Technology* 194, 42-47.
- Lecault, V., White, A.K., Singhal, A., Hansen, C.L., 2012. Microfluidic single cell analysis: from promise to practice. *Current opinion in chemical biology* 16, 381-390.
- Leclerc, E., Sakai, Y., Fujii, T., 2003. Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomedical Microdevices* 5, 109-114.
- Lee, J.E., Fusco, M.L., Saphire, E.O., 2009. An efficient platform for screening expression and crystallization of glycoproteins produced in human cells. *Nature protocols* 4, 592-604.
- Lee, P., Gaige, T., Hung, P., 2011. Microfluidic systems for live cell imaging. *Methods in cell biology*. Elsevier, pp. 77-103.
- Lee, S.W., Hong, S., Jung, B., Jeong, S.Y., Byeon, Jae H., Jeong, G.S., Choi, J., Hwang, C., 2019. In vitro lung cancer multicellular tumor spheroid formation using a microfluidic device. *Biotechnology and Bioengineering* 116, 3041-3052.
- Leget, G.A., Czuczman, M.S., 1998. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Current opinion in oncology* 10, 548-551.
- Lerner, B., Kler, P.A., Ordoñez Arias, A.F., Perez, M.S., Lasorsa, C., Berli, C.L.A., 2013. A circular microchannel with integrated electrodes for DNA electrophoresis. *Microsystem Technologies* 19, 733-742.
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A.Y., Kiss, R., Amanullah, A., 2010. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs* 2, 466-479.
- Lion, N., Reymond, F., Girault, H.H., Rossier, J.S., 2004. Why the move to microfluidics for protein analysis? *Current opinion in biotechnology* 15, 31-37.
- Liu, B., Spearman, M., Doering, J., Lattová, E., Perreault, H., Butler, M., 2014. The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology* 170, 17-27.
- Liu, M.C., Tai, Y.C., 2011. A 3-D microfluidic combinatorial cell array. *Biomed Microdevices* 13, 191-201.
- Lubeck, M.D., Kimoto, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H., 1988. Killing of human tumor cell lines by human monocytes and murine monoclonal antibodies. *Cellular immunology* 111, 107-117.

- Mäki, A.J., Peltokangas, M., Kreutzer, J., Auvinen, S., Kallio, P., 2015. Modeling carbon dioxide transport in PDMS-based microfluidic cell culture devices. *Chemical Engineering Science* 137, 515-524.
- Mastrangeli, M., Millet, S., Orchid Partners, T., Van den Eijnden-van Raaij, J., 2019. Organ-on-chip in development: Towards a roadmap for organs-on-chip. *Altex* 36, 650-668.
- McCafferty, J., Fitzgerald, K.J., Earnshaw, J., Chiswell, D.J., Link, J., Smith, R., Kenten, J., 1994. Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 47, 157-173.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McDonald, J.C., Duffy, D.C., Anderson, J.R., Chiu, D.T., Wu, H., Schueller, O.J., Whitesides, G.M., 2000. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21, 27-40.
- Menon, N.V., Chuah, Y.J., Phey, S., Zhang, Y., Wu, Y., Chan, V., Kang, Y., 2015. Microfluidic assay to study the combinatorial impact of substrate properties on mesenchymal stem cell migration. *ACS applied materials & interfaces* 7, 17095-17103.
- Metallo, C.M., Vander Heiden, M.G., 2013. Understanding metabolic regulation and its influence on cell physiology. *Molecular cell* 49, 388-398.
- Mogensen, K.E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G., Uzé, G., 1999. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 19, 1069-1098.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., Oi, V.T., 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 6851-6855.
- Mousavi Shaegh, S.A., Nguyen, N.-T., Wereley, S., 2019. *Fundamentals and Applications of Microfluidics*. Artech House.
- Mozdzierz, N.J., Love, K.R., Lee, K.S., Lee, H.L.T., Shah, K.A., Ram, R.J., Love, J.C., 2015. A perfusion-capable microfluidic bioreactor for assessing microbial heterologous protein production. *Lab on a Chip* 15, 2918-2922.
- Nederman, T., Karlstrom, E., Sjodin, L., 1990. An in vitro bioassay for quantitation of human interferons by measurements of antiproliferative activity on a continuous human lymphoma cell line. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 18, 29-34.
- Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., Gilliet, M., 2005. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *The Journal of experimental medicine* 202, 135-143.
- Niewold, T.B., Hua, J., Lehman, T.J.A., Harley, J.B., Crow, M.K., 2007. High serum IFN- $\alpha$  activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes & Immunity* 8, 492-502.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2007. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Current opinion in immunology* 19, 239-245.

- Nolan, R.P., Lee, K., 2011. Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering* 13, 108-124.
- Novaković, D., Dedijer, S., Poljaček, S.M., 2010. A model for improving the flexographic printing plate making process. *Tehnicki Vjesnik* 17, 403-410.
- Olmos Carreño, C., Rosero, G., Peñaherrera, A., Vaca, A.V., 2020. Cost-effective fabrication of photopolymer molds with multi-level microstructures for PDMS microfluidic device manufacture. *RSC Advances* 10, 4071.
- Olmos, C.M., Vaca, A., Rosero, G., Peñaherrera, A., Perez, C., de Sá Carneiro, I., Vizúete, K., Arroyo, C.R., Debut, A., Pérez, M.S., Cumbal, L., Lerner, B., 2019. Epoxy resin mold and PDMS microfluidic devices through photopolymer flexographic printing plate. *Sensors and Actuators B: Chemical* 288, 742-748.
- Ortiz-Sánchez, E., Helguera, G., Daniels, T.R., Penichet, M.L., 2008. Antibody–cytokine fusion proteins: applications in cancer therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* 8, 609-632.
- Paguirigan, A.L., Beebe, D.J., 2009. From the cellular perspective: exploring differences in the cellular baseline in macroscale and microfluidic cultures. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 1, 182-195.
- Paillusson, A., Hirschi, N., Vallan, C., Azzalin, C.M., Muhlemann, O., 2005. A GFP-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay. *Nucleic acids research* 33, e54.
- Payés, C., Daniels-Wells, T., Maffia, P., Penichet, M., Morrison, S., Helguera, G., 2015. Genetic Engineering of Antibody Molecules. In: *Sons, J.W. (Ed.), Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, pp. 1–52.
- Peng, R.W., Abellan, E., Fussenegger, M., 2011. Differential effect of exocytic SNAREs on the production of recombinant proteins in mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering* 108, 611-620.
- Peng, R.W., Fussenegger, M., 2009. Molecular engineering of exocytic vesicle traffic enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering* 102, 1170-1181.
- Penichet, M.L., Morrison, S.L., 2004. Design and engineering human forms of monoclonal antibodies. *Drug Development Research* 61, 121-136.
- Peñaherrera, A., Payés, C., Sierra-Rodero, M., Vega, M., Rosero, G., Lerner, B., Helguera, G., Pérez, M.S., 2016. Evaluation of cell culture in microfluidic chips for application in monoclonal antibody production. *Microelectronic Engineering* 158, 126-129.
- Pereira, S., Kildegaard, H.F., Andersen, M.R., 2018. Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnology Journal* 13, 1700499.
- Perisic, O., Webb, P.A., Holliger, P., Winter, G., Williams, R.L., 1994. Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment. *Structure* 2, 1217-1226.
- Pethig, R.R., Smith, S., 2012. *Introductory Bioelectronics: For Engineers and Physical Scientists*. John Wiley & Sons.

Power, B.E., Caine, J.M., Burns, J.E., Shapira, D.R., Hattarki, M.K., Tahtis, K., Lee, F.T., Smyth, F.E., Scott, A.M., Kortt, A.A., Hudson, P.J., 2001. Construction, expression and characterisation of a single-chain diabody derived from a humanised anti-Lewis Y cancer targeting antibody using a heat-inducible bacterial secretion vector. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 50, 241-250.

Presta, L., 2003. Antibody engineering for therapeutics. *Current opinion in structural biology* 13, 519-525.

Pritsch, O., Magnac, C., Dumas, G., Bouvet, J.P., Alzari, P., Dighiero, G., 2000. Can isotype switch modulate antigen-binding affinity and influence clonal selection? *European journal of immunology* 30, 3387-3395.

Radaev, S., Sun, P.D., 2001. Recognition of IgG by Fc $\gamma$  receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 276, 16478-16483.

Rahman, S.M., Campbell, J.M., Coates, R.N., Render, K.M., Byrne, C.E., Martin, E.C., Melvin, A.T., 2020. Evaluation of intercellular communication between breast cancer cells and adipose-derived stem cells via passive diffusion in a two-layer microfluidic device. *Lab on a chip* 20, 2009-2019.

Rajewsky, K., Forster, I., Cumano, A., 1987. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238, 1088-1094.

Reilly, R.M., Sandhu, J., Alvarez-Diez, T.M., Gallinger, S., Kirsh, J., Stern, H., 1995. Problems of delivery of monoclonal antibodies. *Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. Clinical pharmacokinetics* 28, 126-142.

Robert, P., Hotchko, M., 2013. Clinical use of plasma products. MRB Marketing Research Bureau. <http://marketingresearchbureau.com/plasma-industry/clinical-uses-of-plasma-products>.

Roberts, R.M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D., Bixby, J., 1998. The Evolution of the Type I Interferons. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 18, 805-816.

Ronald, G., 1970. *Mecánica de los Fluidos e Hidráulica*.

Ruiz, A., Joshi, P., Mastrangelo, R., Francolini, M., Verderio, C., Matteoli, M., 2014. Testing A $\beta$  toxicity on primary CNS cultures using drug-screening microfluidic chips. *Lab on a chip* 14, 2860-2866.

Saggiomo, V., Velders, A.H., 2015. Microfluidic Devices: Simple 3D Printed Scaffold-Removal Method for the Fabrication of Intricate Microfluidic Devices (*Adv. Sci.* 9/2015). *Advanced Science* 2.

Samavedi, S., Whittington, A.R., Goldstein, A.S., 2013. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta biomaterialia* 9, 8037-8045.

Sautter, K., Enenkel, B., 2005. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity. *Biotechnology and bioengineering* 89, 530-538.

Scott, C., 2012. *BioProcess Int* <https://bioprocessintl.com/downstream-processing/separation-purification/toward-nonantibody-platforms-337117/>.

- Schaedel, O., Reiter, Y., 2006. Antibodies and their fragments as anti-cancer agents. *Current pharmaceutical design* 12, 363-378.
- Schellekens, H., Lietzan, E., Faccin, F., Venema, J., 2015. Biosimilar monoclonal antibodies: the scientific basis for extrapolation. *Expert opinion on biological therapy* 15, 1633-1646.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676-682.
- Schmidt, S.K., Schmid, R., Arkudas, A., Kengelbach-Weigand, A., Bosserhoff, A.K., 2019. Tumor Cells Develop Defined Cellular Phenotypes After 3D-Bioprinting in Different Bioinks. *Cells* 8, 1295.
- Seo, J.S., Min, B.S., Kim, Y.J., Cho, J.M., Baek, E., Cho, M.S., Lee, G.M., 2014. Effect of glucose feeding on the glycosylation quality of antibody produced by a human cell line, F2N78, in fed-batch culture. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 3509-3515.
- Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M., 2006. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA: a cancer journal for clinicians* 56, 226-243.
- Shemesh, J., Jalilian, I., Shi, A., Yeoh, G.H., Tate, M.L.K., Warkiani, M.E., 2015. Flow-induced stress on adherent cells in microfluidic devices. *Lab on a chip* 15, 4114-4127.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al., 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, I.E., 2001. Efficacy and safety of Herceptin in women with metastatic breast cancer: results from pivotal clinical studies. *Anti-cancer drugs* 12 Suppl 4, S3-10.
- Smith, M.R., 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22, 7359-7368.
- Stevens, F.J., 1987. Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody. *Molecular immunology* 24 10, 1055-1060.
- Su, X., Theberge, A.B., January, C.T., Beebe, D.J., 2013. Effect of microculture on cell metabolism and biochemistry: do cells get stressed in microchannels? *Anal Chem* 85, 1562-1570.
- Tabeling, P., 2005. *Introduction to microfluidics*. Oxford University Press, USA.
- Thorsen, T., Maerkl, S.J., Quake, S.R., 2002. Microfluidic large-scale integration. *Science* 298, 580.
- Timm, A.C., Shankles, P.G., Foster, C.M., Doktycz, M.J., Retterer, S.T., 2015. Characterization of extended channel bioreactors for continuous-flow protein production. *Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics: Materials, Processing, Measurement, and Phenomena* 33, 06FM02.

- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Torres, M., Fernaández-Fuentes, N., Fiser, A., Casadevall, A., 2007. The immunoglobulin heavy chain constant region affects kinetic and thermodynamic parameters of antibody variable region interactions with antigen. *Journal of Biological Chemistry* 282, 13917-13927.
- van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., Hellebrekers, L., Hyllner, J., Jonker, F.H., Prieto, P., Thalen, M., Baumans, V., 2004. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 18, 1-12.
- Visone, R., Ugolini, G.S., Vinarsky, V., Penati, M., Redaelli, A., Forte, G., Rasponi, M., 2019. A Simple Vacuum-Based Microfluidic Technique to Establish High-Throughput Organs-On-Chip and 3D Cell Cultures at the Microscale. *Advanced Materials Technologies* 4, 1800319.
- Vogelius, E., 2019. Argentina. In: Kingham, R. (Ed.), *The Life Sciences*. Law Review London, United Kingdom, pp. 6-19.
- Wacker, C., Berger, C.N., Girard, P., Meier, R., 2011. Glycosylation profiles of therapeutic antibody pharmaceuticals. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 79, 503-507.
- Waldmann, T.A., 1991. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 252, 1657.
- Walsh, G., 2014. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature biotechnology* 32, 992-1000.
- Walt, D.R., 2005. Miniature analytical methods for medical diagnostics. *Science* 308, 217.
- Wang, X., Katayama, A., Wang, Y., Yu, L., Favoino, E., Sakakura, K., Favole, A., Tsuchikawa, T., Silver, S., Watkins, S.C., Kageshita, T., Ferrone, S., 2011. Functional Characterization of an scFv-Fc Antibody that Immunotherapeutically Targets the Common Cancer Cell Surface Proteoglycan CSPG4. *Cancer Research* 71, 7410-7422.
- Wang, X., Phan, D.T.T., Zhao, D., George, S.C., Hughes, C.C.W., Lee, A.P., 2016. An on-chip microfluidic pressure regulator that facilitates reproducible loading of cells and hydrogels into microphysiological system platforms. *Lab Chip* 16, 868-876.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical microbiology and immunology* 198, 157-174.
- Westwood, A.D., Rowe, D.A., Clarke, H.R.G., 2010. Improved recombinant protein yield using a codon deoptimized DHFR selectable marker in a CHEF1 expression plasmid. *Biotechnology progress* 26, 1558-1566.
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368-373.
- Winter, G., 1998. Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering. *FEBS Letters* 430, 92-94.
- Winter, G., Milstein, C., 1991. Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-299.

- Wu, A.M., Senter, P.D., 2005. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature biotechnology* 23, 1137-1146.
- Xu, X., Li, S., Zhang, H., Shen, Y., Zakeeruddin, S.M., Graetzel, M., Cheng, Y.-B., Wang, M., 2015. A power pack based on organometallic perovskite solar cell and supercapacitor. *ACS nano* 9, 1782-1787.
- Xu, Z., Gao, Y., Hao, Y., Li, E., Wang, Y., Zhang, J., Wang, W., Gao, Z., Wang, Q., 2013. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials* 34, 4109-4117.
- Yang, F., Carmona, A., Stojkova, K., Garcia Huitron, E.I., Goddi, A., Bhushan, A., Cohen, R.N., Brey, E.M., 2021. A 3D human adipose tissue model within a microfluidic device. *Lab on a chip* 21, 435-446.
- Yoo, E.M., Chintalacheruvu, K.R., Penichet, M.L., Morrison, S.L., 2002. Myeloma expression systems. *J Immunol Methods* 261, 1-20.
- Young, E.W.K., Beebe, D.J., 2010. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chemical Society Reviews* 39, 1036-1048.
- Young, J.D., 2013. Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Biotechnology* 24, 1108-1115.
- Young, M.E., Carroad, P.A., Bell, R.L., 1980. Estimation of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnology and bioengineering* 22, 947-955.
- Young, R., Rance, J., 2012. Mammalian expression vector with a highly efficient secretory signal sequence. Google Patents.
- Yu, B., Wages, J.M., Larrick, J.W., 2014. Antibody-membrane switch (AMS) technology for facile cell line development. *Protein Engineering, Design and Selection* 27, 309-315.
- Zhang, L., Jackson, C.B., Mou, H., Ojha, A., Peng, H., Quinlan, B.D., Rangarajan, E.S., Pan, A., Vanderheiden, A., Suthar, M.S., Li, W., IZard, T., Rader, C., Farzan, M., Choe, H., 2020. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat Commun* 11, 6013-6013.
- Zhou, M., Crawford, Y., Ng, D., Tung, J., Pynn, A.F.J., Meier, A., Yuk, I.H., Vijayasankaran, N., Leach, K., Joly, J., 2011. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of biotechnology* 153, 27-34.
- Zhu, B., Lu, Q., Yin, J., Hu, J., Wang, Z., 2004. Effects of laser-modified polystyrene substrate on CHO cell growth and alignment. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 70, 43-48.
- Zhu, J., 2012. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances* 30, 1158-1170.

Zhu, X., Bouffanais, R., Yue, D.K.P., 2015. Interplay between motility and cell-substratum adhesion in amoeboid cells. *Biomicrofluidics* 9, 054112-054112.

Ziolkowska, K., Jedrych, E., Kwapiszewski, R., Lopacinska, J., Skolimowski, M., Chudy, M., 2010. PDMS/glass microfluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage. *Sensors and Actuators B: Chemical* 145, 533-542.

Ziółkowska, K., Kwapiszewski, R., Brzozka, Z., 2011. Microfluidic devices as tools for mimicking the in vivo environment. *New Journal of Chemistry* 35, 979-990.



# Anexos

---

## Anexo I: Repique de líneas celulares adherentes

### Materiales y reactivos:

1. Medio DMEM completo, con 2mM L-Alanil-L-glutamina, alta glucosa 4500mg/L, 110 mg/L piruvato de sodio (Transgen Biotech Cat# F1101-01), Antibiótico/Antimicótico y 10% SFB
2. Suero bobino fetal (SBF)
3. Buffer fosfato salino (PBS)
4. Incubadora de cultivo gasificada con CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C
5. Microscopio invertido con objetivos 10X y 20X
6. Tubos cónicos Falcon de 15 ml
7. Pipetas serológicas (5 y 10 ml)
8. Campana de bioseguridad
9. Tripsina 0,25% (p/v) 0,53 mM EDTA
10. Recipiente para Descartes
11. Pipeta Automática P1000
12. Pipeta Automática P200
13. Centrífuga de mesada con adaptadores para tubos cónicos de 15 ml
14. Botellas de poliestireno T-25, T-75 cm<sup>2</sup>
15. Microfibra indeleble

### Protocolo:

1. Retirar asépticamente el medio de cultivo consumido de la botella.
2. Agregar el volumen apropiado de PBS estéril del lado de la botella sin células adheridas para evitar despegarlas (nota 1 y 2).
3. Enjuagar las células con PBS (con un movimiento de balanceo suave) y desecharlo.
4. Agregar a la botella el volumen apropiado de solución de tripsina-EDTA (nota 3).
5. Incubar la botella a 37°C hasta que las células se redondeen. Observar las células bajo un microscopio invertido. Las células despegadas deben deslizarse por la superficie de la botella. Esto generalmente ocurre después de 3 a 5 min de incubación (nota 4).
6. Neutralizar la suspensión de tripsina-EDTA / células agregando un volumen igual al del punto 4 de medio completo a la botella. Disgregar las células pipeteando suavemente (nota 5).
7. Transferir toda la suspensión celular al tubo cónico Falcon de 15ml. Hacer un lavado a la botella con PBS y transferirlo al tubo Falcon (nota 2).
8. Centrifugar el tubo cónico Falcon a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Retirar el Falcon de la centrifuga y descartar el sobrenadante.
10. Resuspender cuidadosamente las células en 1 ml de medio DMEM completo. Disgregar las células pipeteando suavemente (nota 6).
11. Agregar el volumen apropiado de medio completo fresco a la botella (nota 7) y transferir un quinto (1/5) de la suspensión celular (200 µl) a la botella.
12. Dejar las células en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Notas:

1. Las células se repican cuando están en un 85-90% de confluencia.
2. Volúmenes de PBS:  
Para una botella T-25: 1 a 5 ml  
Para una botella T-75: 2 a 10 ml
3. Volúmenes de Tripsina:  
Para una botella T-25: 1 ml  
Para una botella T-75: 2 ml
4. No dejar tripsina-EDTA en las células por más tiempo del necesario, ya que pueden producirse aglomerados de células.
5. Pipetar la suspensión celular hacia arriba y hacia abajo con la punta de la pipeta apoyada en la esquina o borde inferior de la botella hasta obtener una suspensión celular homogénea.
6. Se debe evitar la formación de espuma.
7. Volúmenes de Medio de cultivo:  
Para una botella T-25: 5 a 10 ml  
Para una botella T-75: 10 a 20 ml

## **Anexo II: Descongelado de línea celular HEK-293T o similar**

### Materiales y reactivos:

1. Medio DMEM completo, con 2mM L-Alanil-L-glutamina, alta glucosa 4500mg/L, 110 mg/L piruvato de sodio (Transgen Biotech Cat# F1101-01), Antibiótico/Antimicótico y 10% SFB
2. Suero fetal bovino (SFB)
3. Baño termostático húmedo a 37°C
4. Incubadora de cultivo gasificada con CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C
5. Microscopio invertido con objetivos 10X y 20X
6. Tubos cónicos Falcon de 15 ml
7. Pipetas serológicas (5 y 10 ml)
8. Campana de bioseguridad
9. Recipiente con hielo granizado
10. Microfibra indeleble
11. Pipeta Automática P1000
12. Pipeta Automática P200
13. Centrífuga de mesada con adaptadores para tubos cónicos de 15 ml
14. Placa de cultivo P6 o botella T25

### Protocolo:

13. Retirar del tanque de nitrógeno líquido usando gafas de seguridad y criogantes el criovial con la línea celular que se utilizará y transportarlo en hielo (nota 1).
14. Transferir inmediatamente el criovial al baño de agua a 37°C.
15. Mientras las células se descongelan, colocar 6 ml de medio DMEM completo en un tubo Falcon de 15 ml y agregar 1 ml de SFB (nota 2).
16. Sin descongelar completamente las células, agregar 500 µl de DMEM con SFB al criovial, mezclar con la suspensión celular y transferir todo al tubo cónico Falcon de 15ml (nota 3 y 4).
17. Centrifugar el tubo cónico Falcon a 1000-1200 rpm durante 5 minutos o a 800 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
18. Preparar una botella T25 (o una placa P6) que contenga 5 ml de DMEM completo, agregarle 1ml de SFB (20% SFB final) y rotular la botella.
19. Retirar el Falcon de la centrifuga y descartar el sobrenadante.
20. Resuspender cuidadosamente las células en 1 ml de medio DMEM completo y transferirlo a la botella (nota 5).
21. Dejar las células en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
22. Revisar las células diariamente, para ver cuándo el medio comienza a volverse ácido (nota 6).
23. Aumentar la escala de una T25 a dos T75 que contengan un volumen total de 10 ml de medio completo DMEM.

### Notas:

1. Sostener el criovial siempre de la tapa

2. El SFB actúa como protector de las células del DMSO que está en el medio de congelación.
3. Preparar previamente un tubo cónico Falcon de 15ml de equilibrio con 8ml
4. Etanolizar el criovial al introducirlo en la campana
5. Si se usan botellas con tapa ventilada cerrar la tapa firmemente, si la tapa no es ventilada, asegurarse que la tapa esté floja para permitir el intercambio de CO<sub>2</sub> en la incubadora
13. No es necesario usar un medidor de pH. El medio es un indicador de pH y el color debe ser rojo a este pH (no rosado o amarillo).

## Anexo III: Congelación de líneas celulares

### Materiales y reactivos:

1. Medio DMEM con L-glutamina, AntibióticoAntimicótico, 30% SBF
2. Suero bobino fetal (SBF)
3. DMSO Grado de cultivo
4. Incubadora de cultivo humidificada con CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C
5. Microscopio invertido
6. Tubos falcon de 15 ml esteriles
7. Hemocitómetro
8. Pipetas serológicas 5 o 10 ml
9. Campana de bioseguridad
10. Crioviales
11. Gradilla de crioviales
12. Freezer -80°C
13. Tanque de nitrógeno líquido
14. Hielo
15. Centrífuga
16. Microfibra
17. Recipiente para Descartes
18. Pipeta Automática P1000
19. Pipeta Automática P200
20. Misterfrosty

### Protocolo

24. Observar las células con un microscopio invertido.
25. Levantar las células y contarlas con un hemocitómetro (nota 1).
26. Si las células están en un rango de densidad normal, centrifugar en un tubo falcon de 15 ml estéril a 1000 rpm durante 5 minutos o a 800 rpm durante 10 minutos.
27. Mientras las células se centrifugan, rotular los crioviales con la información adecuada y colocarlos en la gradilla (nota 2).
28. En una campana de bioseguridad, descartar el sobrenadante.
29. Resuspender las células en la cantidad apropiada de Medio de cultivo para obtener la densidad necesaria (nota 3).
30. Transferir 900 µl de la suspensión celular a cada criovial.
31. Agregar 100 µl de DMSO a cada criovial (hacer 5 agitaciones con la pipeta) y ponerlo rápidamente en hielo hasta que pueda congelarse (nota 4 y 5).
32. Tan rápido como sea posible, transferir los crioviales a un Misterfrosty y este al freezer a -80°C. Dejar reposar toda la noche (nota 6 y 7).
33. Después de 24 horas, los crioviales pueden transferirse al tanque de nitrógeno líquido. Tome nota de la ubicación en el libro de registro del tanque de LN<sub>2</sub>.
34. Después de al menos un día, descongelar un vial de células congeladas para verificar la viabilidad.

### Notas:

1. El 90% de las células deben ser viables. Menor porcentaje, las células pueden no ser capaces de recuperarse del proceso de congelación.
2. Etiqueta:  
Línea celular  
Fecha congelado  
Número de células  
Numero de vial  
Operador  
Numero de repique  
Medio de cultivo
3. Las células deben tener una densidad entre  $10^6$  y  $7 \times 10^6$  células/ml.
4. No agregar DMSO directamente al SBF ya que puede producirse un precipitado.
5. Las células deben permanecer en hielo por el menor tiempo posible.
6. Las células nunca deben almacenarse a  $-20^\circ\text{C}$  durante ningún período de tiempo. No transferir células directamente al tanque de  $\text{LN}_2$ , ya que esto será un cambio de temperatura demasiado grande y la viabilidad será baja, o la diferencia en la temperatura hará que las tapas se salgan y la línea tendrá que ser descartada.
7. La viabilidad celular disminuye de 1-10% por mes si las células se mantienen a  $-80^\circ\text{C}$ .