

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTÍN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA
“Prof. Jorge A. Sabato”**

Desarrollo y fabricación de un filtro microestructurado para células tumorales circulantes^(*)

por Lucca Piancatelli

Directores del Trabajo

**Dr. Paolo N. Catalano
Ing. Claudio Ferrari**

^(*) Trabajo de Seminario – Ingeniería en Materiales

República Argentina

2023

CONTENIDO

RESUMEN	3
Resumen en español	3
Resumen en inglés (<i>abstract</i>)	4
GLOSARIO DE SIGLAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Contexto	6
1.2. Antecedentes	7
1.3. Objetivos del presente trabajo	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. La detección temprana del cáncer	10
2.1.1. Exámenes y ensayos disponibles para la detección del cáncer	10
2.1.2. Biopsia líquida	11
2.2. Las células tumorales circulantes	11
2.2.1. Colonización o diseminación metastásica	11
2.2.2. Biomecánica del microambiente de las células tumorales circulantes	13
2.2.3. Separación de las células tumorales circulantes de la sangre	17
2.3. El linfoma de Hodgkin	19
2.3.1. Aislamiento de las células de Reed-Sternberg	20
2.4. Biomateriales y citocompatibilidad	21
2.4.1. Ensayos de citotoxicidad	22
2.5. Técnicas de microfabricación	22
2.5.1. Litografía	23
2.5.2. Técnicas sustractivas	24
2.5.3. Técnicas aditivas	25
3. MARCO METODOLÓGICO	28
3.1. Fabricación de membranas microporosas	28
3.1.1. Procedimientos fotolitográficos	28
3.1.2. Membranas de cobre recubiertas con titanio	29
3.1.3. Membranas de níquel	30
3.1.4. Membranas de fotorresina	32
3.2. Procedimientos de cultivo celular	33
3.2.1. Línea celular L-1236 y caracterización funcional de la unidad filtrante	33
3.2.2. Línea celular MCF-7 y citocompatibilidad de los materiales utilizados	36
3.3. Rediseño de la unidad filtrante	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Fabricación de membranas microporosas	39
4.1.1. Membranas de cobre recubiertas con titanio	39
4.1.2. Membranas de níquel	42
4.1.3. Membranas de fotorresina	43
4.2. Citocompatibilidad de materiales	44
4.3. Caracterización funcional del dispositivo	46
4.3.1. Distribución de tamaños de la línea celular L-1236	46
4.3.2. Ensayos de filtrado	46

4.4. Rediseño de la unidad filtrante	48
4.4.1. Unidad filtrante por microbomba de jeringas	48
4.4.2. Unidad filtrante por centrifugación	49
5. CONCLUSIONES	52
5.1. Conclusiones del presente trabajo	52
5.2. Perspectivas futuras	53
5.2.1. Microfabricación de las membranas	53
5.2.2. Citocompatibilidad y caracterización funcional de la unidad filtrante	53
5.2.3. Rediseño de la unidad filtrante	54
REFERENCIAS	55
AGRADECIMIENTOS	57

RESUMEN

Resumen en español

El cáncer es a día de hoy la principal causa de muerte en el mundo. La detección temprana del cáncer implica una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento y supervivencia; y el aislamiento de células tumorales circulantes de la sangre surge como una posible vía de diagnóstico temprano en lo que se denomina biopsia líquida. En este trabajo se estudió el desarrollo, la fabricación y la evaluación de desempeño de un dispositivo de filtrado a través de una membrana microporosa delgada biocompatible, que permitiría llevar a cabo el enriquecimiento, la clasificación y la cuantificación de células tumorales circulantes a partir de sus propiedades físicas diferenciales, brindando así una herramienta de diagnóstico temprano de diferentes tipos de cáncer y de monitoreo de la progresión de la enfermedad. Para ello, se evaluaron tres rutas de microfabricación de membranas microporosas: (1) depósito electroquímico de cobre y recubrimiento de titanio por evaporación térmica; (2) depósito electroquímico de níquel; y (3) fotolitografía. Su caracterización se hizo a través de técnicas tales como microscopía óptica y electrónica, espectroscopia por energía dispersiva y perfilometría óptica. Se estudió la citocompatibilidad de los materiales utilizados y se efectuó una caracterización funcional inicial del dispositivo.

El recubrimiento de membranas de cobre con titanio no ha sido completamente satisfactorio, obstruyendo parcialmente los poros y presentando una pobre adherencia. Aun así, permitió la utilización de las membranas en ensayos de filtrado. La fabricación por depósito electroquímico de níquel en las condiciones utilizadas produjo membranas frágiles y no manipulables, principalmente por la presencia de altas tensiones residuales en el depósito. La fabricación por fotolitografía brindó un resultado prometedor, pudiendo obtenerse membranas enteras con poros definidos. Sin embargo, dado el bajo espesor de resina utilizado, dichas membranas resultaron no ser manipulables. De los ensayos de citocompatibilidad se obtuvieron resultados poco concluyentes, con altos márgenes de error relativo. No pudo establecerse un orden de mérito de citocompatibilidad de los diferentes materiales, aunque se detectó una aparente tendencia del aluminio a disminuir la viabilidad celular, a diferencia de los demás materiales ensayados, que mantuvieron una viabilidad celular de orden comparable al ensayo control. Los ensayos de caracterización funcional del dispositivo encontraron como principal obstáculo la imposibilidad de disgregar completamente los cúmulos celulares. La adición de un quelante de cationes calcio resultó perjudicial, pues se observó la destrucción total de las células al filtrar en estas condiciones. En cuanto a la velocidad de deformación, una primera aproximación parece indicar que el caudal óptimo de filtrado se encuentra acotado entre 90 y 190 $\mu\text{L}/\text{min}$. Por último, se presentan dos alternativas de rediseño de la unidad filtrante, de modo de obtener una cámara de filtrado biocompatible. Todo esto indicaría que se han obtenido avances significativos en el logro del objetivo planteado en este trabajo.

Palabras clave: Detección temprana del cáncer · Células tumorales circulantes · Clasificación celular
Citocompatibilidad · Microfabricación

Resumen en inglés (*abstract*)

Cancer is today the leading cause of death in the world. Early detection of cancer implies a greater probability of response to treatment and survival; and the isolation of circulating tumor cells from the blood emerges as a possible way of early diagnosis in what is called liquid biopsy. In this work, the development, manufacture, and performance evaluation of a filtering device through a biocompatible thin microporous membrane was studied, which would allow the enrichment, classification, and quantification of circulating tumor cells from their differential physical properties, thus providing a tool for early diagnosis of different types of cancer and monitoring the progression of the disease. To do so, three microfabrication routes of microporous membranes were evaluated: (1) copper electroplating and titanium coating by thermal evaporation; (2) nickel electroplating; and (3) photolithography. Its characterization was made through techniques such as optical and electronic microscopy, dispersive energy spectroscopy and optical profilometry. The cytocompatibility of the materials used was studied and an initial functional characterization of the device was carried out.

The coating of copper membranes with titanium has not been completely satisfactory, partially clogging the pores and presenting poor adhesion. Even so, it allowed the use of the membranes in filtration tests. Nickel electroplating manufacturing under the conditions used produced fragile and non-manipulable membranes, mainly due to the presence of high residual stresses in the deposit. Fabrication by photolithography provided a promising result, being able to obtain whole membranes with defined pores. However, given the low thickness of resist used, these membranes turned out to be non-manipulable. The use of an alternative resist to make thicker membranes was not successful. Inconclusive results were obtained from the cytocompatibility assays, with high relative error margins. An order of merit of cytocompatibility of the different materials could not be established, although an apparent tendency of aluminum to decrease cell viability was detected, unlike the other materials tested, which maintained a cell viability of comparable order to the control assay. The functional characterization tests of the device found the impossibility of completely disaggregating cell clusters as the main obstacle. The addition of a calcium cation binder was detrimental since the total destruction of the cells was observed when filtering under these conditions. As regards the strain rate, a first approximation seems to indicate that the optimal flow rate is between 90 and 190 $\mu\text{L}/\text{min}$. Finally, two alternatives to redesign the filter unit are presented, in order to obtain a biocompatible filter chamber. All of this would indicate that significant progress has been made in achieving the objective set out in this work.

Keywords: *Cancer early detection · Circulating tumor cells · Cell sorting · Cytocompatibility
Microfabrication*

GLOSARIO DE SIGLAS

ACS	<i>American Cancer Society</i> (Sociedad Estadounidense contra el Cáncer)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CD15	<i>Cluster of Differentiation 15</i> (cúmulo de diferenciación 15)
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i> (cúmulo de diferenciación 45)
CD66b	<i>Cluster of Differentiation 66b</i> (cúmulo de diferenciación 66b)
CNEA	Comisión Nacional de Energía Atómica
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i> (depósito químico en fase vapor)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (medio de Eagle modificado de Dulbecco)
DMNT	Departamento de Micro y Nanotecnología
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i> (Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> (molécula de adhesión de células epiteliales)
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Clasificación de células activada por fluorescencia)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (suero fetal bovino), <i>Fetal Bovine Serum</i> (suero fetal bovino)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos)
G6PD	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)
INN	Instituto de Nanociencia y Nanotecnología
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i> (lactato deshidrogenasa)
MEMS	<i>Microelectromechanical Systems</i> (sistemas microelectromecánicos)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil-2H-tetrazolio
NBR	<i>Nitrile Butadiene Rubber</i> (caucho de nitrilo-butadieno)
NCI	<i>National Cancer Institute</i> (Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampón fosfato salino)
PDMS	Polidimetilsiloxano, Polidimetilsiloxano
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVD	<i>Physical Vapor Deposition</i> (depósito físico en fase vapor)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Instituto Roswell Park Memorial)
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopea de Estados Unidos)
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud)
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxaniluro

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo (WHO, 2022). Se estima que durante el año 2020 fueron diagnosticadas más de 19 millones de personas y fallecieron casi 10 millones por culpa de esta patología, lo que representa casi un sexto de las defunciones de dicho año. Los cánceres más comunes, en cuanto a nuevos casos, fueron de mama, de pulmón, colorrectal, de próstata y gástrico; y los que causaron un mayor número de fallecimientos fueron de pulmón, colorrectal, hepático, gástrico y de mama (Sung, y otros, 2021). Se muestra en la Figura 1 un detalle de estos datos.

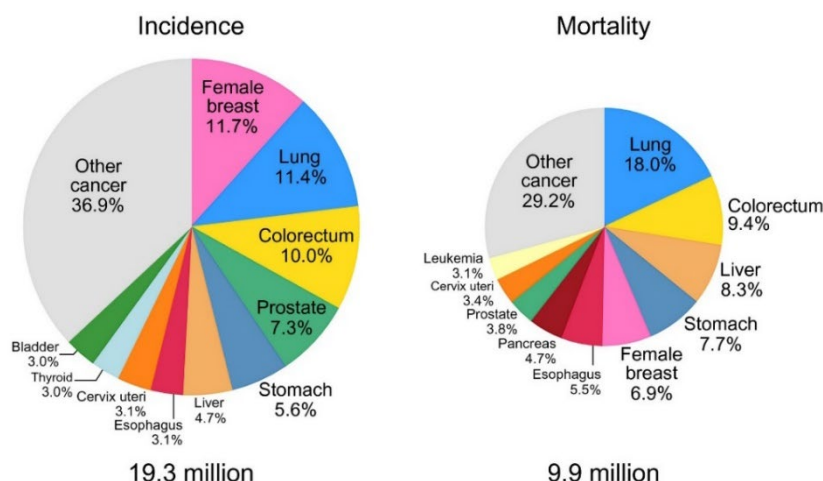


Figura 1. Número estimado de nuevos casos y fallecimientos de cáncer registrados en el mundo durante el año 2020, para ambos sexos y todos los grupos etarios; detallando los diez tipos de cáncer más comunes en ambos casos.

Nota. Tomado de “Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.”, por H. Sung y otros, 2021, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71.

“Cáncer” es un término genérico utilizado para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica distintiva y definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, en un proceso que se denomina metástasis.

El desarrollo del cáncer es motivado por una gran variedad de factores de riesgo, que incluyen hábitos alimenticios, tabaquismo, sedentarismo, alcoholismo, contaminación del aire, exposición a radiaciones ionizantes, contacto con agentes químicos tóxicos, factores hereditarios, algunas infecciones crónicas y tratamientos prolongados por otra patología. Cualquiera de los factores antes mencionados puede conducir a la aparición de un tumor.

Cuando el cáncer se detecta en una fase temprana es más probable que responda al tratamiento, lo que podría aumentar las probabilidades de supervivencia, reducir la morbilidad y disminuir los costos asociados a la terapia. Si la enfermedad se detecta prontamente y no se retrasa la atención se puede mejorar significativamente la calidad de vida de los enfermos oncológicos.

Si bien existen diversos métodos de diagnóstico temprano en diferentes estados de avance, últimamente han cobrado gran relevancia tecnologías de detección de células tumorales a partir de biopsias líquidas, por ejemplo, de la sangre. Estas técnicas se basan en las propiedades físicas y químicas diferenciales de las células tumorales, como son su diferente inmunoafinidad, tamaño, deformabilidad y densidad respecto de las células sanas (Bankó, y otros, 2019).

Las células tumorales circulantes (CTC), es decir, aquellas que se encuentran en la sangre y la linfa, juegan un papel vital en la comprensión de la biología del cáncer y tienen un gran potencial para su diagnóstico temprano, pronóstico y desarrollo de una terapia personalizada (Fidler, 2003).

Explotando las propiedades biofísicas y bioquímicas específicas de las CTC, se han desarrollado varias interfaces de materiales para su captura y separación de la sangre. Sin embargo, debido al extremadamente bajo número de CTC en sangre periférica, del orden de 1 a 100 CTC por cada 1 mL de sangre periférica, que generalmente contiene 5.000 millones de células sanguíneas normales, el enriquecimiento resulta en un prerequisite indispensable para la detección de CTC y existe la necesidad de mejorar la eficiencia y especificidad de captura (Li, Chandran, Lim, & Chen, 2015).

En este sentido, los sistemas microelectromecánicos (MEMS) surgen como posibles soluciones. Éstos pueden ser fabricados utilizando materiales biocompatibles, con gran uniformidad y reproducibilidad, de modo similar a los circuitos integrados. Con la finalidad de producir la configuración deseada, diversas estructuras micrométricas tales como electrodos, conexiones, canales, reservorios, bombas, válvulas y/o membranas pueden incluirse en la fabricación de este tipo de dispositivos. Además, pueden ser fabricados asépticamente y sellados herméticamente. La utilización de microtecnología para el desarrollo de nuevos dispositivos representa un importante recurso para el desarrollo biomédico (Fachin, Chen, Toner, & Wardle, 2011; Lei, 2020).

1.2. Antecedentes

El presente trabajo se encuentra enmarcado en el proyecto FiCelTAr, Filtro de Células Tumorales Argentino (Felix Pozzi, y otros, 2022a; Felix Pozzi, y otros, 2022b), del DMNT (CNEA) y asociado al INN (CNEA-CONICET). Dicho proyecto demanda una visión multidisciplinaria, motivo por el cual el grupo de trabajo se encuentra conformado por investigadores, becarios y estudiantes cuyas disciplinas incluyen bioquímica, biología, física, ingeniería, ciencia de materiales, diseño industrial y microfabricación. El objetivo del proyecto es el desarrollo y la fabricación de un dispositivo que permita detectar CTC en sangre periférica por filtrado.

Al inicio del presente trabajo, el grupo contaba con una unidad filtrante fabricada a modo de prototipo para las pruebas de concepto, la cual se encuentra detallada en la Figura 2. Dicha unidad fue fabricada en su momento con los materiales y procesos disponibles, sin haber considerado la biocompatibilidad de sus materiales sino simplemente su geometría y funcionalidad física. Una membrana microestructurada resulta el elemento clave para el filtrado. Ésta se fabricó por depósito electroquímico (*electroplating*) de cobre sobre un molde fotolitográfico. La membrana se sujeta entre mordazas mecanizadas a partir de una barra de aleación de aluminio, utilizando como sello dos juntas tóricas *O-ring* de caucho sintético NBR disponibles comercialmente. A dichas mordazas se le acoplan por roscado dos jeringas *Luer-Lok*, una que funciona como reservorio del fluido a filtrar y otra que funciona como receptora del fluido filtrado, accionadas por una bomba de jeringas que permite caudales del orden de los microlitros por minuto.

Debido a la simplicidad de la técnica de selección celular propuesta, el desarrollo de este dispositivo ha despertado interés en el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” para su implementación en investigación de diversas líneas celulares tumorales humanas. En línea con esto, han proporcionado al grupo de investigación líneas celulares de linfoma de Hodgkin humano, un tipo de cáncer del sistema linfático, para utilizar como prueba para la unidad filtrante. Dicha enfermedad se caracteriza por la presencia de unas células conocidas como células de Reed-Sternberg, que se distinguen por su gran tamaño, de 20 a 50 μm , y la posesión de múltiples núcleos o bien un núcleo bilobulado con nucléolos prominentes similares a inclusiones, que les dan un aspecto similar a los ojos de un búho. La prueba de concepto del filtro microestructurado consistiría en aislar estas células distintivas del linfoma de Hodgkin. Los primeros resultados fueron prometedores, logrando enriquecer células de Reed-Sternberg como se observa en la Figura 3. Sin embargo, también se observaron falsos positivos, tales como cúmulos de linfocitos, cúmulos de células mixtas (Reed-Sternberg + linfocitos) y linfocitos grandes aislados.

Las conclusiones del proyecto FiCelTAr al inicio del presente trabajo fueron enumeradas por Felix-Pozzi y colaboradores (2022a): se ha logrado fabricar íntegramente el sistema de filtrado en las instalaciones del DMNT, el diseño ha superado las pruebas realizadas, se han logrado filtrados exitosos de la línea celular L-1236 de linfoma de Hodgkin humano, y la unidad filtrante ha demostrado separar objetos más grandes que sus poros.

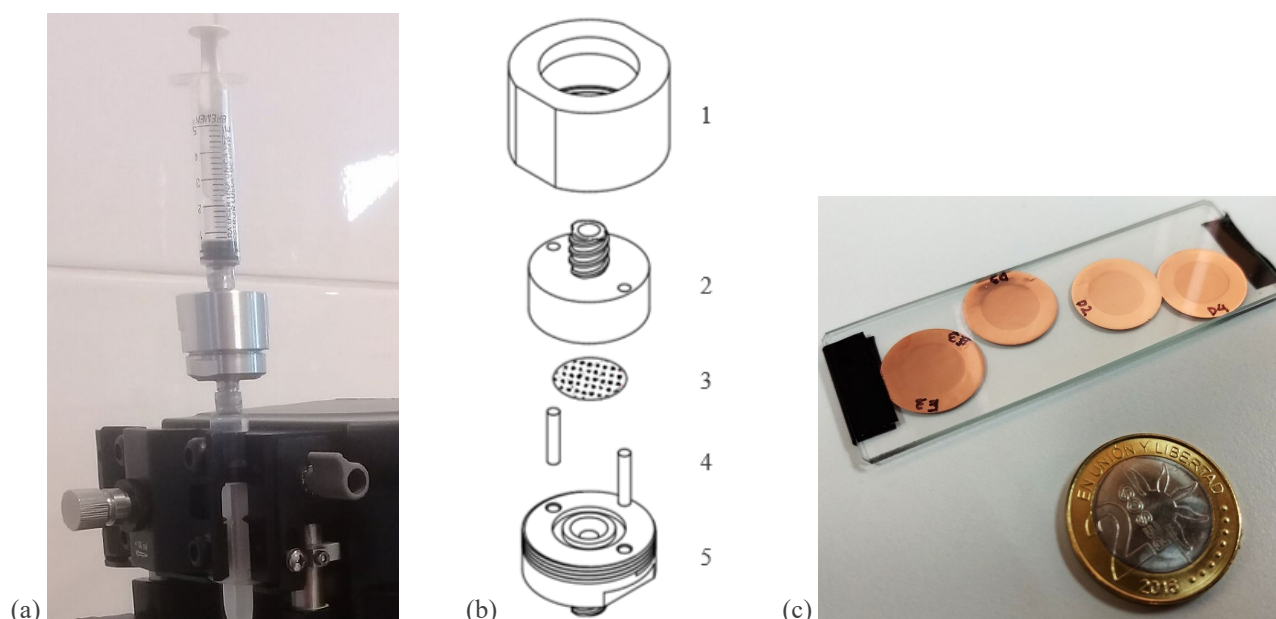


Figura 2. (a) Fotografía de la unidad filtrante FiCelTAR montada para su uso. (b) Despiece mecánico de la unidad filtrante FiCelTAR: 1 carcasa exterior roscada; 2 mordaza superior, se observa la rosca para jeringa *Luer-Lok*; 3 Membrana microestructurada; 4 clavijas de alineación; 5 mordaza inferior, se observa el asiento para la junta tórica *O-ring*. (c) Fotografía de cuatro membranas microestructuradas almacenadas entre dos portaobjetos y junto a una moneda de dos pesos argentinos a modo de escala comparativa.

Nota. Adaptado de “Classic Hodgking Lymphoma cell enrichment using ‘Dead End’ mechanical filtering”, por M. Felix-Pozzi y otros, 2022, *III Brazil-Argentine Microfluidics Congress; VI Congreso de Microfluidica Argentina*.

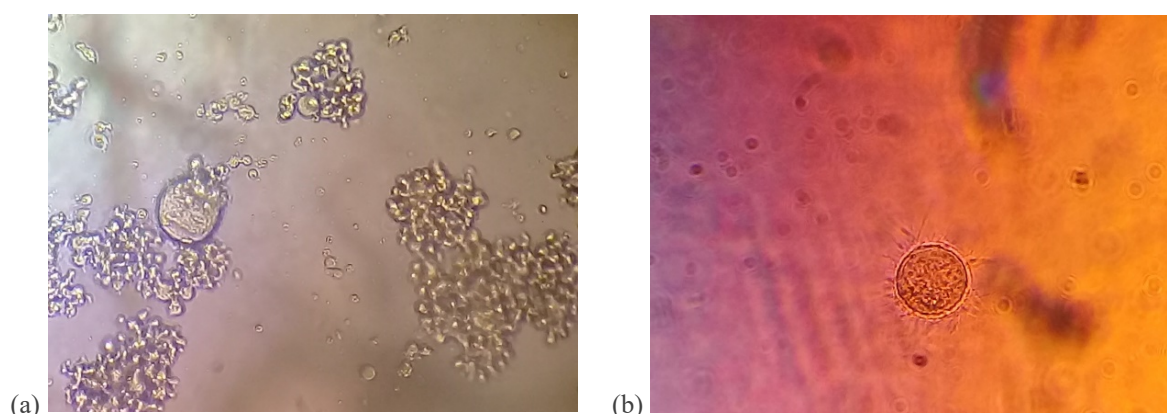


Figura 3. Micrografías de la suspensión celular antes y después de un procedimiento de filtrado. (a) Previo al filtrado, cúmulos de linfocitos y una presunta célula de Reed-Sternberg rodeada de linfocitos. (b) Luego del filtrado, una presunta célula de Reed-Sternberg aislada.

Nota. Tomado de “Classic Hodgking Lymphoma cell enrichment using ‘Dead End’ mechanical filtering”, por M. Felix-Pozzi y otros, 2022, *III Brazil-Argentine Microfluidics Congress; VI Congreso de Microfluidica Argentina*.

El objetivo final del proyecto FiCelTAR es el desarrollo de una técnica de detección temprana del cáncer a partir de la extracción de sangre periférica, su filtrado y el análisis citológico subsiguiente; que eventualmente sea accesible para los laboratorios de análisis clínicos y pueda formar parte del resultado de un hemograma. Un objetivo adicional del proyecto, en vistas de la colaboración con el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, es el enriquecimiento y eventual aislamiento de las células de Reed-Sternberg a partir de un cultivo celular de linfoma de Hodgkin.

1.3. Objetivos del presente trabajo

Visto y considerando lo expuesto en 1.1 Contexto y 1.2 Antecedentes, se propone en el presente trabajo:

1. Realizar una revisión sistemática de la literatura relevante sobre el papel de las células tumorales circulantes en la metástasis del cáncer y su potencial utilidad en la detección temprana de esta enfermedad.
2. Llevar a cabo una investigación bibliográfica acerca de los materiales biocompatibles y los procesos de microfabricación disponibles para el desarrollo y fabricación de membranas microporosas.
3. Evaluar la factibilidad técnica de la microfabricación y caracterización de membranas microporosas con diferentes tamaños de poro, mediante pruebas y análisis de diferentes procesos de fabricación y ensayos de citocompatibilidad.
4. Realizar una caracterización funcional inicial del dispositivo, mediante pruebas de filtrado de suspensiones celulares de linfoma de Hodgkin clásico, con el objetivo de validar el dispositivo como posible herramienta para la detección temprana del cáncer.
5. Rediseñar y evaluar la factibilidad de la fabricación de la unidad filtrante, incrementando la calidad de su biocompatibilidad y su proceso de funcionamiento.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La detección temprana del cáncer

Como se dijo anteriormente, la detección temprana del cáncer implica una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento y supervivencia. La detección temprana se basa en dos frentes de ataque: el diagnóstico precoz de la enfermedad y el tamizaje o cribado (WHO, 2022).

El diagnóstico precoz se basa en tres componentes: (1) el conocimiento de los síntomas de los distintos tipos de cáncer y de la importancia de acudir al médico si se observan anomalías que suscitan preocupación; (2) el acceso a los servicios clínicos de evaluación y diagnóstico; y (3) la derivación oportuna del paciente a los servicios de tratamiento. El diagnóstico precoz de los cánceres sintomáticos se puede y se debe hacer en todas las situaciones para la mayoría de los tipos de cáncer.

El tamizaje o cribado consiste en la detección de indicios de un cáncer concreto o una determinada lesión precancerosa en personas asintomáticas. Cuando se encuentran anomalías durante el tamizaje deberán realizarse más pruebas para confirmar o descartar el diagnóstico y para derivar al paciente a tratamiento, si es necesario. Los programas de tamizaje disponibles son eficaces para algunos tipos de cáncer, pero no para todos, y en general son mucho más complejos y requieren muchos más recursos que el diagnóstico precoz.

2.1.1. Exámenes y ensayos disponibles para la detección del cáncer

Según la ACS (2023a), las técnicas disponibles para la detección del cáncer pueden distinguirse a grandes rasgos en tres categorías: (1) diagnóstico por imágenes, (2) procedimientos endoscópicos, y (3) biopsias y ensayos citológicos.

El diagnóstico por imágenes consiste en tomar fotografías del interior del cuerpo con la utilización de diferentes formas de energía, como ser rayos X, ondas sonoras, partículas radiactivas o campos magnéticos. Las principales técnicas de diagnóstico por imágenes utilizadas para detección y evaluación del cáncer son la tomografía computarizada, la resonancia magnética, la radiografía, el escaneo por medicina nuclear y la ecografía o sonografía. Permite la detección temprana del cáncer, la búsqueda de una masa tumoral si la persona tiene síntomas relacionados con el cáncer, la ubicación precisa del tumor en el cuerpo, la determinación del estado de avance del tumor y de su respuesta a un tratamiento. Sin embargo, presentan algunas limitaciones: la mayoría de las veces estas pruebas por sí solas no permiten asegurar si un dado cambio es causado por el cáncer o no; pueden encontrar grupos de millones de células cancerosas, pero no pueden mostrar una sola o un grupo pequeño de células tumorales; y pueden mostrar algo que parece cáncer pero que no lo es.

La endoscopia consiste en la introducción dentro del cuerpo de un endoscopio a través de un orificio natural, una incisión quirúrgica o una lesión. El endoscopio es un instrumento tubular rígido o semiflexible que contiene en su extremo una luz y una cámara o una lente para permitir la visualización del interior de un órgano hueco o de una cavidad corporal. Usualmente se utilizan para observar un posible tumor detectado en un diagnóstico por imágenes. Si el endoscopio posee un fórceps, permite tomar biopsias. Algunos ejemplos de endoscopia aplicada al monitoreo del cáncer son broncoscopia (pulmones), colonoscopia (recto y colon), laparoscopia (abdomen y pelvis), laringoscopia (laringe, cuerdas vocales y garganta). Los procedimientos endoscópicos poseen riesgo de reacciones a la anestesia, perforaciones de paredes internas, sangrado, infecciones, ronquera y neumotórax.

La biopsia es la extracción de una muestra de tejido o de células, y se puede tomar de casi cualquier parte del cuerpo. La forma en que se tome la muestra dependerá de dónde se encuentre el tumor y qué tipo de cáncer se sospecha. Algunos tipos de biopsias extraen un órgano completo, otros tipos de biopsias extraen muestras de tumores a través de una aguja delgada o un endoscopio con fórceps. La citología es el diagnóstico de enfermedades mediante la observación de células individuales y/o pequeños grupos de células, extraídas de los fluidos corporales o por raspado o cepillado; y es una parte importante del diagnóstico de algunos tipos de cáncer. En comparación con la biopsia de tejido, una muestra citológica generalmente es más fácil de extraer, causa menos

molestias al paciente y tiene menor probabilidad de complicaciones graves. La desventaja es que usualmente el resultado de una biopsia de tejido es más preciso. Las muestras de biopsia o citología se evalúan a partir del tamaño y la morfología de las células y sus núcleos y del arreglo celular; y permiten determinar el tipo de cáncer y el grado de avance de éste. Para ello se utilizan diversas técnicas, como tinción histoquímica e inmunohistoquímica, microscopía electrónica, citometría de flujo, citometría de imágenes y ensayos genéticos.

2.1.2. Biopsia líquida

Recientemente, un método de diagnóstico no invasivo, denominado biopsia líquida, ha surgido como una nueva técnica muy prometedora para el diagnóstico temprano del cáncer. La biopsia líquida es una prueba de laboratorio que se realiza en una muestra de sangre, orina u otro fluido corporal con el fin de buscar células tumorales o trozos de ADN, ARN u otras moléculas que las células tumorales liberan en los fluidos corporales. La posibilidad de tomar varias muestras a lo largo del tiempo permite que los equipos médicos comprendan la clase de cambios genéticos o moleculares que tienen lugar en un tumor (NCI, 2023).

En comparación con las biopsias convencionales, ésta es una técnica innovadora y significativamente menos invasiva para la obtención de muestras de células tumorales. Las técnicas de biopsia líquida pueden proporcionar información en tiempo real sobre el estado de avance de la enfermedad y el perfil molecular del tumor. Además, las biopsias líquidas se pueden repetir con la frecuencia deseada para un seguimiento estrecho del progreso de la enfermedad y el tratamiento (Bankó, y otros, 2019).

2.2. Las células tumorales circulantes

La metástasis es el peor resultado para un paciente de cáncer, dado que ésta, entendida como la aparición de un foco cancerígeno en un órgano distinto de aquel en que se inició la enfermedad, es la principal causa de muertes por cáncer (WHO, 2022). Además, la diseminación metastásica de un tumor es un proceso biológico poco conocido incluso al día de hoy. Para colonizar sitios de órganos alejados del tumor primario, las células tumorales deben viajar a través del torrente sanguíneo, un microambiente totalmente diferente a los tejidos sólidos de los que derivaron. Dichas células migratorias se denominan células tumorales circulantes o CTC (Krog & Henry, 2018). Si bien se conoce la existencia de las CTC desde finales del siglo XIX (Ashworth, 1869), éstas siguen siendo enigmáticas en muchos sentidos, en parte por las dificultades para aislarlas y estudiarlas.

2.2.1. Colonización o diseminación metastásica

La presencia de las CTC en el torrente sanguíneo es un resultado esperado de la formación de un tumor y está relacionada con el proceso de diseminación metastásica. Una célula normal se transforma en una célula tumoral maligna y agresiva a través de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas. El proceso de progresión maligna del cáncer impacta en el comportamiento y las propiedades físicas de la célula tumoral y favorece los primeros pasos de la metástasis del cáncer (Mierke, 2018). El proceso de diseminación metastásica se esquematiza en la Figura 4.

La iniciación de un tumor ocurre como resultado de un proceso complejo, de múltiples pasos, que involucra la activación de oncogenes, causando el incremento de la división celular, la supresión de la diferenciación celular y la omisión de la muerte celular; y la inactivación de genes supresores tumorales, produciendo la división celular en forma descontrolada. Todos estos efectos forman el fenotipo de las células tumorales y el desarrollo de un tumor sólido primario, denominado carcinoma.

La transformación de células normales a tumorales es acompañada por alteraciones en la concentración de oxígeno en el carcinoma. Cuando se forma el carcinoma, se establece rápidamente un gradiente de oxígeno, que posee los niveles más bajos en el centro de masa del tumor y creciente hacia las regiones más externas. Para que el tumor crezca, las células tumorales deben adaptarse a esta alteración en las condiciones del entorno, para lo cual reprograman su metabolismo energético.

Bajo condiciones fisiológicas, las células normales crecen y proliferan principalmente procesando glucosa bajo condiciones aeróbicas, es decir, en presencia de oxígeno, lo que lleva a la producción de piruvato por glucólisis en el citoplasma y la descarboxilación oxidativa de éste en la mitocondria. En cambio, las células del interior del tumor deben crecer bajo condiciones anaeróbicas, con lo cual no es posible la degradación piruvato y el metabolismo energético queda restringido a la glucólisis. El metabolismo energético en condiciones anaeróbicas es entre 2,8 y 3,6 veces menos eficiente que en condiciones aeróbicas; y para compensar esto, las células tumorales incrementan la llegada de glucosa al citoplasma y aceleran el ciclo de glucólisis.

Un tumor sin sistema vascular dejará de crecer cuando alcance un diámetro máximo de 1 a 2 mm. Esto significa que el tumor es pequeño y probablemente no cause ningún daño a los órganos hospedadores y/o vecinos. Para que el tumor pueda superar esta restricción y seguir creciendo, es necesario que ocurra el proceso de angiogénesis tumoral, es decir, la degradación de la matriz extracelular y la generación de nuevos vasos sanguíneos que suministran nutrientes y oxígeno a las células tumorales en el interior del tumor y también pueden servir para remover productos de desecho.

Las CTC son producto de la intravasación de las células del tumor sólido, es decir, el ingreso de células provenientes del tumor al sistema circulatorio a través de los nuevos vasos constituidos durante la angiogénesis tumoral. Dichas células pueden viajar por todo el cuerpo hacia tejidos objetivo en los cuales pueden acumularse, extravasar y producir un cúmulo celular metastásico, que eventualmente producirá un tumor secundario. Para seguir creciendo, el foco metastásico debe, al igual que el tumor primario, desarrollar una red vascular y evadir la destrucción por las defensas del huésped; luego, las células pueden invadir los vasos sanguíneos, ingresar a la circulación y producir metástasis adicionales (Fidler, 2003).

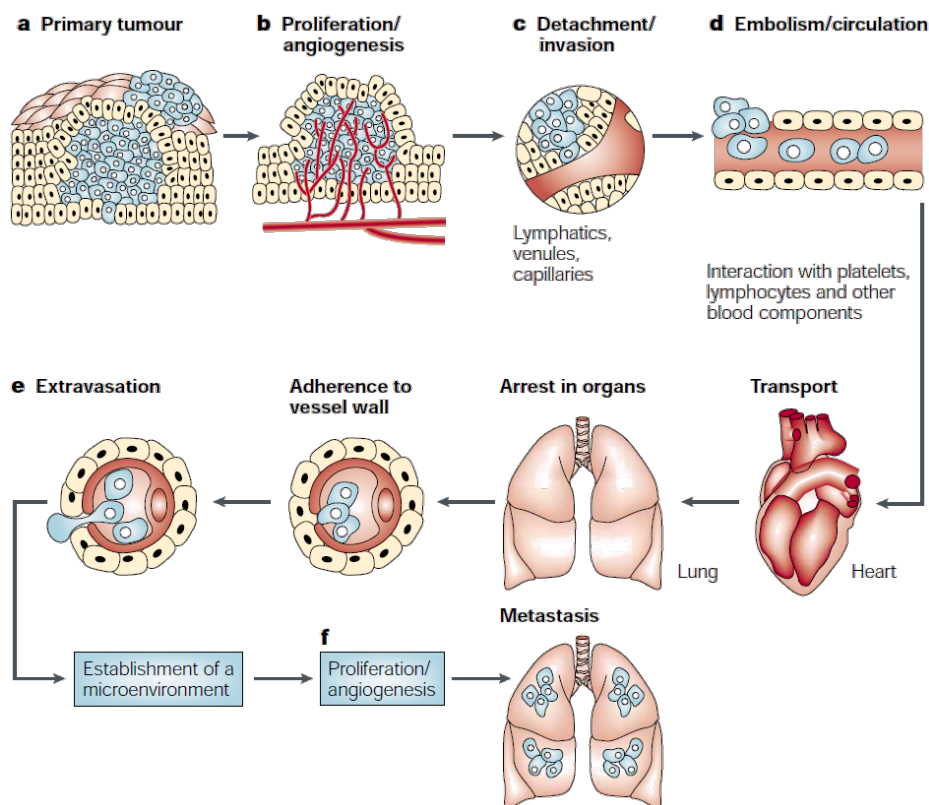


Figura 4. Esquema del proceso de diseminación metastásica: (a) transformación celular y crecimiento tumoral; (b) proliferación y angiogénesis, debe existir una vascularización extensa si una masa tumoral excede de 1 a 2 mm de diámetro; (c) invasión local del tejido aledaño al tumor por parte de algunas células tumorales; (d) intravasación y circulación de células tumorales individuales o agregados, se destruye rápidamente la mayoría de las células tumorales circulantes y las sobrevivientes quedan arrestadas en los lechos capilares de órganos distantes; (e) extravasación; y (f) proliferación dentro del órgano y metástasis.

Nota. Tomado de "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited", por I. J. Fidler, 2003, *Nature Reviews Cancer*, 3(6).

Una vez que las CTC han ingresado a la circulación, la evidencia indica que se mantienen un tiempo breve en ella (Krog & Henry, 2018). Sin embargo, las mediciones efectuadas no revelan si las CTC se encuentran en circulación continua o si poseen períodos de inmovilización, arrestadas en la microvasculatura. Además, es importante notar que no todas las CTC son viables; el proceso de colonización, si bien eficaz, es altamente ineficiente.

2.2.2. Biomecánica del microambiente de las células tumorales circulantes

El sistema circulatorio, la sangre y la linfa

El circulatorio es un sistema altamente evolucionado para el transporte eficiente de células sanguíneas, gases, nutrientes y hormonas que abastecen a los tejidos y ayudan al organismo a mantener su defensa, homeostasis y crecimiento. La circulación se compone de dos unidades: el sistema cardiovascular, compuesto por el corazón y los vasos sanguíneos (arterias, arteriolas, capilares, vénulas, venas), que entregan sangre a los tejidos; y el linfático, compuesto por los vasos y los ganglios linfáticos, que recogen el fluido de los tejidos para su recirculación en forma de linfa. Un dibujo esquemático del sistema circulatorio se presenta en la Figura 5.

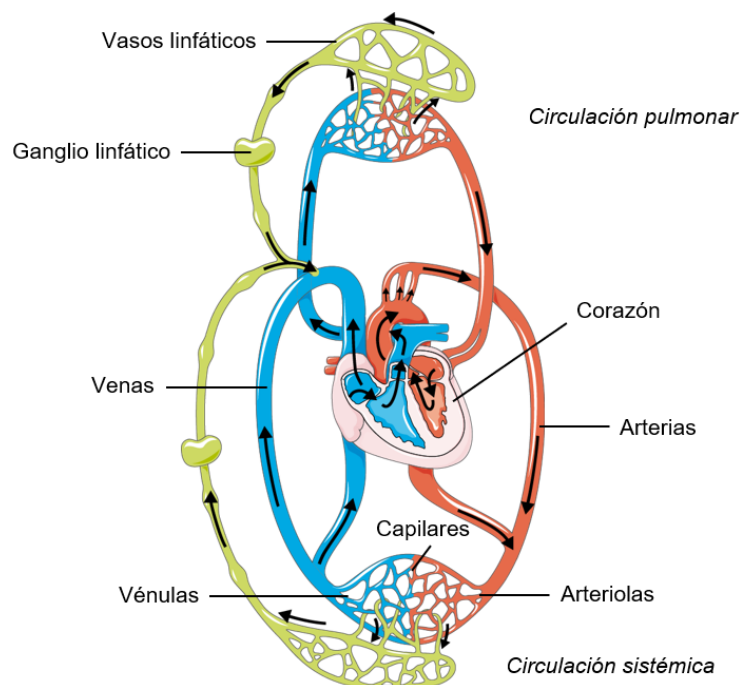


Figura 5. Esquema de los sistemas cardiovascular y linfático. Se indica la nomenclatura de los tipos principales de vasos sanguíneos. Se muestran en rojo los vasos que transportan sangre oxigenada; en azul, aquellos que transportan sangre desoxigenada; en amarillo, las estructuras linfáticas.

Nota. Adaptado de “Lymphatic circulation”, por Servier, *Servier Medical Art*.

La sangre es una suspensión de células en un fluido. Circula por todo el cuerpo por bombeo del corazón, sirviendo como vehículo de transporte de gases, nutrientes, productos de desecho, células y hormonas. El fluido se conoce como plasma y está compuesto por, aproximadamente, 90% de agua, 8% de proteínas, 1% de sales inorgánicas, 0,5% de lípidos, 0,1% de glucosa y otros componentes menores (Young, O'Dowd, & Woodford, 2013).

Los componentes celulares de la sangre son:

- Los eritrocitos o glóbulos rojos, que proporcionan la mayor parte del transporte de oxígeno desde los pulmones y de dióxido de carbono de retorno. Poseen una morfología de disco bicóncavo con un diámetro de alrededor de 8 μm . Dicha morfología, sumada a la gran flexibilidad de su citoesqueleto, permite que circule por los capilares sanguíneos (Williams P. L., 1995).

- Los leucocitos o glóbulos blancos, que constituyen una parte importante del sistema inmunitario del organismo, realizando sus funciones en los tejidos y encontrándose en la sangre en tránsito o reserva. Según el tamaño, la morfología del núcleo y las inclusiones citoplásmicas, se distinguen en neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos; todos de morfología esférica y cuyos diámetros varían normalmente entre 5 y 20 μm (Williams P. L., 1995; Young, O'Dowd, & Woodford, 2013).
- Los trombocitos o plaquetas, que recubren las paredes de los vasos sanguíneos dañados, taponando pequeños defectos, y ayudan a activar la cascada de coagulación de la sangre. Poseen una morfología de disco ovalado biconvexo o irregular con diámetro entre 2 y 4 μm (Williams P. L., 1995).

La linfa es por lo general similar al plasma sanguíneo; sin embargo, debido a que deriva del líquido intersticial, con el cual la sangre y las células circundantes intercambian sustancias continuamente, la linfa sufre cambios continuos en su composición. La linfa devuelve las proteínas y el exceso de líquido intersticial al torrente sanguíneo; y también transporta grasas desde el sistema digestivo a la sangre. Sus componentes celulares son los leucocitos, principalmente linfocitos.

Tensiones y deformaciones en el sistema circulatorio

Krog y Henry (2018) consideran tres características principales de la circulación que inciden en la estabilidad mecánica de las CTC: (1) tensión de corte del fluido impartida por el flujo sanguíneo; (2) deformación en la microcirculación; y (3) fuerzas generadas por las interacciones adhesivas entre las células circulantes y la pared vascular.

En el sistema circulatorio, el flujo es impulsado por fuerzas gravitacionales o gradientes de presión. La viscosidad es una medida de la resistencia de un fluido a la deformación. Ésta se opone al gradiente de presión, creando tensiones de corte entre las capas vecinas de fluido moviéndose a diferentes velocidades. La magnitud de la tensión de corte del fluido está dada por:

$$\tau = \mu \frac{\delta u}{\delta r}$$

donde τ es la tensión de corte, μ es la viscosidad, u es la velocidad del fluido y r es la distancia radial al eje de simetría del tubo. La derivada $\delta u / \delta r$ representa la velocidad de deformación de corte perpendicular a una frontera. Asumiendo flujo laminar de un fluido incompresible y uniformemente viscoso, es decir, newtoniano, a través de un tubo cilíndrico de sección circular constante, la ley de Hagen-Poiseuille indica que la distribución de velocidades sigue la forma de un paraboloide circular:

$$u = \frac{\Delta p}{4L\mu} (R^2 - r^2)$$

donde Δp es la variación de presión y L y R son la longitud y el radio interno del tubo cilíndrico, respectivamente. Por lo tanto, la tensión de corte del fluido varía linealmente con la posición radial de una capa del fluido, siendo máxima cerca de la pared del tubo.

Sin embargo, la ley de Hagen-Poiseuille no es válida en la microcirculación, dado que la sangre se comporta de forma no newtoniana y la interacción de los eritrocitos altera la dinámica del flujo. El número de Reynolds caracteriza el tipo de flujo de un fluido; está dado por:

$$\text{Re} = \frac{\rho u L}{\mu}$$

donde Re es el número de Reynolds, ρ es la densidad del fluido, u es la velocidad de éste, L es la longitud del tubo o vaso y μ es la viscosidad del fluido. Para $\text{Re} \ll 1$, dominan las fuerzas viscosas, mientras que para $\text{Re} \gg 1$ dominan las fuerzas inerciales. Por otro lado, para $\text{Re} \leq 2000$, el flujo es laminar, para $2000 < \text{Re} < 3000$ es transicional y para $\text{Re} \gg 3000$ es turbulento. En el sistema

circulatorio, dominan las fuerzas viscosas y el flujo suele ser laminar, pero existen turbulencias momentáneas en la aorta ascendente, la bifurcación aortoiliaca o durante la apertura y el cierre de las válvulas cardíacas, entre otras ubicaciones. Cuando ocurre la turbulencia, se incrementa la frecuencia del daño celular, pero la brevedad de ésta (intervalos de ~ 150 ms) limita la extensión del daño.

Las CTC son transportadas a través del sistema cardiovascular o del linfático, en donde deben soportar un amplio rango de tensiones de corte. La tensión de corte del fluido en la pared de los vasos linfáticos es en promedio de $0,064$ Pa, con picos entre $0,4$ y $1,2$ Pa. Los vasos sanguíneos, en cambio, presentan variaciones más grandes. Un valor promedio para la tensión de corte del fluido en la pared de las arterias es $1,5$ Pa, pero se ha reportado un rango de 1 a 7 Pa para arterias normales y de $0,1$ a $0,6$ Pa para venas normales. La tensión de corte encontrada en la microcirculación (arteriolas, capilares, vénulas) se estima entre $0,3$ y 14 Pa en un ambiente de bajo número de Reynolds. Ahora bien, las CTC también deben pasar a través del corazón, que representa un ambiente de tensión de corte dinámica, con amplias variaciones locales. Varios estudios experimentales y computacionales indican que la tensión de corte en el corazón está en el orden de $7,9$ a 10 Pa, llegando localmente hasta los 52 Pa. Por último, patologías como la coartación aórtica o la estenosis coronaria pueden producir valores de tensión de corte locales de 100 a 300 Pa; mientras que válvulas mecánicas pueden producir valores entre 150 y 450 Pa. Todo esto se resume en la Figura 6.

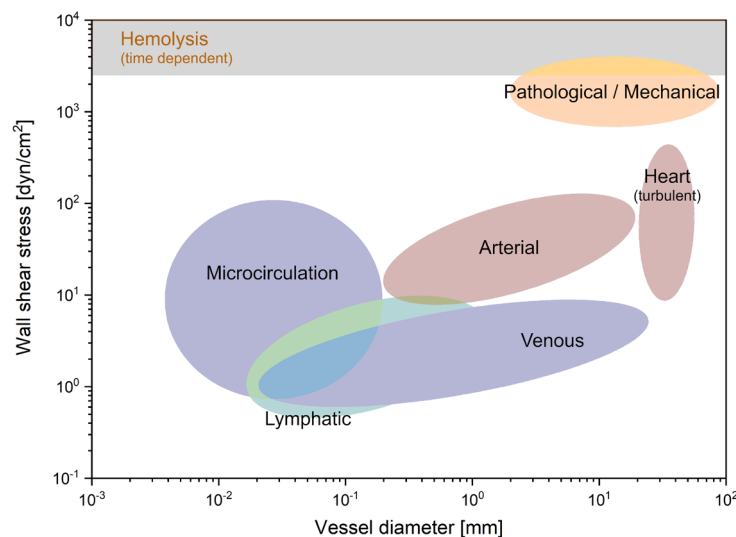


Figura 6. Rangos de tensiones de corte del fluido en la pared en relación con el diámetro del vaso en condiciones fisiológicas y patofisiológicas. Los óvalos representan valores aproximados en diferentes rutas de la vasculatura. El nivel de tensión de corte asociada con la hemólisis se indica por la franja roja, aunque es importante tener en cuenta que se trata de un fenómeno dependiente del tiempo. Conversión de unidades: $10 \text{ dyn/cm}^2 = 1 \text{ Pa}$.

Nota. Adaptado de “Biomechanics of the circulating tumor cell microenvironment”, por B. L. Krog y M. D. Henry, 2018, *Biomechanics in Oncology, Advances in Experimental Medicine and Biology 1092*.

Por otro lado, el diámetro de los vasos en el sistema circulatorio varía entre $15 \mu\text{m}$ y 5 mm para los vasos linfáticos y entre $5 \mu\text{m}$ y 30 mm para los vasos sanguíneos. Los eritrocitos, que pueden alterar rápidamente su morfología, navegan los capilares unas 300 veces más rápido que los leucocitos. Estos últimos pueden atravesar los capilares, pero con frecuencia son arrestados brevemente en la microvasculatura. En estos vasos tan pequeños, tanto los eritrocitos como los leucocitos sufren tensiones en sus membranas y citoesqueleto a medida que se deforman. Las deformaciones de los leucocitos se dan con variación del área superficial; los neutrófilos, por ejemplo, poseen un módulo de expansión de área de $3,9 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}$. En cambio, los eritrocitos poseen un módulo de $0,3\text{--}0,6 \text{ N/m}$ y una membrana prácticamente incompresible; sus deformaciones se dan por flexión y manteniendo casi constante su área superficial, con un módulo de flexión 10^{-19} N/m . Los eritrocitos son además extraordinariamente resistentes a la tensión de corte de fluido, con hemólisis detectable recién con una exposición de 2 min a 150 Pa , una magnitud suprafisiológica.

Por último, en cuanto a las fuerzas de tracción, se sabe que los leucocitos se involucran en interacciones moleculares adhesivas con las paredes de los vasos en respuesta a estímulos inflamatorios. Las fuerzas de tracción y la tensión de corte del fluido generan un esfuerzo de torsión sobre las células, que hace que el transporte de éstas sea a través de un movimiento de rodadura sobre la pared del vaso. Hay evidencia de que, bajo algunas circunstancias, las CTC poseen un comportamiento similar al de los leucocitos.

Comportamiento mecánico de las CTC en el sistema circulatorio

El microambiente de las CTC presenta un estilo de vida para las células tumorales muy diferente al que están acostumbradas en el microambiente del tumor sólido. Las modelizaciones y los datos experimentales disponibles indican que la restricción de tamaño en la microvasculatura es el destino inicial más probable para las CTC, probablemente a los pocos segundos de su intravasación. Las células de los tumores sólidos son grandes (15 a 20 μm) en relación con los capilares (3 a 8 μm) y, por lo tanto, la microcirculación misma representa un filtro para las CTC. Si bien muchas CTC son arrestadas en los capilares, algunas logran escapar por lo que la metástasis no está restringida a la primera microvasculatura encontrada en la circulación. Poco se sabe acerca de cómo las CTC se mueven luego de su arresto en la microvasculatura, y no resulta claro si su tránsito a lo largo de la microvasculatura es simplemente un proceso estocástico o si hay procesos biológicos que lo influyen (Krog & Henry, 2018).

Las CTC son distorsionadas cuando ingresan a la microcirculación, tal como sugiere la diferencia de tamaños, y usualmente puede vérselas tortuosamente curvadas alrededor de bifurcaciones de vasos. Esto provoca una deformación con expansión del área superficial de la membrana celular, hasta cierto punto crítico en el que se rompe irreversiblemente. Dado que las CTC arrestadas ocluyen los vasos, la fuerza que deforma las células es la presión sanguínea y no las tensiones de corte del fluido ni las interacciones adhesivas con las paredes de los vasos. Aun así, el plasma puede fluir alrededor de las células ocluyendo un vaso sanguíneo. La evidencia indica que es poco probable que la deformación de las CTC en la microvasculatura lleve, al menos en minutos, a su destrucción. Es menos claro si la deformación contribuye a la letalidad en escalas de tiempo más largas. La cinética de desobstrucción de la microvasculatura es incierta y no se conoce cuánto de ésta se debe al desplazamiento o a la muerte celular.

Por otro lado, las CTC están expuestas a un microambiente de niveles altamente variables de tensión de corte de fluido, como se ha descrito anteriormente. Éstas deben sobreponerse al daño producido por las tensiones de corte hemodinámicas. Las células de un tumor sólido son relativamente grandes y no tienen las mismas propiedades biofísicas de las células sanguíneas, que las protegen del corte hemodinámico. Una vez en el torrente sanguíneo, las CTC experimentan niveles de velocidad de flujo que se incrementan hasta los 15 cm/s en la vena cava antes de entrar a la parte derecha del corazón. La tensión de corte de fluido dependerá de la posición radial de la CTC en el vaso, su tamaño y la velocidad del flujo. Sin embargo, dado que las CTC son relativamente grandes, es esperable que sean arrastradas hacia las zonas de mayor tensión de corte en las paredes de los vasos por marginación. Esta fase del viaje duraría algunos segundos, a menos que prevalezcan las interacciones adhesivas con el endotelio y ralenticen el movimiento de las células tumorales.

Usualmente se menciona que las CTC son frágiles. Sin embargo, Krog y Henry (2018) consideran cuatro modelos de tensión de corte de fluido para estudiar la respuesta mecánica de las CTC y detallan algunos resultados interesantes:

- Las CTC podrían exhibir un comportamiento de rodadura al igual que los leucocitos.
- Aplicando una tensión de corte de $\sim 2,9$ Pa a una velocidad de deformación de 2250 s^{-1} se necesitaron 5,5 h de exposición continua para reducir la viabilidad celular a cero, lo que habla de la robustez de las CTC, dado que normalmente la exposición de éstas a dichos niveles de tensión de corte solo ocurre muy brevemente.
- Las células tumorales son remarcablemente más resistentes a pulsos altos y breves de tensión de corte que sus contrapartes no tumorales, que exhiben fragilidad mecánica. Tanto la duración como la magnitud de la exposición a un pulso alto y breve de tensión

de corte son variables importantes que permiten distinguir el comportamiento diferencial entre células epiteliales benignas y malignas.

- Los leucocitos y eritrocitos son considerablemente más resistentes a pulsos altos y breves de tensión de corte que las células tumorales.

Las conclusiones recapituladas por los autores evidencian la robustez mecánica de las células tumorales. Sin embargo, la principal limitante de los modelos de estudio es que la mayoría, si no todos, han sido practicados utilizando líneas celulares tumorales establecidas y no se conoce con exactitud si los resultados son extrapolables al comportamiento de las CTC. La principal diferencia es que la viabilidad de las líneas celulares utilizadas es alta, lo cual no es el caso de las CTC, cuya viabilidad suele ser pobre, estando muchas de ellas apoptóticas en el momento o luego de la intravasación. Justamente, el proceso de apoptosis tiende a disminuir la rigidez y aumentar la fragilidad de las células; por lo que la aparente fragilidad mecánica de las CTC podría ser una consecuencia directa de su fragilidad biológica, su propensión a ya estar muriendo durante la intravasación o a morir rápidamente cuando son desconectadas del microambiente tumoral, o a su falta de mecanismos intrínsecos de resistencia a la tensión de corte de fluido, como es el caso de las células epiteliales benignas.

Una explicación emergente a la robustez de las células tumorales viables es que la resistencia a la tensión de corte de fluido es una propiedad biofísica básica del fenotipo de las células que han sufrido una transformación maligna. Las dos características principales que promoverían esta resistencia son: (1) la habilidad para reparar rápidamente el daño en la membrana celular; y (2) la habilidad de rápidamente modular las características de la membrana y el citoesqueleto para prevenir mayores daños. Un efecto inmediato y potencialmente catastrófico de la exposición a una tensión de corte excesiva es una fisura en la membrana celular. Krog y Henry (2018) detectaron evidencias de reparación de la membrana en células tumorales expuestas a pulsos breves de tensión de corte de fluido en el modelo de jeringa y aguja. La presencia de cationes calcio (Ca^{2+}) es crítica para mantener la viabilidad celular, dado que el ingreso de dichos iones a través de la membrana celular es la señal que dispara los eventos de reparación de la membrana. La reparación puede darse a través de parches, si la fisura es grande, o a través de una reducción en la tensión de la membrana para facilitar el cierre de la fisura, si ésta es pequeña.

Otro resultado interesante obtenido por Krog y Henry (2018) indica que las células expuestas a un pulso breve de tensión de corte de fluido ven incrementada su resistencia a la tensión de corte en pulsos subsiguientes. Esto sugiere que las células tumorales pueden modular rápidamente las propiedades de su membrana y citoesqueleto ante una tensión de corte, aumentando su rigidez.

2.2.3. Separación de las células tumorales circulantes de la sangre

El aislamiento de CTC a partir de la sangre es un desafío, dado que éstas son extremadamente raras. Las CTC presentes en la sangre de un paciente con cáncer metastásico se encuentran por debajo de las 10 mil por mL (Lei, 2020); mientras que las células de la sangre están en el orden de 3900 a 6000 millones por mL para los eritrocitos, 4,7 a 10 millones por mL para los leucocitos y 250 a 500 millones por mL para los trombocitos (Williams P. L., 1995). La separación de las CTC de los eritrocitos y los trombocitos puede ser más o menos sencilla por sus diferentes propiedades químicas, físicas y biológicas; sin embargo, los leucocitos comparten varias características con las CTC.

Las tecnologías de aislamiento de CTC se dividen en tres grandes grupos según su principio de acción bioquímico, biofísico o combinado (Bankó, y otros, 2019). Los métodos bioquímicos se basan en la inmunofinidad de las diferentes células, y pueden funcionar por adhesión superficial, enriquecimiento inmunomagnético o por inmunocaptura microfluídica. Los métodos biofísicos se basan en el tamaño y deformabilidad o en la densidad de las diferentes células.

Selección por inmunofinidad

Los dispositivos de selección por inmunofinidad utilizan antígenos específicos que son expresados en la superficie celular de las CTC y no son expresados en otras células. Para la separación

de CTC de otras células sanguíneas, se utilizan anticuerpos específicos que capturan las células según sus marcadores superficiales. Cuando la técnica captura las células tumorales, se clasifica como enriquecimiento positivo; en cambio, se clasifica como negativo cuando se utilizan antígenos expresados en células sanguíneas que no están presentes en CTC (Bankó, y otros, 2019).

Por lo general, para el enriquecimiento positivo se hace uso del marcador epitelial superficial tumoral EpCAM. Por lo tanto, el método permite detectar solamente células tumorales originadas en tejidos epiteliales, como por ejemplo mama, colon, próstata y pulmón. Sin embargo, estudios recientes encontraron células epiteliales no malignas con las mismas características antigénicas que las células tumorales en pacientes con tumores benignos de colon, páncreas y mama. Células de tumores no malignos, es decir, aquellos que no tienen posibilidad de metástasis y, como tales, no constituyen un cáncer, pueden resultar entonces en falsos positivos.

Para el enriquecimiento negativo, en cambio, se hace uso de los marcadores superficiales CD15, CD45 y CD66b, que se encuentran presentes en las células sanguíneas normales, pero no en las CTC. La ventaja de estos métodos es que permiten obtener CTC libres de etiquetas independientemente de su expresión antigénica específica, pero resulta en una menor pureza.

La inmunoafinidad es el mecanismo de acción del dispositivo CellSearch® (Menarini-Silicon Biosystems, S.p.A.; Italia), el único sistema de detección de CTC a partir de sangre aprobado por la FDA para cáncer de mama, de próstata y colorrectal. CellSearch® requiere un tratamiento previo de centrifugado de la sangre, no puede utilizarse con sangre completa, tomada directamente de una extracción.

La ventaja de las técnicas de inmunoafinidad es su alta especificidad. Sin embargo, teniendo en cuenta la heterogeneidad del tumor, esta alta especificidad se convierte en una desventaja, ya que solo se captura una subpoblación de CTC; y no se dispone de información sobre otras subpoblaciones. El uso de múltiples anticuerpos, como por ejemplo de los factores de crecimiento EGFR o el HER2 junto con el EpCAM, permite mejorar este aspecto.

Otra desventaja es la unión anticuerpo/antígeno, que hace difícil la liberación de las CTC capturadas desde la superficie de un dispositivo. Para superar esto, se han propuesto estrategias inmunomagnéticas, que inmovilizan las células en partículas magnéticas de forma reversible, y estrategias microfluídicas, que permiten controlar el flujo de células, mejorando la eficiencia de captura.

Hoy CellSearch® utiliza partículas magnéticas y ha adicionado tinciones posteriores a la clasificación para verificar la ausencia de CD45. Otros dispositivos diseñados a partir de mecanismos inmunomagnéticos o microfluídicos no cuentan con ensayos y datos suficientes que permitan su uso clínico. Actualmente, no existe una técnica óptima para enriquecimiento y/o aislamiento de CTC desde sangre.

Selección por tamaño

Los métodos físicos son independientes de la expresión antigénica en la superficie de la célula, por lo que evitan la imprecisión provocada por la heterogeneidad en anticuerpos expresados en la superficie de las CTC. La selección por tamaño es un método de aislamiento de CTC basado en su tamaño ligeramente mayor respecto de las células sanguíneas, aproximadamente entre 9 y 19 μm . Estas técnicas usualmente utilizan membranas microestructuradas como filtro, aunque también se han reportado otras técnicas basadas en dispositivos microfluídicos (Bankó, y otros, 2019).

La principal ventaja de la selección por tamaño es que resulta en células viables, no modificadas y sin etiquetas a partir de una metodología relativamente simple con alta eficiencia de captura y buen enriquecimiento. Esto permite que las células obtenidas sean utilizadas en métodos subsiguientes, tales como la secuenciación para mejorar el análisis detallado de cada tipo de cáncer específico y la progresión de la enfermedad; o bien que sean cultivadas en el mismo dispositivo o extraídas por flujo inverso. Además, ocupan un tiempo mucho menor para el enriquecimiento y tienen un menor costo que las opciones bioquímicas.

Un desafío para la validación primaria de un método de selección de CTC por tamaño utilizando líneas celulares en cultivo es la diferencia de tamaños entre las CTC y las líneas celulares

tumorales. Para la evaluación de técnicas de filtrado se recomienda la utilización de líneas celulares con un tamaño de 11 a 13 μm de mediana para superar este problema (Bankó, y otros, 2019).

En cuanto a la utilización de membranas microestructuradas para el enriquecimiento de CTC por tamaño, lo que constituye el caso de estudio del presente trabajo, el mayor desafío es la interferencia con los leucocitos, que tienen un tamaño comparable a las CTC y pueden obturar el filtro. Además, al observar los resultados del filtrado en el microscopio de fluorescencia, éstos crean un ruido de fondo que puede provocar falsos positivos. Una manera de superar, o al menos disminuir, este problema es haciendo uso de la deformabilidad diferencial de las CTC frente a los leucocitos sanos. Estudios recientes parecen indicar que las células tumorales ostentan una deformabilidad hasta 1,8 veces menor que la de los leucocitos sanos (Shaw Bagnall, y otros, 2015). Además, cuanto mayor es la masa hidrostática de la célula, menor es su deformabilidad. Si bien hay evidencia de la existencia de CTC de deformabilidad comparable a la de las células sanguíneas, la presencia de éstas en la sangre no excluye la de otras CTC más rígidas, que podrían separarse por filtrado incluso teniendo tamaños similares, ajustando la velocidad de deformación de modo de permitir la deformación de las células sanguíneas y no la de estas CTC más rígidas.

Selección por densidad

El principal método de selección por densidad es la centrifugación, que hace uso de la densidad específica de los eritrocitos, los leucocitos y las CTC. Una alternativa disponible comercialmente es el OncoQuick[®] (Greiner Bio-One; Greiner Group AG; Austria), que hace uso de la selección por densidad en combinación con la selección por tamaño, al adicionar una barrera porosa a un tubo de centrifuga. Esto permite que, durante la centrifugación, los eritrocitos y algunos leucocitos pasen a través del filtro y sean recogidos en un medio de separación, mientras que las CTC quedarían retenidas, junto con los trombocitos, en la interfaz entre el medio de separación y el plasma. Otros enfoques de selección por densidad involucran dispositivos microfluídicos con canales en espiral que hacen uso de la fuerza centrífuga.

2.3. El linfoma de Hodgkin

En vistas de la colaboración con el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, se utilizó en este trabajo una línea celular de linfoma de Hodgkin clásico como modelo para la validación primaria del dispositivo de filtrado de CTC en sangre.

Los linfomas son cánceres iniciados en los linfocitos. Existen dos tipos: linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, que provienen de diferentes tipos de células y se comportan, se propagan y responden al tratamiento de manera diferente. El linfoma de Hodgkin puede iniciarse en cualquier porción de tejido linfoide, incluyendo ganglios y vasos linfáticos, bazo, médula ósea, timo, amígdalas, adenoides y el tracto digestivo; siendo más común su iniciación en los ganglios linfáticos de la parte superior del cuerpo humano. Luego de iniciarse, suele propagarse a través de la circulación linfática entre ganglios, y rara vez invade el sistema cardiovascular y otras partes del cuerpo (ACS, 2023b).

El linfoma de Hodgkin se divide, a su vez, en Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares y otras cuatro categorías que se engloban bajo el nombre de Hodgkin clásico (esclerosis nodular, celularidad mixta, empobrecido en linfocitos y enriquecido en linfocitos). El linfoma de Hodgkin clásico representa cerca del 95% de los casos de linfoma de Hodgkin. Las células tumorales del linfoma de Hodgkin clásico se denominan células de Reed-Sternberg, y son un tipo anormal de linfocito, caracterizadas por su gran tamaño, hasta 10 veces el tamaño de un linfocito normal, y la posesión de al menos dos nucleolos en lóbulos nucleares separados o en más de un núcleo (Aggarwal & Limaiem, 2022). En el caso del linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares, las células tumorales se denominan células *popcorn* (pochoclo) o también células linfocíticas e histiocíticas, tratándose de una variante de las células de Reed-Sternberg. Se muestra una micrografía del linfoma de Hodgkin en la que se observan células de Reed-Sternberg en la Figura 7.

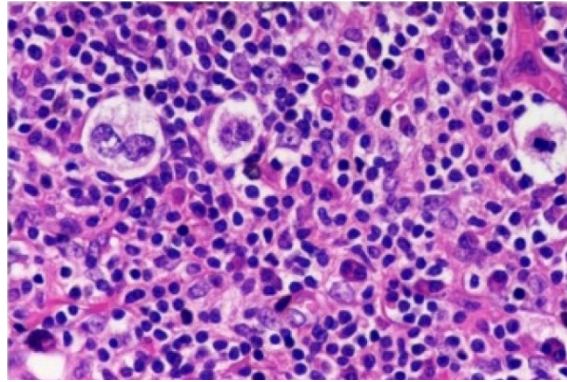


Figura 7. Micrografía a 40× representativa del linfoma de Hodgkin, donde se observan las células de Reed-Sternberg. La tinción hematoxilina-eosina permite observar en tonos azul y violáceo los núcleos celulares y otras estructuras ácidas, y en tonos rosados sustancias citoplasmáticas y extracelulares y otras estructuras alcalinas.

Nota. Tomado de “Hodgkin lymphoma: A special microenvironment”, por G. Opinto y otros, 2021, *Journal of Clinical Medicine*, 10.

El mecanismo exacto por el cual las células de Reed-Sternberg contribuyen al linfoma de Hodgkin clásico aún no se comprende exactamente, pero se cree que secretan proteínas y otras moléculas de señalización que alteran el microambiente tumoral y suprimen la respuesta inmunitaria (Opinto, y otros, 2021).

La presencia de células de Reed-Sternberg es una condición necesaria para el diagnóstico del linfoma de Hodgkin clásico. Dichas células se identifican a través de una biopsia de los ganglios linfáticos, y su presencia se confirma mediante análisis inmunohistoquímico. Sin embargo, no es una condición suficiente, dado que las células de Reed-Sternberg también pueden encontrarse en la linfadenopatía reactiva y, muy raramente, en el linfoma anaplásico de células grandes, un tipo muy raro de linfoma no Hodgkin.

2.3.1. Aislamiento de las células de Reed-Sternberg

El estudio de las células de Reed-Sternberg es esencial para comprender mejor la patogénesis del linfoma de Hodgkin y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento. Las células de Reed-Sternberg representan alrededor del 1% del tejido tumoral, mientras que la mayoría de las células en el tejido incluyen linfocitos, eosinófilos y monocitos (Aggarwal & Limaïem, 2022). Esta escasez de células malignas dificulta cualquier análisis profundo y moderno de las células de Reed-Sternberg. Una población pura, o al menos enriquecida, de células de Reed-Sternberg puede ayudar a aliviar este problema y permitiría estudios más fiables.

Se encuentran en bibliografía casos de aislamiento de células de Reed-Sternberg por técnicas de análisis unicelular. El Instituto de Genética y el Departamento de Patología de la Universidad de Colonia, Alemania, ha logrado aislar células de Reed-Sternberg por aspiración con una micropipeta montada en un micromanipulador hidráulico a partir de secciones inmunoteñidas de tejidos linfoides congelados, de entre 5 y 10 µm de espesor, obtenidos de biopsias de pacientes enfermos con linfoma de Hodgkin (Küppers, y otros, 1994; Kanzler, y otros, 1996; Kanzler, Küppers, Hansmann, & Rajewsky, 1996; Braeuninger, y otros, 1997).

Roth y colaboradores (1994) hicieron lo propio, pero con células en suspensión en lugar de un tejido. Para ello, diseccionaron los tejidos de biopsia en pequeños trozos con agujas estériles, suspendieron las células en PBS y aislaron las células de Reed-Sternberg viables por centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll Hypaque) durante 30 min junto con una fracción de células mononucleares. Después de la fijación en una solución de paraformaldehído 3% m/V en PBS, citocentrifugaron la suspensión celular en un portaobjetos de vidrio. Identificaron las células de Reed-Sternberg utilizando criterios morfológicos (tamaño, nucleolos prominentes, múltiples núcleos) así como inmunotinción. Por último, recogieron las células de Reed-Sternberg individuales con capilares de vidrio utilizando un micromanipulador.

Fromm, Kussick y Wood (2006), por otro lado, lograron aislar las células de Reed-Sternberg a partir de ganglios linfáticos obtenidos de muestras clínicas por citometría de flujo, a través de un procedimiento denominado clasificación celular activada por fluorescencia o FACS. El método separa las células en función de sus parámetros morfológicos y la expresión de múltiples proteínas, permitiendo la clasificación celular multiparamétrica. Reichel y colaboradores (2014) hicieron lo propio con suspensiones celulares producidas a partir de biopsias clínicas, obteniendo una pureza media de 75% de células de Reed-Sternberg. En ambos trabajos se utilizó un cóctel de anticuerpos para disociar los agregados celulares que se producen entre los linfocitos y las células de Reed-Sternberg.

2.4. Biomateriales y citocompatibilidad

Cualquier dispositivo destinado al análisis clínico o a una aplicación en clasificación celular se enfrenta a un desafío fundamental: garantizar la preservación de la viabilidad celular y permitir un análisis posterior preciso y útil. En este sentido, la selección de biomateriales adecuados para la construcción del dispositivo se convierte en un factor crucial. En este caso, un material citocompatible es esencial para garantizar que las CTC y las células de Reed-Sternberg no sufran daños durante el proceso de captura y manipulación o luego de éste.

Un biomaterial es, por definición, una sustancia no farmacológica adecuada para su inclusión en sistemas que aumentan o reemplazan la función de los tejidos u órganos corporales. Estos materiales son capaces de estar en contacto con fluidos y tejidos corporales durante períodos prolongados de tiempo, provocando poca, si acaso alguna, reacción adversa. (Heness & Ben-Nissan, 2004).

Ningún material extraño colocado en contacto con células vivas es completamente compatible. Las únicas sustancias completamente biocompatibles son las fabricadas por el propio organismo y cualquier otra sustancia que sea reconocida como extraña, inicia algún tipo de reacción. Hench (1980) señala que los tejidos vivos en contacto con un material pueden reaccionar de cuatro maneras diferentes:

1. Tóxico. Produce la necrosis de los tejidos circundantes (p. ej. plomo, cobre). No son aptos para su implantación ni para el contacto con los tejidos vivos; no se trata de biomateriales.
2. Biorreabsorbible. El material es no tóxico y soluble, se absorbe y es reemplazado lentamente por tejido vivo (p. ej. yeso, fosfato tricálcico, fosfato trisódico, copolímero ácido poliláctico-ácido poliglicólico, óxido de calcio, carbonato de calcio).
3. Bioinerte. El material es no tóxico y no soluble, una vez colocado en el cuerpo humano, tiene una interacción mínima con el tejido que lo rodea; generalmente se forma alrededor de éste una cápsula fibrosa de espesor variable (p. ej. alúmina, titanio, zirconia, acero inoxidable, polietileno de ultra alto peso molecular).
4. Bioactivo. El material es no tóxico y activo, interactúa con el tejido circundante, formando una unión química en la interfaz. La bioactividad puede ser en todo el volumen (p. ej. hidroxiapatita sintética, vitrocerámica A-W) o bien superficial (p. ej. Bioglass®).

Las principales variables del material que influyen en la respuesta biológica del huésped son: composición química (en volumen y superficial), gradientes químicos, microestructura, morfología, cristalinidad y cristalografía, constantes elásticas, contenido de agua, equilibrio hidrofóbico-hidrofílico, porosidad, movilidad molecular superficial, topografía de la superficie, energía superficial, propiedades eléctricas o electrónicas de la superficie, toxicidad de los productos de degradación, presencia de lixiviables, toxicidad de los residuos de desgaste (Williams D. F., 2008).

Ahora bien, la respuesta a la interacción con un material específico varía de un modo de aplicación a otro. Por lo tanto, la biocompatibilidad no solo depende de las características del material, sino que también debe estar definida por la situación en la que se lo utiliza. Cualquiera que sea la función o el propósito requerido, el dispositivo y, por lo tanto, el material de su construcción no deberán producir ningún efecto adverso significativo.

La citocompatibilidad es un caso particular de biocompatibilidad. Mientras que la citotoxicidad involucra criterios negativos tales como alteraciones celulares, muerte celular o

crecimiento obstaculizado; la citocompatibilidad es un término más vago, pero sugiere criterios positivos. Un material se considerará citocompatible si tanto la estructura como las funciones de las células en contacto directo con él permanecen inalteradas, es decir, cuando no es citotóxico. Las células expuestas a una sustancia citotóxica pueden experimentar: necrosis (muerte celular descontrolada), apoptosis (muerte celular programada), autofagia o simplemente dejar de crecer y dividirse activamente, disminuyendo la proliferación celular (Termo Fisher Scientific, 2023).

2.4.1. Ensayos de citotoxicidad

Existen diferentes enfoques para abordar el tema de la citotoxicidad de una sustancia. Los ensayos de citotoxicidad miden la habilidad de una sustancia de causar daño o muerte celular. Son ampliamente utilizados en investigación básica y en desarrollo de agentes terapéuticos. Hay dos razones principales por las que se estudia la citotoxicidad: o se desea que mueran células específicas y, por lo tanto, se busca una sustancia o condición adecuada; o bien se desea excluir la citotoxicidad en células específicas (Krumm, 2018).

Por ejemplo, la citotoxicidad es deseada en el tratamiento del cáncer, donde el objetivo principal es la destrucción selectiva de las células tumorales. La quimioterapia convencional tiene como objetivo dañar a la célula cancerosa e impulsarla a la apoptosis en lugar de a la replicación. Evaluar la citotoxicidad permite encontrar agentes anticancerígenos y comparar *in vitro* agentes o condiciones destinados a la terapia del cáncer.

Por el contrario, la mayoría de los medicamentos no están destinados a ser citotóxicos, ya que esto podría tener un impacto en todo el organismo. En particular, se ensaya la citocompatibilidad de nuevos candidatos a fármacos para determinar si dañan las células de órganos vitales y detectar posibles efectos adversos en etapas tempranas del desarrollo de medicamentos.

Los ensayos de citotoxicidad propiamente dichos permiten medir el daño celular utilizando un método de detección basado en colorimetría o fluorescencia para medir el nivel de una enzima, tal como LDH o G6PD, que se filtra a través de la membrana celular a medida que ésta va perdiendo su integridad por necrosis o en las últimas etapas de la apoptosis. Cuanto mayor sea la cantidad de enzima filtrada, más cromófora o fluorescente se vuelve la muestra y más citotóxica es la sustancia o condición probada (Termo Fisher Scientific, 2023).

Alternativamente, los ensayos de viabilidad celular permiten evaluar la proliferación y la viabilidad celular utilizando el potencial redox en las células activas metabólicamente para convertir un reactivo basado en una sal de tetrazolio a un producto formazán coloreado. Tal es el caso de los ensayos MTT y XTT. Cuanto mayor sea la actividad metabólica, más cromófora se vuelve la muestra y menos citotóxica o más citocompatible es la sustancia o condición probada.

2.5. Técnicas de microfabricación

El término microfabricación se refiere a la fabricación de dispositivos con al menos una de sus dimensiones en el rango micrométrico. Las técnicas utilizadas para la microfabricación son variadas. Algunas han sido adaptadas del campo de los semiconductores y los circuitos integrados, mientras que otras se han desarrollado específicamente para la fabricación de MEMS. La microfabricación consiste en la utilización de estas técnicas de forma secuencial para producir una estructura deseada (Madou, 2012).

Usualmente, el paso inicial de un proceso de microfabricación es la litografía, que transfiere un patrón deseado a un sustrato. Luego se utilizan técnicas sustractivas, que destruyen la cohesión entre partículas, y/o aditivas, que crean cohesión entre partículas, para remover o agregar material a la pieza de trabajo o al dispositivo bajo construcción, de forma selectiva. A continuación, se hará una breve introducción a las técnicas de microfabricación, con especial énfasis en aquellas disponibles en las facilidades del DMNT y utilizadas en este trabajo.

2.5.1. Litografía

Los procesos de microfabricación suelen comenzar con litografía, una técnica utilizada para transferir copias de un patrón maestro a la superficie de un material sólido, como ser una oblea de silicio. En la industria, la transferencia de patrones se hace casi exclusivamente por fotolitografía, que hace uso para ello de la radiación UV. Otros tipos de litografía utilizan rayos X, haces electrónicos o haces iónicos. Todos estos métodos logran una precisión de impresión submicrométrica (Madou, 2012).

Fotolitografía

La fotolitografía es un proceso de conformado de fotorresina, un polímero viscoso y fotosensible. Si bien existen variaciones y diferentes equipos y metodologías, usualmente el proceso es como se indica a continuación. Primero se recubre un sustrato por centrifugado (*spin coating*) con una capa de fotorresina, cuyo espesor queda definido por su viscosidad y por la velocidad de giro. Luego se efectúa un tratamiento térmico de precocido sobre una placa calefactora (*hot-plate*) para remover el remanente de solvente, relajar las tensiones residuales y promover la adhesión de la fotorresina a la oblea. Posteriormente, debe dejarse la resina protegida de la luz para su rehumidificación. La velocidad de calentamiento y enfriamiento, la temperatura y los tiempos de precocido y de rehumidificación dependen de la naturaleza de la fotorresina y de su espesor.

Luego, se efectúa la exposición selectiva a la radiación UV, usualmente profunda (longitudes de onda de 150 a 300 nm) o cercana (350 a 500 nm), a través de una plantilla que contiene el patrón maestro definido en zonas transparentes y opacas, denominada fotomáscara. La respuesta de la fotorresina a la exposición depende de su tono: si es una resina positiva, las zonas expuestas se degradan por escisión de cadena o reacción fotoquímica y se vuelven más solubles; si es una resina negativa, las zonas expuestas sufren entrecruzamiento o generación fotoquímica y se vuelven menos solubles. La elección de un tipo u otro de resina depende de los requerimientos de cada aplicación, como ser resolución, facilidad de procesamiento, costo y patrón que se debe transferir.

La exposición genera una imagen latente que debe ser revelada. Para ello, el sustrato se enjuaga en un revelador, que remueve las áreas más solubles del polímero, ya sean las expuestas para una resina negativa o las no expuestas para una positiva, dejando un patrón de sustrato desnudo y sustrato recubierto con fotorresina. Se esquematiza el proceso fotolitográfico en la Figura 8.

Por último, pueden efectuarse tratamientos de limpieza (*descumming*) para remover remanentes de resina y de poscoccido en placa calefactora para remover remanentes de solvente, relajar tensiones residuales y promover la adhesión superficial que pudo haber sido debilitada por acción del revelador o por hinchamiento de la resina. Una vez que se tiene el patrón de fotorresina sobre el sustrato, continúan técnicas sustractivas para grabar el patrón en el sustrato o bien técnicas aditivas para depositar el patrón en forma de película delgada o gruesa. Luego, la fotorresina remanente puede removerse con acetona.

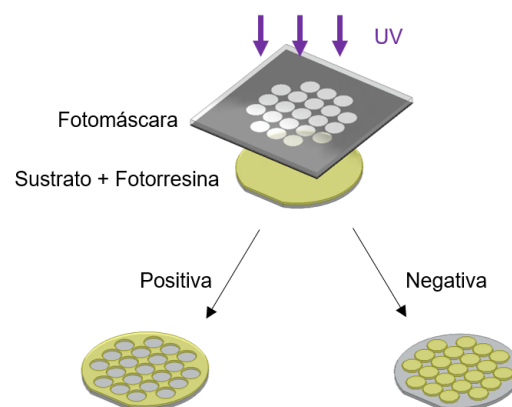


Figura 8. Proceso de fotolitografía. Se expone la fotorresina selectivamente a la luz ultravioleta a través de una fotomáscara. Dependiendo del tipo de fotorresina utilizada, la región expuesta se volverá más soluble (positiva) o menos soluble (negativa), generando el patrón deseado luego del revelado.

Litografía de escritura directa

La litografía de escritura directa, a diferencia de la convencional, no hace uso de una máscara para la transferencia del patrón. En cambio, el patrón es generado por computadora y se graba directamente sobre la fotorresina en el sustrato punto por punto con un haz focalizado, como es el caso de la litografía por láser o la litografía por haz electrónico sin máscara.

2.5.2. Técnicas sustractivas

Una de las técnicas sustractivas más utilizadas para circuitos integrados y MEMS es el grabado (*etching*), es decir, la transferencia de patrones mediante la remoción química y/o física de material de un sustrato, a menudo en un patrón definido por una máscara (Madou, 2012). El grabado puede ser por ataque seco o húmedo. Los parámetros del proceso, en ambos casos, incluyen:

1. Tasa de ataque: velocidad a la que se elimina el material del sustrato.
2. Uniformidad: constancia de la tasa de ataque en todo el sustrato.
3. Rendimiento: cantidad de sustratos u obleas grabadas durante un ciclo de proceso.
4. Control direccional: control de la tasa de ataque en direcciones horizontal y vertical, puede ser isótropo o anisótropo.
5. Selectividad de grabado: controlado por (a) la composición del reactivo de ataque, o (b) la tasa de ataque.

Las técnicas sustractivas de microfabricación se clasifican según su principio de remoción de material en químicas, electroquímicas, térmicas y mecánicas. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.

Químicas	Mecánicas
• Ataque con plasma reactivo • Ataque por vapor de XeF_2 • Ataque por haz iónico reactivo • Ataque iónico reactivo • Ataque iónico reactivo profundo • Ataque químico húmedo • Ataque fotoquímico	• Ataque iónico • Ataque por haz iónico • Mecanizado ultrasónico • Mecanizado por chorro de agua • Mecanizado por chorro abrasivo • Desbaste abrasivo • Haz iónico focalizado • Haz atómico rápido
Electroquímicas	Térmicas
• Desbaste electroquímico • Mecanizado electroquímico • Ataque fotoelectroquímico	• Mecanizado por láser • Mecanizado por haz electrónico • Mecanizado por descarga eléctrica • Mecanizado por arco de plasma

Tabla 1. Algunas técnicas sustractivas de microfabricación clasificadas según el principio por el cual remueven el material del sustrato.

Ataque químico húmedo

El ataque químico húmedo comprende una familia de métodos que involucran la remoción de material a través de la interacción química entre un reactivo y una superficie expuesta. Se utiliza para grabar rasgos isotrópicos en metales, vidrios, polímeros y cerámicos. Para ello, se le aplica al sustrato una máscara producida por litografía. Luego, se sumerge la pieza en un recipiente con el reactivo químico líquido, de ser necesario con calor y agitación, se deja el tiempo suficiente y se retira y enjuaga. El ataque es isotrópico, por lo que las relaciones de aspecto obtenibles son bajas.

Ataque iónico reactivo

El ataque iónico reactivo (*reactive ion etching*) es una técnica sustractiva seca de naturaleza fisicoquímica, dado que combina el bombardeo iónico por plasma y la reacción química con especies neutras para remover material de un sustrato. La sinergia entre efectos físicos y químicos permite obtener anisotropía (direccionalidad) y alta selectividad, resultando en un perfil de ataque vertical (Madou, 2012). El mecanismo de acción es el siguiente: el bombardeo iónico causa daño superficial a un sustrato no reactivo, exponiendo átomos que son más reactivos al gas; y la superficie activada reacciona con las especies neutras del gas, dando productos volátiles que son removidos por arrastre.

2.5.3. Técnicas aditivas

Las técnicas de microfabricación aditivas son técnicas de formado, es decir, crean una forma original a partir de una masa fundida, una solución, una sustancia en fase vapor, plasma o partículas sólidas (polvos). Durante el proceso, se crea cohesión entre partículas individuales. Si bien los métodos de depósito en MEMS son los mismos que en circuitos integrados, especialmente para películas delgadas, los procesos aditivos en la fabricación de MEMS utilizan un rango mucho más amplio de materiales, tanto orgánicos como inorgánicos (Madou, 2012).

Las técnicas aditivas de microfabricación se clasifican según su principio de depósito de material en mecánicas, químicas y térmicas. No debe confundirse con la naturaleza del proceso que genera el material a depositar; la clasificación es sobre la naturaleza del depósito. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2.

Mecánicas	Químicas
• Evaporación térmica • Pulverización catódica o <i>sputtering</i> • Depósito iónico o <i>ion plating</i> • Depósito por haz de clústeres iónicos • Depósito por ablación láser • Epitaxia de haz molecular • Depósito de aerosol	• CVD a presión atmosférica • CVD a baja presión • CVD asistida por plasma • CVD metalorgánica • Depósito de capa atómica • Proceso sol-gel • Recubrimiento con películas orgánicas • Serigrafía de orgánicos • Estereolitografía • Depósito autocatalítico • Depósito electroquímico • Anodizado • Micromoldeo • Moldeo por inyección termorrígida
Térmicas	
• Oxidación térmica • CVD fotoiniciada • CVD por láser • Pirólisis por pulverización • Serigrafía de inorgánicos • Moldeo por inyección termoplástica • Moldeo por compresión	

Tabla 2. Algunas técnicas aditivas de microfabricación clasificadas según el principio por el cual depositan material sobre el sustrato.

Deposito en fase vapor

El depósito en fase vapor es una familia de técnicas aditivas muy usadas, que producen películas delgadas sobre un sustrato. Se divide en dos grandes grupos: depósito físico en fase vapor o PVD, que deposita por impacto en línea de visión directa, y depósito químico en fase vapor o CVD, que deposita por transferencia de masa difusiva-convectiva (Madou, 2012).

El PVD representa una tecnología de recubrimiento versátil, aplicable a casi cualquier combinación de materiales de recubrimiento y sustrato. Utiliza un sólido, un líquido o vapor como fuente de material metálico, cerámico o algunos poliméricos. Posibles sustratos incluyen semiconductores, metales, vidrios y plásticos. Los procesos de PVD consisten en tres pasos

elementales: (1) la síntesis del vapor de recubrimiento a partir de la fuente de material, (2) el transporte del vapor hacia el sustrato, y (3) la condensación del vapor en su superficie. Esto se lleva a cabo en una cámara de vacío, con la cara a recubrir del sustrato hacia abajo para minimizar la contaminación por partículas.

Los procesos de PVD más utilizados son la evaporación térmica y la pulverización catódica (*sputtering*). La evaporación térmica es ampliamente utilizada debido a su simplicidad y capacidad para depositar una amplia gama de materiales; en este proceso, el material a depositar se calienta hasta alcanzar su punto de evaporación, usualmente por efecto Joule (resistencia) o por haz electrónico. Luego, los átomos o moléculas del material evaporado se depositan sobre el sustrato. Por otro lado, el *sputtering*, es un proceso versátil que ofrece un control preciso sobre el espesor del recubrimiento, la composición y las propiedades físicas; utiliza un plasma de gas inerte y un blanco del material a depositar, el cual es pulverizado por el impacto de los iones del plasma. Los átomos o moléculas del blanco luego se depositan sobre el sustrato.

En cambio, durante el CVD, los constituyentes de una fase vapor diluida en un gas inerte reaccionan en una superficie caliente para depositar una película delgada sólida. En la cámara de reacción, los reactivos se adsorben en la superficie caliente del sustrato y los adátomos experimentan una serie de procesos reactivos que resultan en la formación de la película. Los productos gaseosos se desorben y son removidos de la cámara. La química de la superficie, su temperatura y la termodinámica determinan los compuestos depositados; siendo los productos finales más favorables los estequiométricos. Sin embargo, se requiere superar varias barreras de activación, con lo cual se requiere alguna fuente de energía, que suele ser térmica.

El CVD es muy versátil y permite depositar materiales amorfos, policristalinos, epitaxiales y orientados uniaxialmente con un alto grado de pureza, control y bajo costo. Puede ser aplicada a una gran variedad de materiales de recubrimiento y sustrato. El espesor de la película producida por CVD es más uniforme en escalones topográficos que una contraparte producida por PVD. Además, al operar a altas temperaturas, produce películas cristalinas de mejor calidad.

Depósito electroquímico (electroplating)

El depósito electroquímico o *electroplating* es un proceso que permite el crecimiento de una película metálica sobre un sustrato sólido conductor a través de la reducción de cationes del metal de depósito por acción de una corriente eléctrica continua. La reacción involucra un flujo de corriente producido al imponer una diferencia de potencial entre dos electrodos. La reducción de los cationes metálicos en el electrolito para su depósito en el cátodo depende de la diferencia potencial impuesta. Los parámetros de proceso son la composición del electrolito, el pH, la densidad de corriente, la temperatura y el grado de agitación (Madou, 2012).

Las aplicaciones en circuitos integrados y MEMS hacen uso de una máscara fotolitográfica para el crecimiento selectivo de la película por *electroplating*. En un procesamiento típico, la película metálica debe depositarse sobre un sustrato dieléctrico, como ser una oblea de silicio, motivo por el cual debe depositarse primero una capa semilla (*seed layer*) conductora, generalmente por PVD. Para ello, primero se evapora o pulveriza una capa delgada de metal de adhesión, usualmente titanio o cromo, y luego la capa semilla propiamente dicha, que puede ser de oro, platino, cobre, níquel, etc. El requisito clave para la capa semilla es que sea eléctricamente continua y ofrezca una baja resistencia laminar. Luego del depósito de la capa semilla, se forma sobre ésta un patrón de resina por fotolitografía, que hace las veces de molde protector. Por último, se efectúa el contacto eléctrico con la capa semilla y se lleva a cabo el electrodeposición dentro del molde. La capa de metal que crece sobre el sustrato llena los huecos en la configuración de la fotorresina, formando así una estructura metálica complementaria. Siempre que el electrolito pueda mojar y llenar una cavidad, se puede generar un patrón metálico replicando el molde con precisión.

El espesor depositado por *electroplating* se deduce a partir de la ley de Faraday, de la siguiente manera:

$$T = \frac{M}{\delta \cdot n \cdot F} \cdot J \cdot t \cdot \eta$$

donde

T	Espesor [m]	F	Constante de Faraday [C/mol]
M	Masa molecular [kg/mol]	J	Densidad de corriente [A/m ²]
δ	Densidad [kg/m ³]	t	Tiempo [s]
n	Número de oxidación	η	Rendimiento

La masa molecular y la densidad son constantes propias del metal a depositar (como ejemplo, para los metales electrodepositados en este trabajo: 0,0635 kg/mol y 8960 kg/m³ para el cobre y 0,0587 kg/mol y 8908 kg/m³ para el níquel, respectivamente). El número de oxidación y la constante de Faraday son propios de la reacción redox, y también son constantes. El rendimiento del depósito es una variable a determinar que depende de las condiciones del electrolito, como ser temperatura, agitación y grado de electrólisis. Las variables de proceso controlables son la densidad de corriente y el tiempo.

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Fabricación de membranas microporosas

La membrana microporosa es el componente esencial del dispositivo de filtrado. El tamaño de sus poros determinará su utilidad a la hora de efectuar el filtrado. Para el aislamiento de CTC en sangre, la bibliografía indica que el tamaño de poro ideal es de 8 μm (Zheng, y otros, 2007; Bankó, y otros, 2019). Se evaluaron diversas rutas de fabricación buscando una mejora en la biocompatibilidad del dispositivo respecto de las membranas fabricadas previamente al inicio del presente trabajo por el grupo del proyecto FiCelTAr. Las tres rutas elegidas, que fueron llevadas a la práctica simultáneamente, fueron: (1) recubrimiento de una membrana de cobre preexistente por evaporación térmica de titanio; (2) fabricación íntegra de una membrana de níquel por depósito electroquímico; y (3) fabricación íntegra de una membrana de fotorresina por fotolitografía.

En todas las rutas de fabricación, se emplearon obleas de silicio <100> de 4 pulgadas con su óxido nativo.

3.1.1. Procedimientos fotolitográficos

En al menos una etapa de todas las rutas de fabricación de las membranas microporosas se hizo uso de la fotolitografía. Los procedimientos fotolitográficos fueron llevados a cabo en el área limpia clase 1000 del DMNT de la CNEA. Si bien los parámetros de proceso son específicos y serán detallados en cada caso, el procedimiento es el mismo (ver sección 2.5.1).

Primero, se depositó la fotorresina sobre el sustrato por *spin coating*. Luego, se efectuaron los tratamientos de precocido y de rehumidificación. Se llevó el sustrato a un alineador de máscaras (EVG 620 NT; EV Group; Austria) y se efectuó la exposición a luz UV de 365 nm de longitud de onda (*i-line*) a través de una fotomáscara para formar la imagen latente. Por último, se efectuó el revelado para definir el patrón buscado.

Se hizo uso de una fotomáscara de cromo sobre sustrato de vidrio, la cual fue diseñada y fabricada con litografía de escritura directa por láser por el equipo del proyecto FiCelTAr. Permite obtener 21 membranas microporosas a partir de una oblea de 4 pulgadas, contando también con cuatro zonas que permiten el contacto eléctrico para el *electroplating*. Las membranas son discos de 16 mm de diámetro que poseen aproximadamente 120 mil poros de 8, 10 o 12 μm de diámetro, distribuidos de forma ortogonal en un círculo de 10 mm de diámetro.

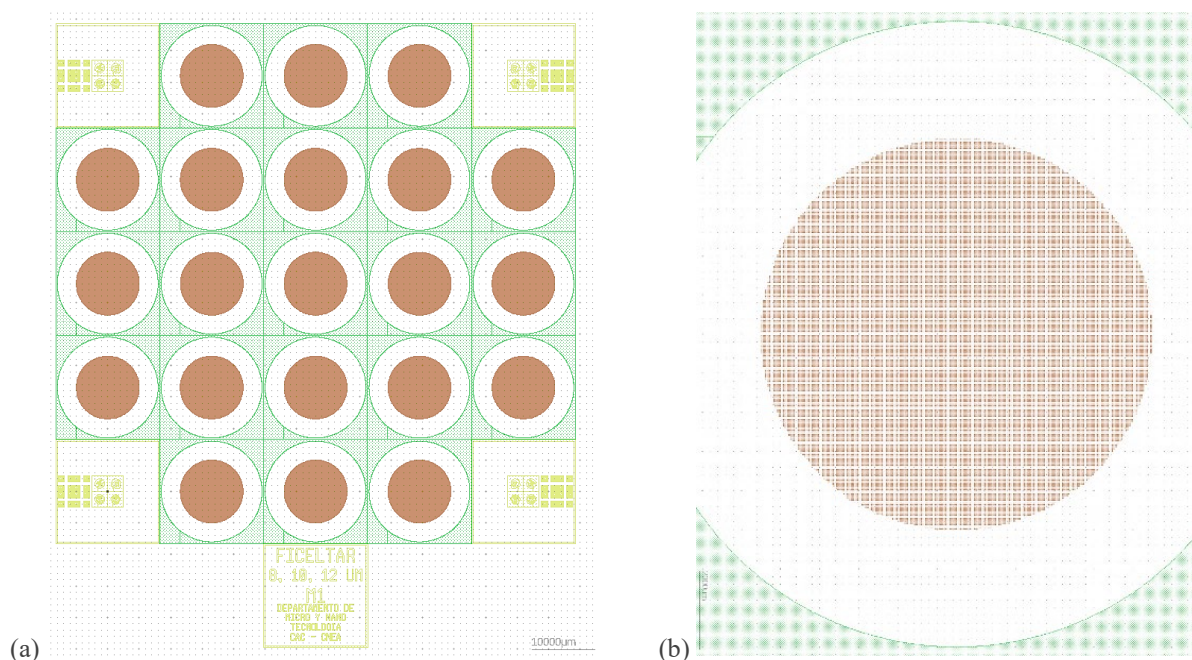


Figura 9. (a) Diseño de la fotomáscara utilizada. (b) Detalle de una membrana.

3.1.2. Membranas de cobre recubiertas con titanio

Las membranas de cobre utilizadas fueron fabricadas por el equipo del proyecto FiCelTar previamente al presente trabajo. El procedimiento de fabricación se explicita en la Figura 10 y fue llevado a cabo en el área limpia del DMNT (clase 1000 para litografía, clase 10000 para los demás procedimientos). Primero, luego de la limpieza del sustrato, se le depositó por *spin coating* una capa de fotorresina de espesor delgado, que funciona como capa de sacrificio, permitiendo desprender los filtros de la oblea a través de su disolución. Luego, se depositó por *magnetron sputtering* una película delgada de titanio para promover la adhesión y una película delgada de cobre que funciona como capa semilla (*seed layer*) para el depósito electroquímico, proveyendo una superficie que conduce la electricidad. Encima de ésta, se fabricó el molde del *electroplating* por fotolitografía de una capa de fotorresina positiva, de espesor mayor al de las membranas. Luego, se hizo crecer una película gruesa de cobre dentro del molde de fotorresina por *electroplating* en un electrolito de sulfato de cobre y ácido sulfúrico, conectando a la pieza como cátodo y a una chapa de cobre como ánodo. Una vez hecho esto, se procedió a la remoción del molde con acetona, al ataque de la capa semilla con ácido acético para el cobre y ácido fluorhídrico para el titanio y a la remoción de la capa de sacrificio con acetona. Las membranas de cobre se desprendieron de la oblea y pudieron ser manipuladas con una pinza.

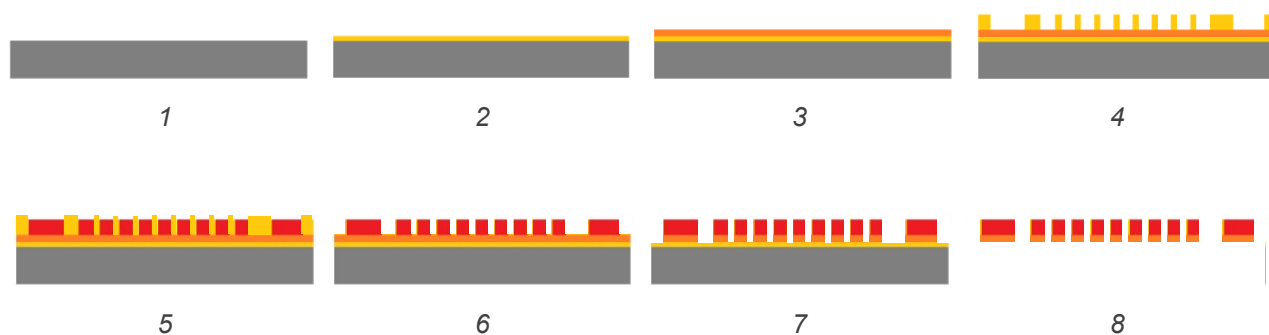


Figura 10. Ruta de fabricación de las membranas microporosas metálicas por depósito electroquímico (*electroplating*). 1 oblea de silicio <100>; 2 *spin coating* de la capa de sacrificio de fotorresina AZ 1518; 3 *sputtering* de la capa semilla de titanio/cobre; 4 fabricación del molde fotolitográfico por *spin coating* de fotorresina AZ 9260, exposición a través de una fotomáscara y revelado; 5 *electroplating* de una película gruesa de cobre; 6 remoción de la fotorresina del molde; 7 ataque químico húmedo de la capa semilla; 8 remoción de la capa de sacrificio y desprendimiento de las membranas.

Nota. Adaptado de “Classic Hodgkin Lymphoma cell enrichment using ‘Dead End’ mechanical filtering”, por M. Felix-Pozzi y otros, 2022, *III Brazil-Argentine Microfluidics Congress; VI Congreso de Microfluidica Argentina*.

Ataque químico de la capa semilla

Si bien la fabricación de las membranas comprende una etapa de ataque químico de la capa semilla de cobre y titanio, ésta no es eliminada por completo y puede incluso obstruir parcial o totalmente algunos poros. El ataque húmedo permite remover solamente las zonas que están expuestas al atacante, por lo que quedan remanentes de capa semilla debajo de las membranas. Una vez desprendidas por la remoción de la capa de sacrificio, se obtiene una membrana que de uno de sus lados aún cuenta con esta capa semilla de cobre y titanio.

Para remover completamente esta capa semilla, se efectuó un ataque químico húmedo en área limpia clase 10000, sobre una mesada de ataque (Amerimade Technology Inc.; Estados Unidos). Primero, se atacó la película de titanio con solución de ácido fluorhídrico 4,45% en agua desionizada, hasta que se viera completamente removido. Luego, se atacó el cobre con solución de ácido acético y peróxido de hidrógeno en agua desionizada, en proporción 1:1:20. Se monitoreó el tiempo de ataque observando los resultados cada cierto intervalo de tiempo en un microscopio óptico, hasta determinar que se había removido la capa semilla.

Recubrimiento de titanio

Dada la citotoxicidad del cobre, se estudió la posibilidad de recubrir las membranas microporosas con películas densas de materiales biocompatibles. La alternativa escogida fue la evaporación térmica de titanio, dado que este metal genera de forma natural una capa de óxido compacta y biocompatible.

Para ello, se montaron dos filtros en el soporte de una evaporadora (Univex 450 B; Oerlikon Leybold Vacuum GmbH; Alemania) y se depositó por evaporación por haz electrónico en vacío una capa de 100 nm de titanio puro sobre una de las caras de los filtros. Se desmontó el soporte y se lo montó nuevamente, para luego depositar el mismo espesor de titanio en la otra cara del filtro. Esto se hizo dos veces: una con membranas que no habían sido sometidas al ataque químico de la capa semilla y otra con membranas a las cuales se les había removido la capa semilla.

3.1.3. Membranas de níquel

El procedimiento para la fabricación de membranas de níquel por *electroplating* es similar al descrito para las membranas de cobre, motivo por el cual aplica el esquema de la Figura 10, con la salvedad de que en el paso 5 se hace crecer una película gruesa de níquel.

Preparación de muestras

Se utilizaron cuartos de oblea obtenidos por el clivaje de obleas de silicio <100> en cuatro fragmentos aproximadamente iguales con una punta de diamante. Se los limpió con isopropanol, luego con agua desionizada y se los secó con nitrógeno. Se les depositó por *spin coating* a 4000 rpm una capa de 1,8 μm de espesor de fotorresina AZ 1518 (AZ Electronic Materials; Merck KGaA; Alemania) como capa de sacrificio. Dicha capa de sacrificio fue precocida a 100 °C por 45 s, rehumidificada durante 4 min y, para mejorar la estabilidad durante las etapas posteriores de la fabricación, se le realizó un endurecimiento (*hard bake*) de 5 min a 115 °C. Posteriormente, se depositó por *magnetron sputtering* (ATC-Orion 5 UHV; AJA International, Inc.; Estados Unidos) una capa de 35 nm de espesor de titanio, para mejorar la adherencia, y otra de 250 nm de espesor de cobre para que actúe de capa semilla, propiciando la conducción eléctrica para que crezca la película de níquel.

Encima de la capa semilla se depositó por *spin coating* a 1200 rpm una capa de 12 μm de espesor de fotorresina AZ 9260 (AZ Electronic Materials; Merck KGaA; Alemania). Esta fotorresina positiva permite obtener el molde del *electroplating* por fotolitografía. Se efectuó un tratamiento térmico de precocido a 110 °C durante 3 min y se dejó la pieza protegida de la luz durante al menos 25 min para su rehumidificación. Se expuso la muestra a la luz UV durante 40 s a través de la fotomáscara de la Figura 9, de modo que en el cuarto de oblea resultan 4 membranas completas, 3 membranas partidas y dos contactos eléctricos. Se efectuó el revelado en una solución de revelador AZ 400 K (AZ Electronic Materials; Merck KGaA; Alemania) 1:4 en agua desionizada, durante un tiempo aproximado de 3,5 min.

Depósito electroquímico (*electroplating*)

Para el *electroplating* se utilizó una solución comercial de sulfato y cloruro de níquel (Nickel S210; GC Tech; Argentina), a la cual se le agregó abrillantador (Aditivo S210-81; GC Tech; Argentina), nivelador (Aditivo S210-55; GC Tech; Argentina) y humectante (Aditivo S210-26; GC Tech; Argentina). Además, se le adicionó ácido bórico como *buffer*. Para fabricar el baño de electroplating se agregó a un vaso de precipitados de 2 L: 1,5 L de solución de sulfato y cloruro de níquel, 40 mL de abrillantador, 80 mL de nivelador, 160 mL de humectante y 26,8 g de ácido bórico. Luego, el vaso de precipitados fue colocado sobre una placa calefactora a 45 °C y con agitación magnética del orden de las 400 rpm.

Como ánodo se utilizó una chapa de níquel de 100 × 100 × 0,5 mm a la cual se le soldó un cable de cobre para conectar a la corriente eléctrica. Como cátodo se conectó el cuarto de oblea de silicio. Para el soporte de los electrodos dentro del electrolito se utilizaron piezas impresas en 3D por

extrusión de filamento polimérico, que permitieron la correcta orientación de los electrodos (paralelos y enfrentados) y una separación entre éstos de 40 mm. El soporte también comprende la conexión eléctrica del cátodo, que inicialmente fue un alambre de cobre revestido pero posteriormente se lo reemplazó por dos chapas de cobre para mejorar la distribución del campo eléctrico. El arreglo experimental utilizado se muestra en la Figura 11. La corriente eléctrica entre electrodos fue impuesta por una fuente de corriente continua (HY3005-3; Quail Electronics, Inc.; Estados Unidos), según la densidad de corriente requerida para el depósito.

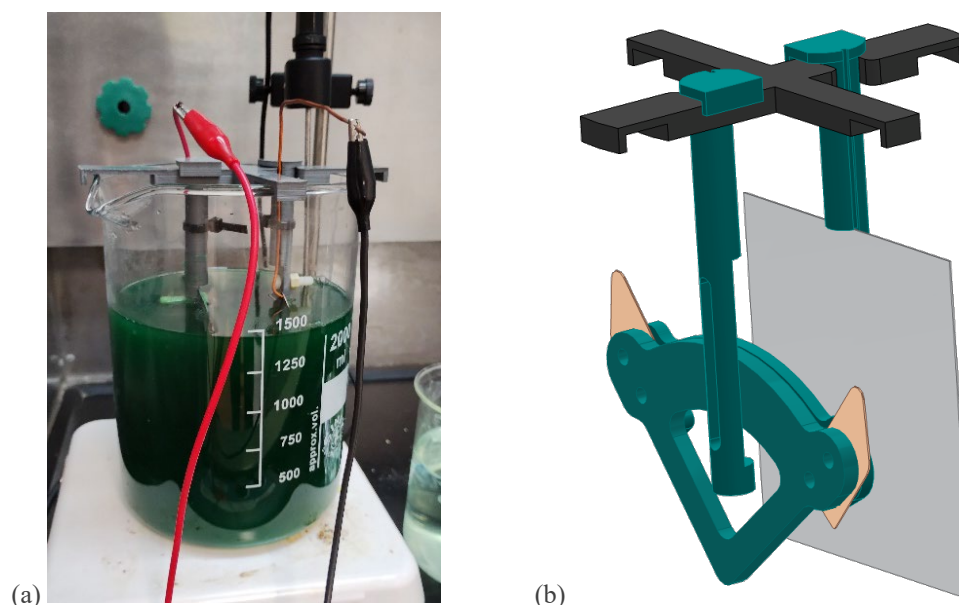


Figura 11. (a) Fotografía del arreglo experimental utilizado para el depósito electroquímico (*electroplating*) de níquel. (b) Modelo del soporte utilizado para el depósito sobre un cuarto de oblea de silicio, con dos contactos eléctricos de cobre.

Para determinar la corriente aplicada en función de la densidad de corriente requerida, se estimó el área expuesta de capa semilla a partir del diseño de la fotomáscara (Figura 9), la cual resultó ser de $0,096 \text{ dm}^2$.

Para determinar el rendimiento del electrolito se prepararon muestras con el procedimiento descrito anteriormente a excepción de la capa de sacrificio. Se efectuó el depósito durante un tiempo y a una densidad de corriente determinados, se removió el molde de fotorresina por inmersión de la muestra consecutivamente en acetona, isopropanol y agua desionizada y se midió el espesor depositado en varios puntos de la muestra por interferometría de barrido vertical con un perfilómetro óptico (Wyko NT1100; Veeco Instruments, Inc.; Estados Unidos). El cociente entre el espesor medido y el espesor teórico de un depósito ideal da como resultado el rendimiento del electrolito, el cual resultó ser de un 50%. Usualmente, al medir por perfilometría óptica, debe tenerse en cuenta el error introducido al medir en superficies de materiales con índices de refracción disímiles. En este caso dicho error fue desestimado al comprobarse que la medición era suficientemente representativa.

El depósito de níquel tiende a agrietarse y quebrarse si la velocidad de depósito no es adecuada. Luego de algunas pruebas, se eligió una densidad de corriente de $0,95 \text{ A/dm}^2$, por lo que se configuró la fuente para entregar 91 mA, y se efectuó el depósito durante 72 min, de modo de obtener un espesor de $7 \text{ }\mu\text{m}$, tal como indica la ecuación presentada en la sección 2.5.3.

Ataque químico y desprendimiento de las membranas

Luego de efectuado el *electroplating* de las membranas de níquel, se removió el molde de fotorresina por inmersión de la muestra consecutivamente en acetona, isopropanol y agua desionizada. El procedimiento no se completó por motivos que se explican en la sección 4.1.2. Sin embargo, a continuación, debió efectuarse un ataque químico húmedo para remover la capa semilla. Primero, solución de ácido acético y peróxido de hidrógeno en agua desionizada, en proporción

1:1:20, para atacar el cobre; y, luego, solución de ácido fluorhídrico 4,45% en agua desionizada, para atacar el titanio. Finalmente, debió hacerse una nueva inmersión en acetona para remover la capa de sacrificio y desprender las membranas de níquel de la oblea.

3.1.4. Membranas de fotorresina

Fotorresina SU-8

La SU-8 es una fotorresina epoxídica negativa, diseñada para aplicaciones permanentes en las que se forma el patrón, se cura y se deja la resina en el dispositivo. La formulación comprende un monómero con 8 grupos epóxido; un solvente, que puede ser γ -butirolactona (familia SU-8 estándar) o ciclopentanona (familias SU-8 2000 y 3000); y hexafluoroantimoniato de triarilsulfonio como fotoiniciador. Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la Figura 12. La biocompatibilidad de esta fotorresina resulta controversial por la presencia de las sales de antimonio; sin embargo, evidencias en bibliografía indican que la resina SU-8 sería citocompatible y que la lixiviación de dichas sales sería mínima y su efecto, comparable al de solución salina común (Nemani, Moodie, Brennick, Su, & Gimi, 2013).

Las fotorresinas SU-8 poseen bajo módulo elástico y alta tensión de fluencia, lo que permite su utilización como dispositivos independientes (*standalone devices*), es decir sin estar adherida a un sustrato. Un ejemplo de esta aplicación es la fabricación de una válvula microfluídica apilando discos de 100 μm de espesor de SU-8 2100 por Nguyen y colaboradores (2003). Sin embargo, al ser un material flexible se requerirá una sección resistente mayor que la de un material metálico para evitar grandes deflexiones, lo que se traduce en un mayor espesor para la membrana microporosa.

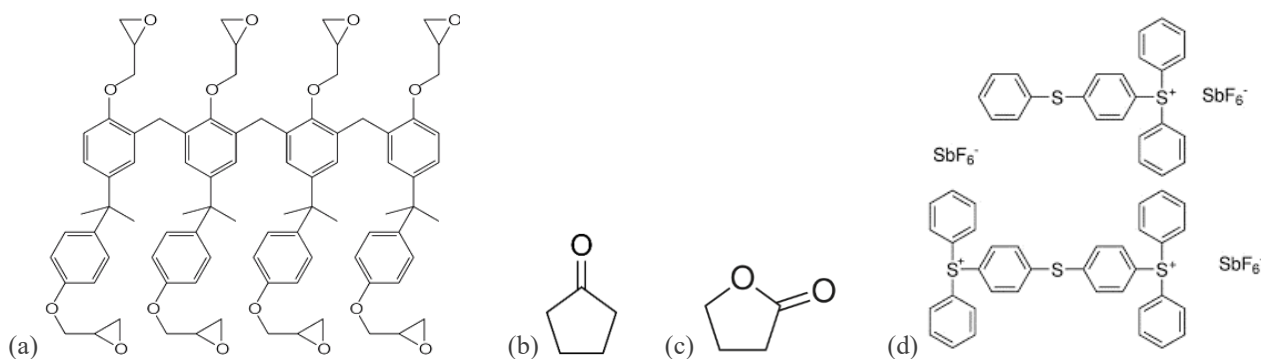


Figura 12. Estructura química de los componentes de la fotorresina SU-8: (a) monómero de SU-8 propiamente dicho; (b) ciclopentanona o (c) γ -butirolactona como solvente; y (d) sales hexafluoroantimoniato de triarilsulfonio como agente fotoiniciador.

Se efectuó una prueba de concepto de la fabricación por fotolitografía de membranas microporosas de fotorresina SU-8 2005 (MicoChem Corp.; Nippon Kayaku Co., Ltd.; Japón), que permite obtener capas de espesores de entre 4 y 7,5 μm aproximadamente. Para ello, primero se tomó una oblea de silicio de 4 pulgadas de diámetro y se depositó sobre ella por *spin coating* a 2000 rpm un espesor de 2,5 μm de fotorresina positiva AZ 1518 como capa de sacrificio. Luego de un precocido de 50 s a 100 $^{\circ}\text{C}$ y una rehumidificación de 5 min, se depositó por *spin coating* a 2500 rpm una capa de 7,5 μm de SU-8 2005, la cual fue precocida a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, expuesta a la luz UV durante 10,5 s a través de la fotomáscara de la Figura 9. Se efectuó un poscoccido a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min y un revelado en lactato de etilo durante 90 segundos. Finalmente, se llevaría a cabo la remoción de la capa de sacrificio en AZ 400K, pero esto no se pudo realizar, como se explica en la sección 4.1.3.

Fotorresina AZ 125nXT

Ante la falta de disponibilidad de fotorresina SU-8 para grandes espesores, se acudió a otra fotorresina que sí cumple este requerimiento como es la resina fenólica AZ 125nXT, pero que no está

diseñada en principio como resina permanente, sino que suele usarse como modelo para moldeo de resinas elastoméricas, principalmente PDMS.

Se efectuaron pruebas de fabricación por fotolitografía de membranas microporosas de fotorresina AZ 125nXT-10A (AZ Electronic Materials; Merck KGaA; Alemania), que permite obtener capas de espesores de entre 30 y 120 μm aproximadamente. Se hicieron tres pruebas, cuyo procedimiento es similar al explicado para la resina SU-8. En dos de los casos, se depositó por *spin coating* a 2000 rpm una capa de sacrificio de 2,5 μm de resina AZ 1518, una con un tratamiento de precocido de 90 s a 110 °C y otro con un endurecimiento (*hard bake*) de 60 s a 160 °C. En el tercer caso, se depositó por *spin coating* a 2400 rpm una capa de sacrificio de 9 μm de resina AZ 9260, con un tratamiento de precocido de 3 min a 110 °C. Posteriormente, se depositó a 2400 rpm una capa de 50 μm de AZ 125nXT-10A, la cual fue precocida por 12 min a 110 °C, expuesta a la luz UV por 177,7 s a través de la fotomáscara de la Figura 9, y revelada en AZ 826 MIF (AZ Electronic Materials; Merck KGaA; Alemania) durante un tiempo estimado de 3 minutos. Por último, se sumergió la oblea en AZ 400K para remover la capa de sacrificio.

3.2. Procedimientos de cultivo celular

El DMNT cuenta con un laboratorio de cultivo celular equipado con una incubadora de CO₂ (Forma Direct Heat 321; Thermo Fisher Scientific, Inc.; Estados Unidos), una cabina de seguridad biológica (Thermo Scientific 1300 Series A2, Class II; Thermo Fisher Scientific, Inc.; Estados Unidos), una centrífuga (Sorvall ST 16R; Thermo Fisher Scientific, Inc.; Estados Unidos) y un microscopio óptico y de fluorescencia (Eclipse TS100F; Nikon Corporation; Japón) con cámara (Micrometrics 891CU; Accu-Scope, Inc.; Estados Unidos).

Los protocolos de cultivo celular seguidos surgen como combinación de la experiencia previa del grupo de trabajo, las indicaciones del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” y el manual de técnicas de cultivo celular de ECACC y Merck (2018).

3.2.1. Línea celular L-1236 y caracterización funcional de la unidad filtrante

Para evaluar la efectividad de la unidad filtrante como dispositivo de clasificación celular se trabajó con la línea celular L-1236 de linfoma de Hodgkin clásico humano, la cual fue proporcionada por el Departamento de Biología Celular del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” y se encontraba al inicio del presente trabajo criopreservada en nitrógeno líquido. Se trata de una línea celular que crece en suspensión.

El medio de cultivo celular utilizado se preparó como se indica a continuación. Por cada 1 L de agua desionizada estéril se disolvió: 10,4 g de medio RPMI 1640 en polvo (Gibco 31800-022; Thermo Fisher Scientific, Inc.; Estados Unidos); 2 g de bicarbonato de sodio (Biopack; Sistemas Analíticos S. A.; Argentina) como *buffer* y 2 mL de gentamicina (Gentapharma; Laboratorio Internacional Argentino S. A.; Argentina) como antibiótico. Se esterilizó la solución por filtrado a través de poros de 0,22 μm de diámetro. Por último, se le agregó FBS estéril (Suermer; Internegocios S. A.; Argentina) en un 20% V/V y se llevó a pH fisiológico con ácido clorhídrico 2 N estéril (medio de cultivo completo).

El mantenimiento del cultivo celular se efectuó en incubadora a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

Descongelamiento de células

Se preparó, primero, un tubo de centrífuga con 10 mL de medio sin suero y se llevó a 37 °C en baño de agua. Se tomó un criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se colocó en un baño de agua a 37 °C hasta su descongelamiento. Se colocó el contenido del criotubo en el tubo de centrífuga con medio de cultivo, se agitó suavemente para homogeneizar y se centrifugó a 1500 rpm (~ 380 g) durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 5 mL de medio de cultivo completo y se resuspendieron las células pipeteando repetidamente. Por último, se colocó en un frasco de cultivo celular T-25 y se incubó en incubadora a 37 °C.

Mantenimiento de células

La actividad celular produce agotamiento del medio de cultivo, lo que se evidencia a través de su acidificación (coloración amarillenta). El medio RPMI 1640 contiene rojo de fenol como indicador, con lo cual el color óptimo del medio es rosa-anaranjado. Un color naranja-amarillento indica la necesidad de renovar el medio de cultivo. Para ello, la suspensión celular se trasvasó de los frascos de cultivo a uno o más tubos de centrifuga, según la cantidad de suspensión celular, y fue centrifugada a 1000 rpm (~ 170 g) durante 5 min. Se removió el sobrenadante y se reemplazó por medio de cultivo completo fresco. Se resuspendieron las células pipeteando repetidamente y se devolvió a los frascos de cultivo, que fueron incubados. Este proceso se efectuó entre 2 y 3 veces por semana.

Una vez a la semana se realizó la cuantificación de la suspensión celular, es decir, la determinación de la concentración de células. Para ello, se utilizó una cámara de Neubauer o hemocitómetro (Boeckel & Co. GmbH & Co. KG; Alemania), que se trata de un portaobjetos con dos zonas ligeramente deprimidas en cuyo fondo se encuentra marcada una cuadrícula de dimensiones conocidas. Se colocan dos gotas de agua en los márgenes de la cámara y se la cubrió con un cubreobjetos, que se adhiere por tensión superficial. Por otro lado, se tomó una alícuota de 50 μL de la suspensión celular y se la diluyó con 50 μL de azul de tripán 0,4%, un pigmento que tiñe las células muertas, pero no las vivas. Se cargaron las zonas deprimidas con 10 μL de suspensión celular cada una y se llevó al microscopio óptico para efectuar el conteo de las células vivas (viables) y las células muertas (no viables) en cada zona de la cámara.

La cuadrícula marcada en cada zona de la cámara de Neubauer cuenta con cuatro cuadrantes de 1 mm de lado, y la distancia entre ésta y el cubreobjetos es de 0,1 mm. Por lo tanto, del promedio de células contadas por cuadrante y considerando el factor de dilución 2 y el volumen de la cámara, puede obtenerse la concentración de células viables y no viables en la suspensión:

$$\text{Células viables } [\text{mL}^{-1}] = \frac{\# \text{ total células vivas}}{\# \text{ cuadrantes}} \cdot 2 \cdot 10.000$$

$$\text{Células no viables } [\text{mL}^{-1}] = \frac{\# \text{ total células muertas}}{\# \text{ cuadrantes}} \cdot 2 \cdot 10.000$$

Luego, la viabilidad puede calcularse como el cociente entre las células viables y el total de células contadas:

$$\text{Viabilidad } [\%] = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células viables} + \text{Células no viables}} \cdot 100\%$$

A partir de la concentración de células viables obtenida, en una operación de cambio de medio de cultivo, para la línea celular L-1236 se ajustó el volumen de medio fresco adicionado en cada renovación, de modo tal que la concentración de células viables del cultivo se mantenga entre 300 y 500 mil células por mL.

Distribución de tamaños celulares

Se llevó a cabo una evaluación de la distribución de tamaños de las células de la línea L-1236 con el objetivo de determinar la reducción de sección transversal a la cual serían sometidas las células durante el filtrado y correlacionarla con la velocidad de deformación o el caudal aplicado; y, eventualmente, definir la necesidad de un rediseño del filtro con un diámetro de poro mayor. Para ello, se tomaron 13 micrografías a 200 $\times$ en diferentes zonas de una botella T-25 con 5 mL de suspensión celular y se midió el diámetro de las células que se encontraron bien definidas en las imágenes, como se muestra en la Figura 13, contabilizando un total de 551 mediciones.

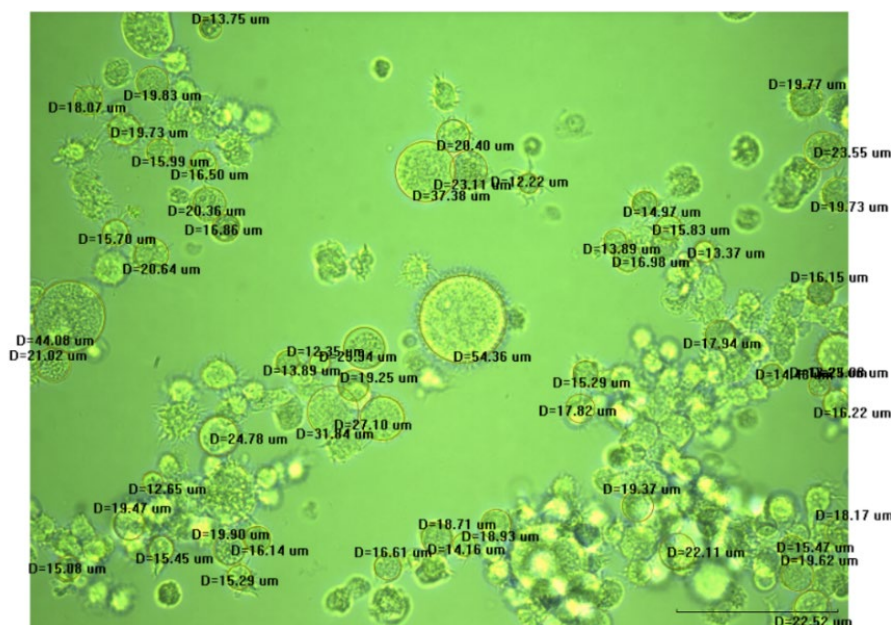


Figura 13. Micrografía a 200× del cultivo de la línea celular L-1236, a la cual se le han superpuesto las mediciones efectuadas de diámetro de célula. Como ésta, se han tomado otras doce micrografías en las que se contabiliza un total de 551 células medidas.

Caracterización funcional de la unidad filtrante

Se efectuó un ensayo de caracterización funcional de la unidad filtrante utilizando una membrana de cobre recubierta con titanio, de 10 µm de diámetro de poro, jeringas de 5 mL y 12 mm de diámetro con pico *Luer-Lok* y una bomba de jeringas (Harvard Apparatus PHD ULTRA; Harvard Bioscience, Inc.; Estados Unidos).

Se llevaron a cabo cuatro filtrados de la línea celular L-1236. Dos de ellos comparando diferentes medios de filtrado a igualdad de caudal: medio de cultivo RPMI sin suero y *buffer* FACS (solución de EDTA 0,5 mM y FBS 1% V/V en PBS libre de Ca^{2+} - Mg^{2+}) a un caudal de 150 µL/min. Esto se hizo para evaluar una posible mejora en el filtrado por acción del EDTA, que rompe los enlaces intercelulares. La elección del caudal para esta comparación estuvo relacionada con la experiencia previa del equipo del proyecto FiCelTar. Luego, se efectuaron dos filtrados más en medio de cultivo RPMI sin suero tomando diferentes caudales, arbitrariamente por encima y por debajo del primer valor: 90 y 190 µL/min, para evaluar el efecto de la velocidad de deformación en el filtrado. Se procedió como se indica a continuación.

1. Se esterilizaron las mordazas, la carcasa roscada y los *O-rings* de la unidad filtrante por calor húmedo en autoclave (Ficoinox SL 9000 L; Bergmann S.A.C.I.; Argentina) a 121 °C durante 15 min.
2. Se colocó la membrana microporosa en una placa de Petri de 60 mm con etanol 70% en agua desionizada para su sanitización. Luego de 15 min, se removió la membrana y se la dejó secar al aire dentro de la cabina de seguridad biológica.
3. Se montó la unidad filtrante, colocando los *O-rings* en las mordazas, ubicando la membrana entre medio de éstos y apretando la carcasa roscada.
4. Se efectuó la cuantificación del cultivo celular, tal como se indicó anteriormente, y se diluyó de modo tal de obtener una concentración de alrededor de 300 mil células por mL.
5. Se tomaron 500 µL de dicha suspensión celular y se colocaron en una placa de Petri de 60 mm de diámetro. Se adicionó 2,5 mL de medio de filtrado (ya sea RPMI sin suero o *buffer* FACS) y se resuspendió pipeteando repetidamente, obteniendo así 3 mL de suspensión celular a una concentración de 50 mil células por mL.
6. Se tomó la suspensión celular aspirando con una jeringa, que actuó de reservorio de la suspensión celular. Dicha jeringa se roscó a la mordaza inferior.

7. Se removió el émbolo de otra jeringa y se la roscó a la mordaza superior, para que actúe como receptora de la suspensión celular filtrada.
8. Se colocó el dispositivo a través de la jeringa reservorio en la bomba de jeringas. Se programó la bomba de jeringas para que inyecte el caudal definido (90, 150 o 190 $\mu\text{L}/\text{min}$ dependiendo el caso) y se dio inicio al filtrado de la suspensión celular.
9. Una vez finalizado el filtrado, se quitó el dispositivo de la bomba de jeringas y se vertió el contenido de la jeringa receptora en una placa de Petri de 60 mm, rotulada como “suspensión filtrada”.
10. Se removieron ambas jeringas de sus respectivas mordazas y se descartaron.
11. Para recuperar las células retenidas en el filtro, se cargó una nueva jeringa con 3 mL de medio completo fresco y se la roscó a la mordaza superior.
12. Se removió el émbolo de otra jeringa y se la roscó a la mordaza inferior, para que actúe como receptora de las células retenidas.
13. Se colocó el dispositivo a través de la jeringa con medio fresco en la bomba de jeringas. Se programó la bomba de jeringas para que inyecte un caudal de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ y se dio inicio a la recuperación de las células retenidas.
14. Una vez finalizada la recuperación, se quitó el dispositivo de la bomba de jeringas y se vertió el contenido de la jeringa receptora en una placa de Petri de 60 mm, rotulada como “recuperación”.
15. Se removieron ambas jeringas de sus respectivas mordazas y se descartaron.
16. Se observaron ambas placas de Petri en el microscopio óptico.

3.2.2. Línea celular MCF-7 y citocompatibilidad de los materiales utilizados

Para evaluar la citocompatibilidad de los materiales utilizados para la unidad filtrante se trabajó con la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano, la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Nanomedicina de la CNEA en dos placas de Petri de 100 mm. Se trata de una línea celular que crece adherida en monocapa, lo que simplifica el procedimiento del ensayo de citocompatibilidad efectuado, al evitar pasos adicionales de centrifugado de placas.

El medio de cultivo celular utilizado se preparó como se indica a continuación. Por cada 1 L de agua desionizada estéril se disolvió: 6,7 g de medio DMEM en polvo (Gibco 12100-046; Termo Fisher Scientific, Inc.; Estados Unidos); 5,3 g de mezcla de nutrientes F-12 de Ham (Gibco 21700-075; Termo Fisher Scientific, Inc.; Estados Unidos); 2,44 g de bicarbonato de sodio (Biopack; Sistemas Analíticos S. A.; Argentina) como *buffer* y 2 mL de gentamicina (Gentapharma; Laboratorio Internacional Argentino S. A.; Argentina) como antibiótico. Se esterilizó la solución por filtrado a través de poros de 0,22 μm de diámetro. Por último, se le agregó FBS estéril (Suermer; Internegocios S. A.; Argentina) en un 10% V/V y se llevó a pH fisiológico con ácido clorhídrico 2 N estéril (medio de cultivo completo).

El mantenimiento del cultivo celular se efectuó en incubadora a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO_2 .

Mantenimiento de células

En este caso, el proceso de renovación del medio celular por agotamiento no requiere pasos de centrifugado adicionales, pues las células permanecen adheridas a la placa de cultivo. El cambio de medio celular se efectuó a diario.

Ahora bien, cuando la confluencia, es decir, la relación entre área cubierta por células y área total de la placa de cultivo, superó el 70% aproximadamente, debió efectuarse una operación de repique. Para ello, se removió el medio de cultivo por pipeteo, se lavó con PBS libre de Ca^{2+} – Mg^{2+} y se desprendieron las células de la placa adicionando solución de tripsina 0,1% V/V y EDTA 1 mM en PBS libre de iones Ca^{2+} – Mg^{2+} . La tripsina rompe los enlaces entre las células y el plástico, mientras que el EDTA rompe los enlaces intercelulares. Luego de esto se adicionó medio de cultivo con suero, de modo que el volumen de SFB igualase o superase al de solución de tripsina/EDTA, para

neutralizarla. En esta instancia, se obtuvo una suspensión celular que pudo ser fraccionada y trasvasada a otras placas; y que también permitió efectuar operaciones de cuantificación con un hemocitómetro, como se explicó anteriormente para la línea celular L-1236.

Ensayo de citotoxicidad

Para la evaluación de la citotoxicidad de los diferentes materiales utilizados se efectuaron ensayos MTT, que permitieron medir la actividad metabólica celular luego de la exposición a determinados materiales. El MTT es una sal de tetrazolio amarilla, cuya estructura química se observa en la Figura 14a. Al interactuar con un cultivo celular, las enzimas deshidrogenasas y reductasas de las células viables reducen el tetrazolio a su correspondiente formazán, de color azul-violáceo e insoluble en agua, cuya estructura química se observa en la Figura 14b.

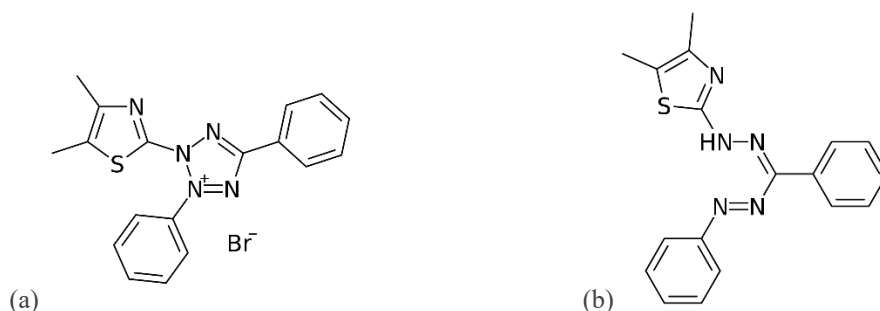


Figura 14. Estructuras químicas del MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (a) y su correspondiente formazán (b).

Los materiales ensayados fueron: (1) porción de membrana de cobre, (2) porción de membrana de cobre recubierta con titanio, (3) fragmentos de níquel producidos por *electroplating*, (4) chapa de aluminio (ver Figura 15). La cantidad utilizada de cada material se eligió en concordancia con la relación entre área expuesta del material y volumen de medio encontradas durante una operación de filtrado. Se expuso el cultivo celular a los diferentes materiales y se midió la absorbancia a uno y cinco días (24 y 120 h) desde la exposición, procediendo como se indica a continuación.

1. Se sembraron dos placas P24 con cultivo de la línea celular MCF-7 a razón de 15.000 células con 1 mL de medio celular completo por pocillo. Se las incubó a 37 °C el tiempo suficiente para asegurar la formación de una monocapa de células adherida al fondo de cada pocillo (aprox. 24 horas).
2. Se colocaron los materiales en 4 placas de Petri de 60 mm con etanol 70% en agua desionizada para su sanitización. Luego de 15 min, se removieron los materiales y se los dejó secar al aire dentro de la cabina de seguridad biológica.
3. Se colocaron los materiales en 4 placas de Petri de 100 mm con 15 mL de medio de cultivo DMEM/F-12 sin FBS. Se dejó las placas a temperatura ambiente sobre un agitador orbital (OS-100; Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd.; China) a 50 rpm durante 3,5 horas, para generar un medio de cultivo condicionado por la interacción con el material.
4. Se tomó el medio de cultivo condicionado de las placas de Petri y se lo almacenó en tubos de centrifuga.
5. Se removió el medio de cultivo de cada pocillo de las placas P24 y se lo reemplazó con 500 µL de medio condicionado, a razón de 5 pocillos para cada material y 4 para control (con medio de cultivo no expuesto a cualquiera de los materiales). Se lo dejó 3,5 horas a temperatura ambiente, se removió el medio condicionado y se lo reemplazó con medio completo fresco. Se incubaron las placas a 37 °C.
6. Luego de 24 h, se tomó una de las placas P24, se removió el medio de cultivo y se agregó a cada pocillo 500 µL de solución de MTT (Sigma-Aldrich; Merck KGaA; Alemania) 4 mg/mL en PBS libre de Ca^{2+} - Mg^{2+} y medio DMEM/F-12 1:9. Posteriormente, se

incubó a 37 °C durante 3 horas. Se efectuó el mismo procedimiento en 4 pocillos de otra placa P24 sin células para control del método. El MTT es sensible a la luz, con lo cual se trabajó en la oscuridad o bien con cubiertas de papel aluminio.

7. Se removió el medio de cultivo con MTT de cada pocillo, se lavó con PBS libre de Ca^{2+} – Mg^{2+} y se adicionó 700 μL de DMSO a cada pocillo. Se agitó la placa en el agitador orbital a 50 rpm durante 15 minutos para solubilizar los cristales de formazán.
8. Se transfirieron 3 alícuotas de 200 μL del contenido de cada pocillo a sendos pocillos de una placa P96. Con un lector de placas (DTX 880 Multimode Detector; Beckman Coulter, Inc.; Estados Unidos), se midió la absorbancia de cada pocillo a 595 nm.
9. Luego de 120 h de la exposición de las células al medio condicionado, se repitieron los pasos 6 a 8 con la otra placa P24.

Cuanto mayor sea la concentración de formazán, más intenso será el color y, por lo tanto, mayor será la absorbancia. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo, con lo cual puede determinarse la viabilidad de cada suspensión. Comparando dicha viabilidad con aquella de la suspensión celular control, en las dos mediciones efectuadas a tiempos diferentes, puede estimarse la citocompatibilidad de los materiales ensayados.



Figura 15. Muestras utilizadas para el condicionamiento de medio de cultivo en el ensayo de citocompatibilidad en placas de Petri de 100 mm de diámetro, de izquierda a derecha: aluminio, cobre, cobre/titanio y níquel.

3.3. Rediseño de la unidad filtrante

En conjunto con el equipo del proyecto FiCelTar se hizo un rediseño de la unidad filtrante para mejorar su eficiencia y su biocompatibilidad. Se plantearon dos propuestas: (1) orientada a investigación y desarrollo, principalmente en clasificación celular, que mantiene el sistema de filtrado con jeringas y una microbomba, pero contiene una cámara de filtrado polimérica prácticamente inerte a la suspensión celular; y (2) orientada a diagnóstico clínico de CTC en sangre, que propone un sistema de filtrado alternativo por centrifugación, también conteniendo una cámara polimérica citocompatible.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fabricación de membranas microporosas

4.1.1. Membranas de cobre recubiertas con titanio

En la Figura 16 se observan fotografías tomadas posteriormente al proceso de recubrimiento de las membranas con titanio por evaporación por haz electrónico. A simple vista, el recubrimiento parece uniforme. Sin embargo, observándolo al microscopio óptico se detectan sitios en los que el cobre no ha sido recubierto o bien se ha desprendido la película de titanio, como se observa en la Figura 17. Dichas fallas en el recubrimiento se concentran particularmente en la cara de la capa semilla y no tanto en la cara del *electroplating*.

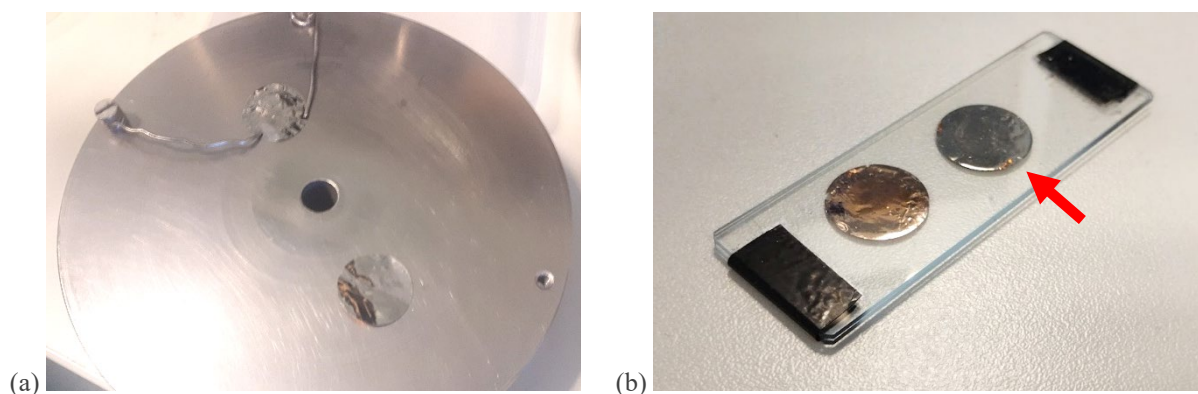


Figura 16. (a) Fotografía de dos membranas de cobre en el montaje de la evaporadora, luego de haber sido recubiertas con una película de titanio de 100 nm de espesor. (b) Fotografía de dos membranas de cobre, una sin recubrir y otra recubierta de titanio (señalada con una flecha).

Se efectuó un análisis por microscopía electrónica de barrido y haz de iones focalizados (Quanta 3D FEG dual-beam SEM FIB; Field Electron and Ion Company; Estados Unidos) de una membrana de cobre recubierta con titanio. Se trató de una membrana a la cual no se le había removido el remanente de capa semilla por ataque químico. Se removió una porción rectangular de la membrana con el haz de iones focalizados y se observó la sección transversal resultante (Figura 18a, Figura 18b). Asimismo, se efectuó un análisis de espectroscopia de energía dispersiva para evidenciar la presencia de cobre y de titanio (Figura 18c, Figura 18d). Se ve que la capa de titanio no solo no recubre el interior de los poros, sino que también se encuentra obstruyéndolos. Esto posiblemente se deba a la presencia de remanentes de la capa semilla, motivo por el cual se efectuó el ataque químico de otras dos membranas y se repitió el proceso de recubrimiento. Sin embargo, no fue posible el análisis por microscopía electrónica de estas últimas dado que el equipo fue inhabilitado por tareas de mantenimiento.

Por último, cabe mencionar que luego de la utilización de una membrana de cobre recubierta con titanio en ensayos de caracterización funcional de la unidad filtrante (ver secciones 3.2.1 y 4.3), se observó el desprendimiento de la película de titanio en la zona de contacto con el *O-ring*, quedando el titanio adherido a éste, como puede verse en la Figura 19. Ello sugiere una adherencia deficiente del depósito realizado.

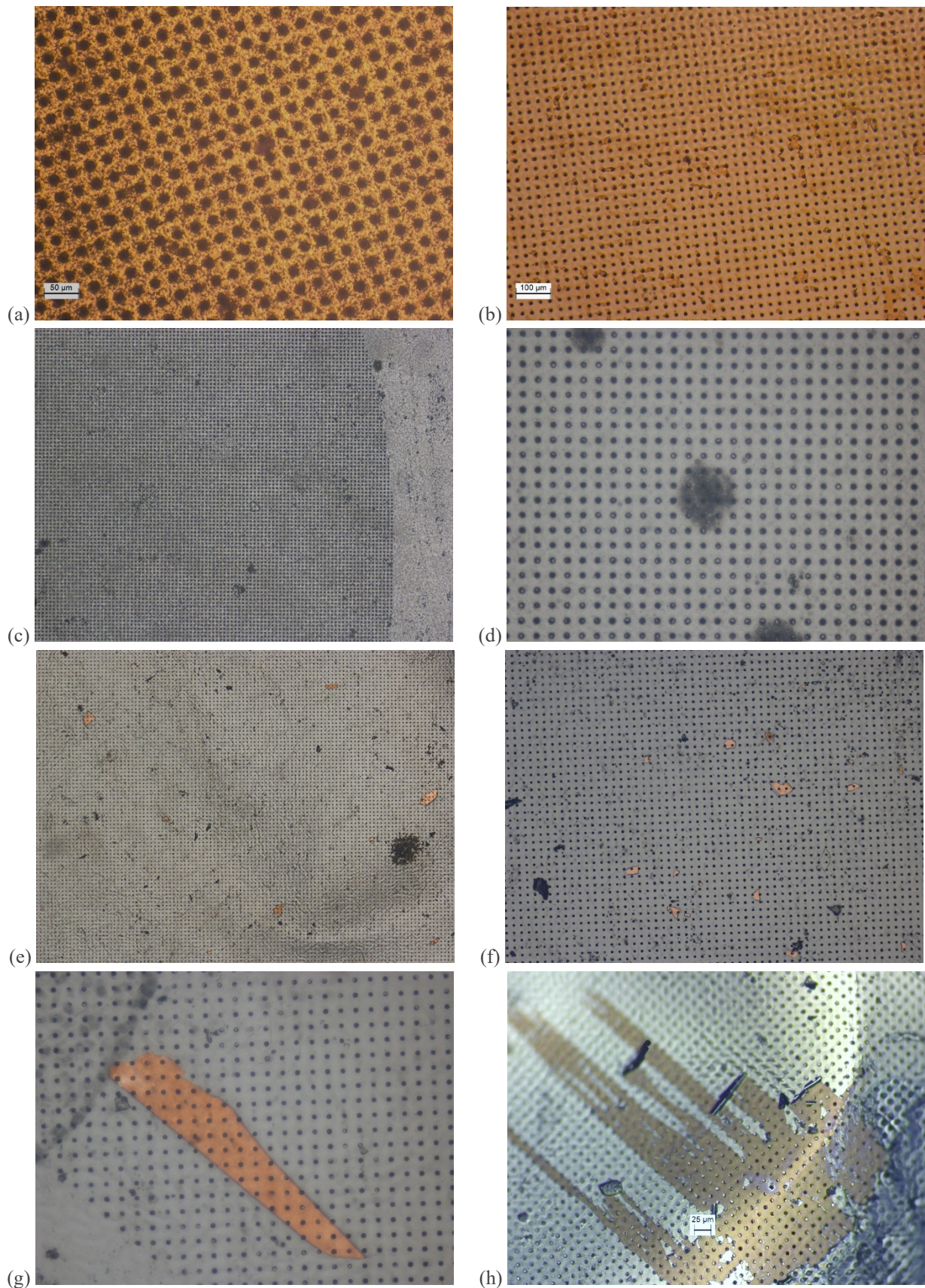


Figura 17. (a). Micrografía óptica de la membrana de cobre en la cara del *electroplating* luego del ataque químico y antes del recubrimiento de titanio; 500×. (b) Micrografía óptica de la membrana de cobre en la cara de la capa semilla luego del ataque químico y antes del recubrimiento de titanio; 200×. (c) y (d) Micrografías ópticas de las membranas en la cara del *electroplating*, en la cual se observa un depósito relativamente uniforme; 50× y 200×, respectivamente. (e) y (f) Micrografías ópticas de las membranas en la cara de la capa semilla, en la que se observan sitios de cobre no recubierto; 50× y 100×, respectivamente. (g) Detalle de un sitio no recubierto; 200×. (h) Detalle de un desprendimiento de la capa de titanio; 200×.

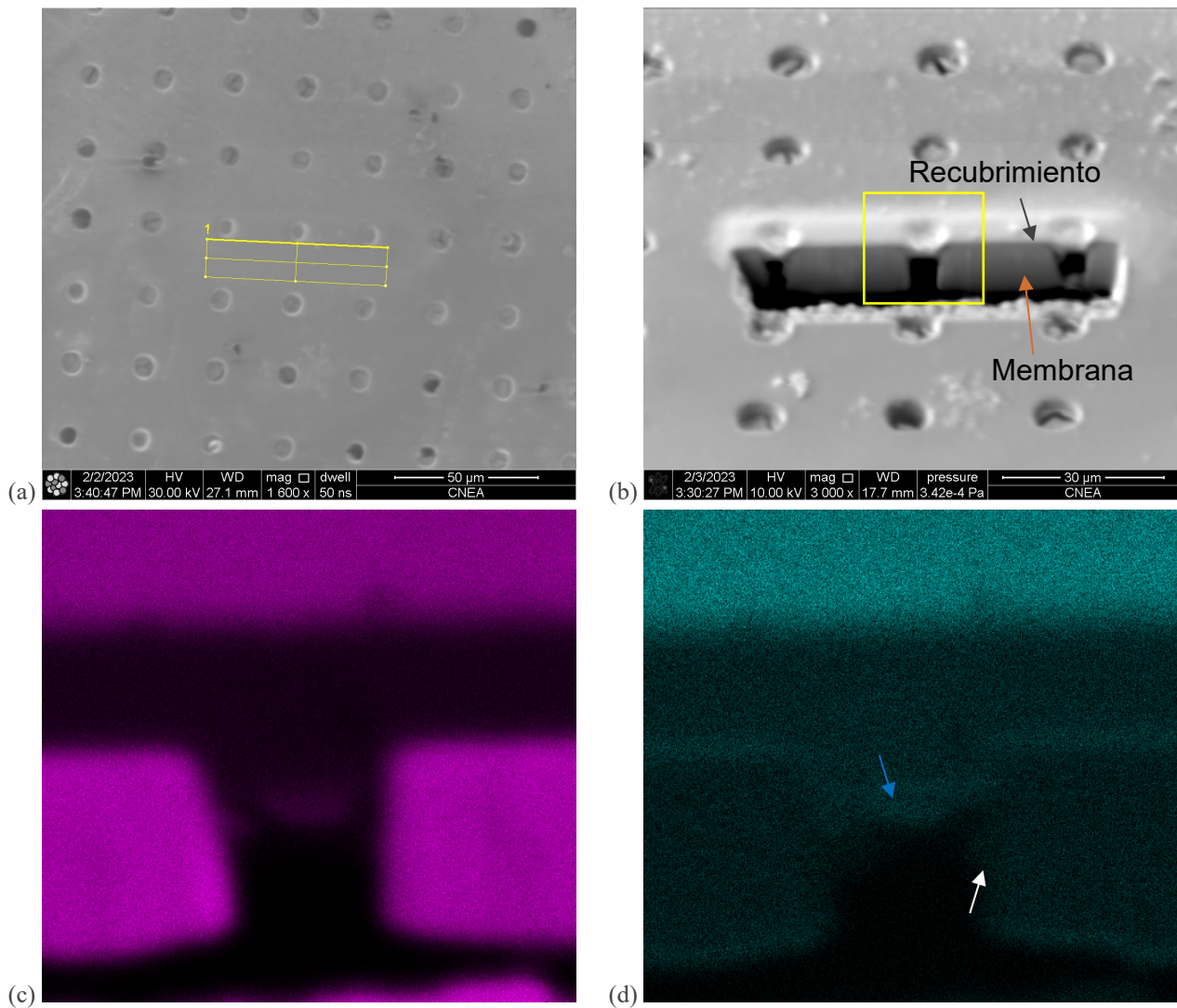


Figura 18. (a) Selección del área a remover con el haz de iones focalizados. (b) Micrografía electrónica de la membrana de cobre recubierta con titanio, en las que se observa la sección removida. (c) Mapeo por espectroscopia de energía dispersiva de cobre L en la sección marcada con un rectángulo amarillo en la Figura 18b. (d) Mapeo por espectroscopia de energía dispersiva de titanio K en la sección marcada con un rectángulo amarillo en la Figura 18b; se observa la obstrucción del poro donde indica la flecha azul y el no recubrimiento de su pared interior, donde indica la flecha blanca.



Figura 19. Fotografía de las mordazas de la unidad filtrante, en cuyos *O-rings* se evidencia el desprendimiento de la capa de titanio.

En resumen, la película de titanio no recubrió completamente la superficie de la membrana de cobre ni el interior de los poros, produjo obstrucción de éstos y su adherencia no fue adecuada para la aplicación buscada. Estos resultados motivan a pensar que el depósito de titanio por evaporación por haz electrónico sobre las membranas de cobre no es un método óptimo para evitar el contacto del material citotóxico (cobre) con la suspensión celular y, por lo tanto, es necesario buscar alternativas de materiales y procesos.

4.1.2. Membranas de níquel

Los primeros procesos de *electroplating* que se hicieron sobre obleas de prueba para medir el rendimiento del electrolito con el soporte de un contacto resultaron insatisfactorios, puesto que el depósito no era uniforme en espesor, habiendo diferencias de varios micrones entre diferentes zonas de una misma membrana. Además, se observaron zonas en las cuales no había depósito alguno.

Luego del rediseño del dispositivo de modo tal que contase con dos contactos eléctricos, se obtuvieron resultados favorables, como se observa en la Figura 20. La observación microscópica y el análisis por perfilometría óptica permitieron confirmar la presencia y definición de los poros, que se encuentran en su mayoría libres, no obstruidos. La película depositada resultó ser de espesor ligeramente inferior al esperado de 7 μm , pero con una buena uniformidad en cada membrana, tal como se observa en la Tabla 3.

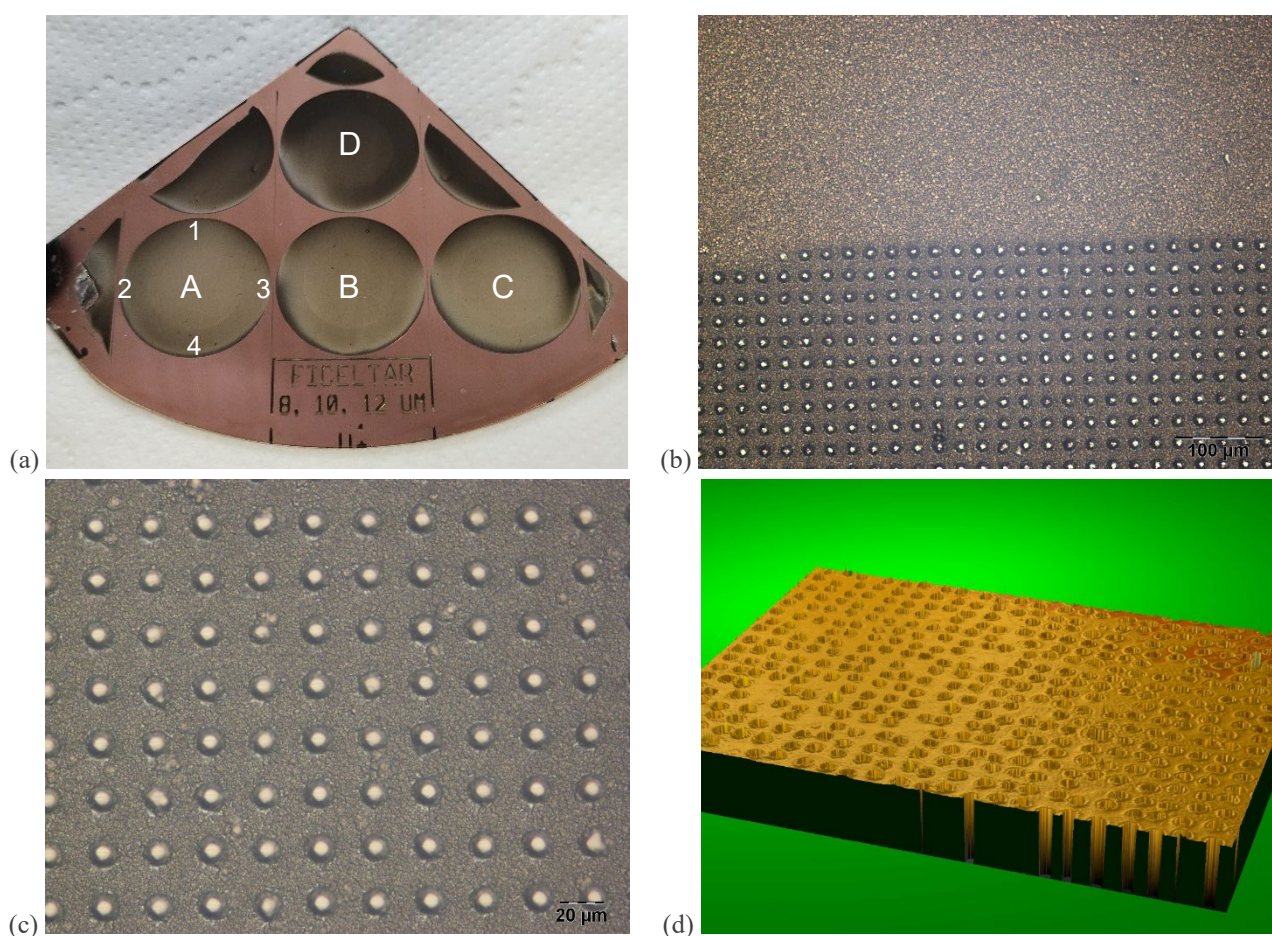


Figura 20. (a) Fotografía de una muestra de prueba de *electroplating* de níquel. (b) Micrografía a 200 $\times$ de la membrana en la que se observan los poros y la estructura de granos de crecimiento electroquímico en el borde de la membrana. (c) Micrografía a 500 $\times$ en la que se observa un detalle de los poros. (d) Análisis tridimensional por perfilometría óptica de una región de la zona microporosa de la membrana.

Membrana	Espesor (μm)					
	1	2	3	4	Media	Desv. est.
A	6,12	6,42	6,94	7,91	6,84	0,78
B	-	6,27	6,60	6,41	6,42	0,16
C	6,72	6,20	7,25	7,39	6,89	0,54
D	7,84	6,29	6,51	5,25	6,47	1,06

Tabla 3. Datos de espesor de la capa electrodepositada, medidos en una oblea de prueba, en los sitios que se indican en la Figura 20a.

En cuanto a las muestras finales, con capa de sacrificio para permitir el desprendimiento de las membranas, el depósito resultó aparentemente similar a los obtenidos en las obleas de prueba. Sin embargo, la inmersión de éstas en acetona para remover el molde de *electroplating* resultó en el desprendimiento y la fragmentación de las membranas electrodepositadas, como se observa en la Figura 21. Posiblemente, las tensiones residuales del depósito fueron demasiado altas, flexionando las membranas y desprendiendo ligeramente el borde de éstas de la capa de sacrificio. Ante la inmersión en acetona, ésta se introdujo debajo de los bordes levantados de cada membrana y atacó la capa de sacrificio en un paso anterior al que debería haberla atacado. La manipulación posterior con pinzas terminó de fragmentar las membranas desprendidas.

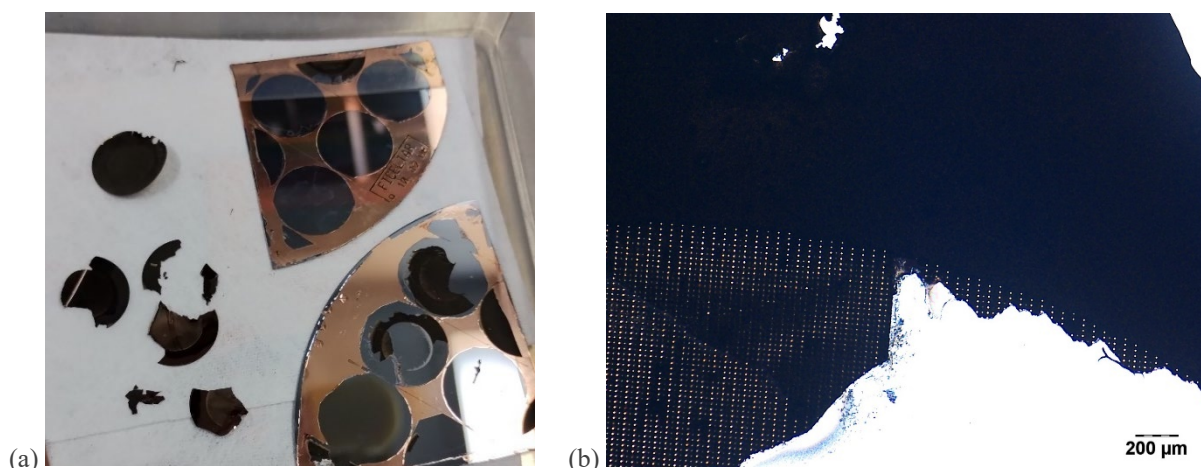


Figura 21. (a) Fotografía de los resultados de la fabricación de las membranas de níquel. Se observa la fragmentación y el desprendimiento de las membranas de la oblea. (b) Micrografía a 50× de un remanente de membrana que permaneció adherido a la oblea de silicio.

Dado que las condiciones de proceso eran las mismas que en las obleas de prueba, puede asumirse que las tensiones residuales en la capa electrodepositada son del mismo orden. Por lo tanto, el origen del problema parecería haber sido que la adherencia de la capa semilla depositada por *sputtering* a la fotorresina de la capa de sacrificio es suficientemente menor que la adherencia de ésta última a la oblea de silicio.

La destrucción prácticamente total de las membranas de níquel imposibilitó continuar con los procesos de fabricación y también cualquier caracterización que pudiera hacerse de las membranas. Estos resultados parecen indicar que el depósito electroquímico de níquel, al menos en las condiciones de proceso utilizadas, no es un método apropiado para la fabricación de dispositivos independientes (*standalone devices*), sin adhesión a un sustrato. Deberá efectuarse un estudio intensivo del efecto de la densidad de corriente, el pH y la temperatura en las tensiones residuales de la película.

4.1.3. Membranas de fotorresina

Las pruebas de fabricación de las membranas microporosas en fotorresina SU-8 2005 tuvieron resultados relativamente favorables. Durante la inmersión de la oblea en lactato de etilo no solo se reveló la SU-8, resultando en la formación de la estructura de las membranas, sino que además se atacó la resina AZ 1518 de la capa de sacrificio, resultando en el desprendimiento de las membranas de la oblea (Figura 22). Esto ahorró un paso en el proceso de fabricación, al no ser necesaria la inmersión en AZ 400 K. Sin embargo, por el bajo espesor de fotorresina SU-8, las membranas resultaron demasiado flexibles y no manipulables. Al intentar recogerlas con una pinza, éstas se enrollaron sobre sí mismas y fue imposible retirarlas del lactato de etilo. Se logró recuperar una de estas membranas del lactato de etilo en un portaobjetos, sosteniéndola sobre éste con dos pinzas al momento de tomarlas para que no se enrollen. La membrana recuperada es transparente a la vista, lo que representa una ventaja en cuanto a la aplicación final de la membrana, dado que permite el análisis

y procesamiento de las células retenidas sobre el mismo filtro, sin necesidad de levantarlas o recuperarlas por flujo inverso. Su observación micrográfica confirmó la presencia de poros bien definidos, tal como se muestra en la Figura 23.

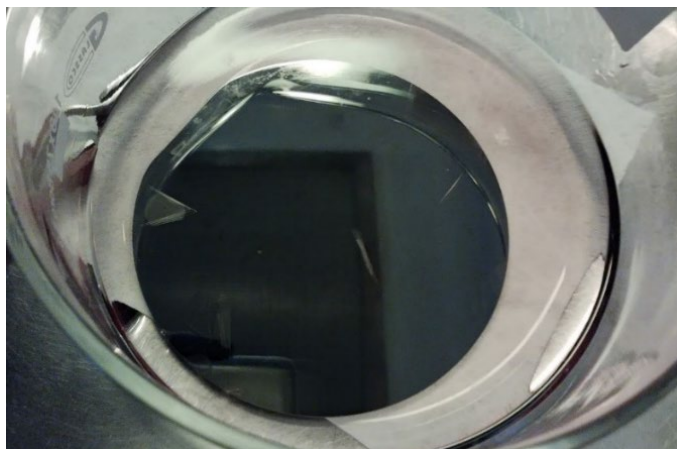


Figura 22. Fotografía del proceso de revelado de la fotorresina SU-8 2005 en lactato de etilo, en la cual se evidencia el desprendimiento de las membranas de la oblea de silicio.

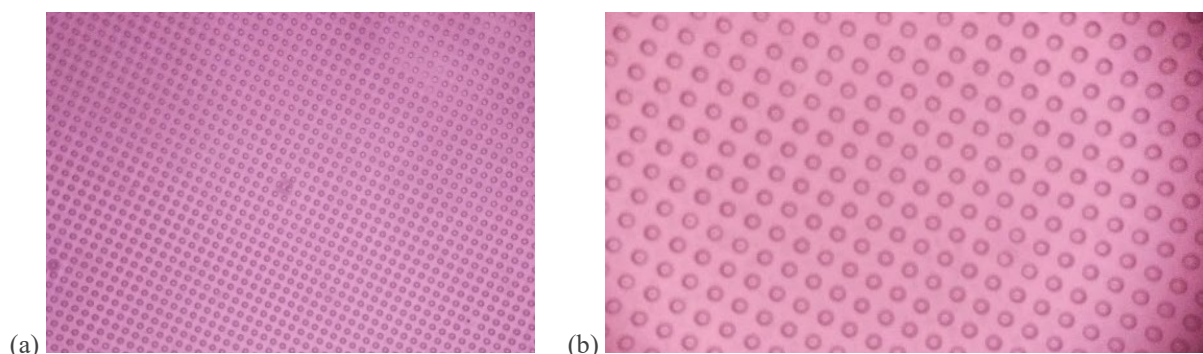


Figura 23. Micrografías de la membrana de SU-8 2005 recuperada en un portaobjetos, aumentos de (a) 50× y (b) 100×.

Los resultados son prometedores para esta ruta de fabricación, demostrando que sería posible fabricar las membranas por este método de modo relativamente sencillo. No obstante, la no disponibilidad de resina SU-8 para espesores mayores imposibilitó la confirmación de la factibilidad del proceso.

Por otro lado, todas las pruebas efectuadas con fotorresina AZ 125nXT-10A fueron desfavorables, no pudiendo desprender las membranas de la oblea. El motivo de esto probablemente sea la disolución de esta resina en la de la capa de sacrificio, puesto que tanto la AZ 125nXT como la AZ 1518 y la AZ 9260 poseen el mismo solvente, acetato de 1-metoxi-2-propanol. No fue posible evitar el problema con un endurecimiento (*hard bake*) de la capa de sacrificio ni con un espesor mayor de ésta. Una posible solución a evaluar sería la adición de una capa intermedia que separe físicamente ambas resinas, por ejemplo, por evaporación térmica de aluminio.

4.2. Citocompatibilidad de materiales

Se muestra en la Figura 24 los resultados del ensayo MTT realizado para evaluar la citocompatibilidad del aluminio, cobre, cobre recubierto con titanio y níquel; luego de uno y cinco días de incubación posterior a la exposición del cultivo al medio condicionado por cada material. En primer lugar, en todos los casos la absorbancia resulta mayor a cinco días que a un día, lo cual es esperable dado que a mayor tiempo de cultivo habría mayor proliferación celular. El análisis que brinda información sobre la citotoxicidad de los materiales es la comparación entre materiales a igualdad de tiempo desde la exposición.

A un día de la exposición al material, no se observan diferencias significativas en las absorbancias como para formular un criterio de ordenamiento de los materiales ensayados por citocompatibilidad. A los cinco días desde la exposición, la comparación entre los diferentes materiales de la membrana microporosa (cobre, cobre/titanio, níquel) no arroja un resultado concluyente, pues las absorbancias obtenidas son similares entre ellas y también al ensayo control. En cambio, sí puede hablarse de una aparente tendencia perjudicial del material propio de la unidad filtrante, el aluminio, cuya absorbancia resultó en principio menor que para los demás materiales. Debe tenerse en cuenta también que el aluminio es el material de mayor relación área expuesta a volumen de medio y, adicionalmente, que la chapa de aluminio evaluada posiblemente no sea de la misma aleación que la de la unidad filtrante, pues no fue posible conseguir un fragmento de ésta.

Ahora bien, en todos los casos la gran dispersión de los datos obtenidos, detectable incluso a simple vista en la placa P24, hace que los errores relativos sean altos. Además, llama la atención que el ensayo control, sin exposición a un material, no cuente con la máxima viabilidad celular a uno ni a cinco días de la exposición (considerando los valores de las medias). Esto posiblemente se deba a la variación en la cantidad de células iniciales sembradas en cada pocillo de las placas P24, dado que se presume la uniformidad en la concentración de células viables en todo el volumen de suspensión celular del que se toman alícuotas para el sembrado, pero esto no necesariamente es de ese modo. Por lo tanto, debe efectuarse la repetición del ensayo, idealmente ampliando la cantidad de replicados, y la reevaluación de los resultados.

Por otro lado, es importante aclarar que el ensayo realizado fue planteado de modo de evaluar el efecto indirecto del material sobre las células, es decir, el efecto que los iones metálicos disueltos en el medio pueden ejercer sobre las células. En una operación de filtrado, las células en suspensión no solo están afectadas por los iones metálicos en solución, sino que además aquellas retenidas en la membrana serán afectadas directamente por el material en un contacto directo, sin un medio intermediario. También podrían interactuar con el material de la unidad filtrante antes de ponerse en contacto con la membrana. En consecuencia, resulta imperioso para la continuación del análisis de citocompatibilidad un ensayo que permita evaluar la viabilidad celular luego de una exposición directa célula/material. Para ello, podría modificarse el ensayo realizado efectuando la siembra de las células directamente sobre el material a ensayar, aunque ello podría requerir un paso posterior de desprendimiento con tripsina/EDTA que introduciría mayor variabilidad en el ensayo, dado que podría disminuir la viabilidad celular pero no por efecto de la interacción con el material.

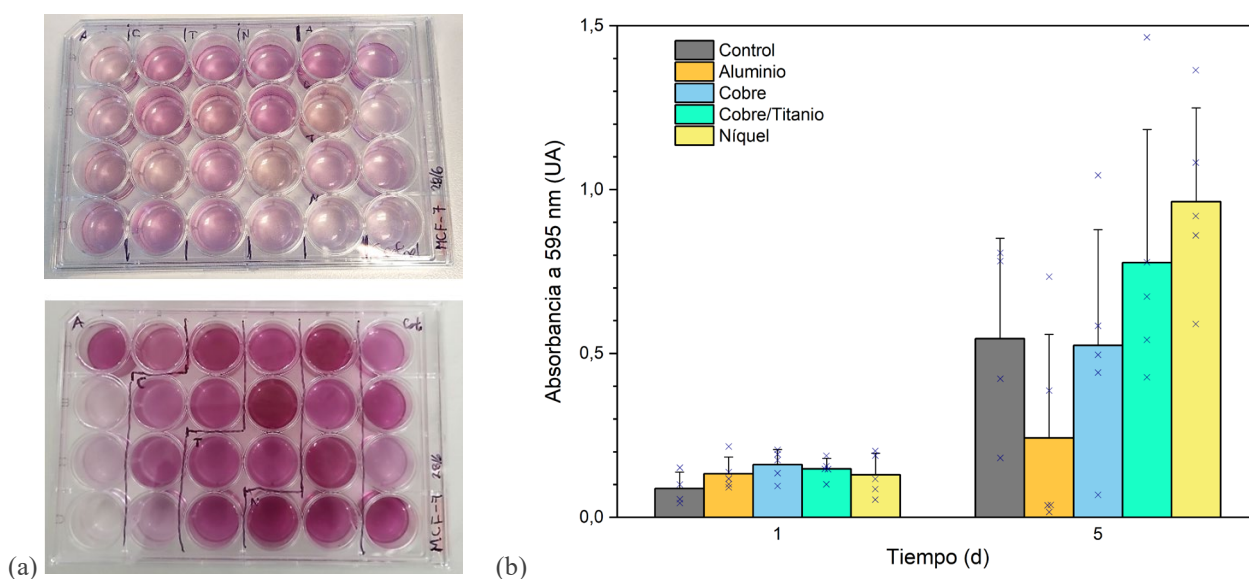


Figura 24. (a) Placas P24 luego del ensayo MTT para los cultivos de la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama expuestos a diferentes materiales (aluminio, cobre, cobre/titanio, níquel, control); luego de un día (arriba) y cinco días (abajo) de incubación posterior a la exposición. (b) Absorbancias medidas para cada grupo muestral luego de uno y cinco días de la exposición. La absorbancia es directamente proporcional a la actividad metabólica del cultivo.

4.3. Caracterización funcional del dispositivo

4.3.1. Distribución de tamaños de la línea celular L-1236

En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos en la determinación estadística del tamaño de las células de la línea L-1236. La línea azul oscuro representa un ajuste lognormal de media 2,920 y desviación estándar 0,252. Dicha distribución implica un diámetro celular medio de 19,2 μm . Suponiendo que las células de Reed-Sternberg representan el 1% del cultivo celular (Aggarwal & Limaem, 2022), podría considerarse en primera aproximación que las células de Reed-Sternberg son aquellas cuyo diámetro es mayor o igual que 33,3 μm . Esto significa que la línea celular no es completamente apta para la evaluación del filtrado como mecanismo de aislamiento de CTC en sangre, puesto que supera el diámetro sugerido en la sección 2.2.3 de 11 a 13 μm . Sin embargo, aunque los resultados no sean extrapolables, la línea celular es útil para las pruebas de concepto del dispositivo como clasificador celular y para el aislamiento de las células de Reed-Sternberg.

Dado que el diámetro del poro de las membranas utilizadas fue de 10 μm , el objetivo del filtrado sería lograr una velocidad de deformación, a través del caudal, tal que permita una reducción de la sección transversal de la célula de al menos un 50% pero menor que el 67%, de modo tal que los linfocitos comunes atraviesen la membrana pero que las células de Reed-Sternberg permanezcan retenidas.

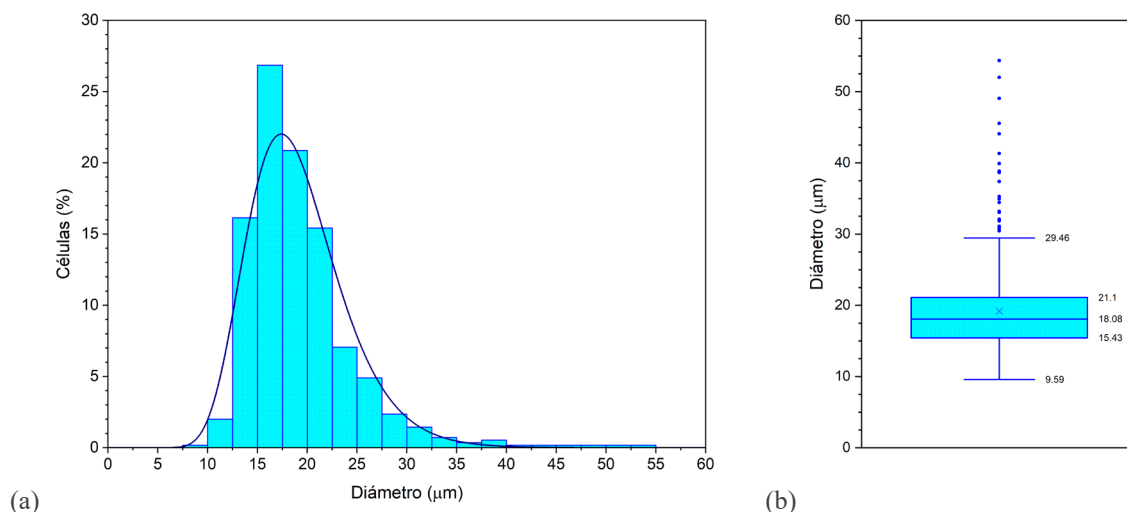


Figura 25. Histograma (a) y diagrama de caja (b) de la distribución de tamaños de la línea celular L-1236 de linfoma de Hodgkin clásico.

4.3.2. Ensayos de filtrado

La principal dificultad encontrada durante las pruebas preliminares para poner a punto el procedimiento fue la tendencia de las células en suspensión a agruparse formando cúmulos de varias células. Esto constituye un problema, pues los cúmulos constituyen un obstáculo de tamaño mayor al diámetro del poro utilizado para el filtrado, quedando retenidos en la membrana aun cuando se trata de células que por su tamaño o deformabilidad individual no se desean retener.

La resuspensión mecánica por pipeteo tuvo éxito en la disgregación de los cúmulos más grandes, de mayor cantidad de células; empero, no resultó eficaz en la disgregación de los cúmulos pequeños, de menos de seis o siete células. La adhesión célula-célula es mediada por la acción de cationes calcio (Ca^{2+}) y, en menor medida, de otros cationes bivalentes. Para complementar la acción de la resuspensión mecánica, se propuso la utilización de un *buffer* de FACS, que cuenta con EDTA como agente quelante de Ca^{2+} para debilitar los enlaces intercelulares y disgregar los cúmulos.

Si bien se detectó la presencia de algunas células de entre 10 y 20 μm de diámetro en la placa de suspensión filtrada en *buffer* FACS, éstas constituyeron casos muy aislados, siendo la vasta mayoría de la placa ocupada por fragmentos de células destruidas (Figura 26a). En contraposición, la

suspensión filtrada en medio RPMI no presentó este problema, observándose pocos fragmentos de células y el predominio de células enteras, en su mayoría de entre 10 y 30 μm de diámetro (Figura 26b). En cuanto a la placa de células recuperadas de la membrana, en ambos casos (Figura 26c, Figura 26d) se observó la presencia de cúmulos, lo que era esperable para el medio de cultivo RPMI pero no para el *buffer* FACS, cuyo uso estaba destinado justamente a evitar esto. Se presume que el *buffer* FACS no es tan efectivo para disgregar los cúmulos pequeños en esta aplicación, posiblemente por el intervalo de tiempo que transcurre entre la siembra de las células en el *buffer* FACS y la finalización del filtrado. Además, por el pequeño tamaño de muchas células de las que constituyen los cúmulos, se descarta la posibilidad de que el cúmulo se haya formado luego del filtrado. Otra observación notable, que se condice con lo observado en la placa de suspensión filtrada, es que las células más grandes se vieron en su mayoría destruidas por las tensiones del filtrado cuando se encontraban en *buffer* FACS, incluso aunque no hubieran atravesado la membrana. En cambio, en la recuperación del filtrado de células en medio RPMI se observó una buena cantidad de células de entre 35 y 55 μm en aparentemente buenas condiciones.

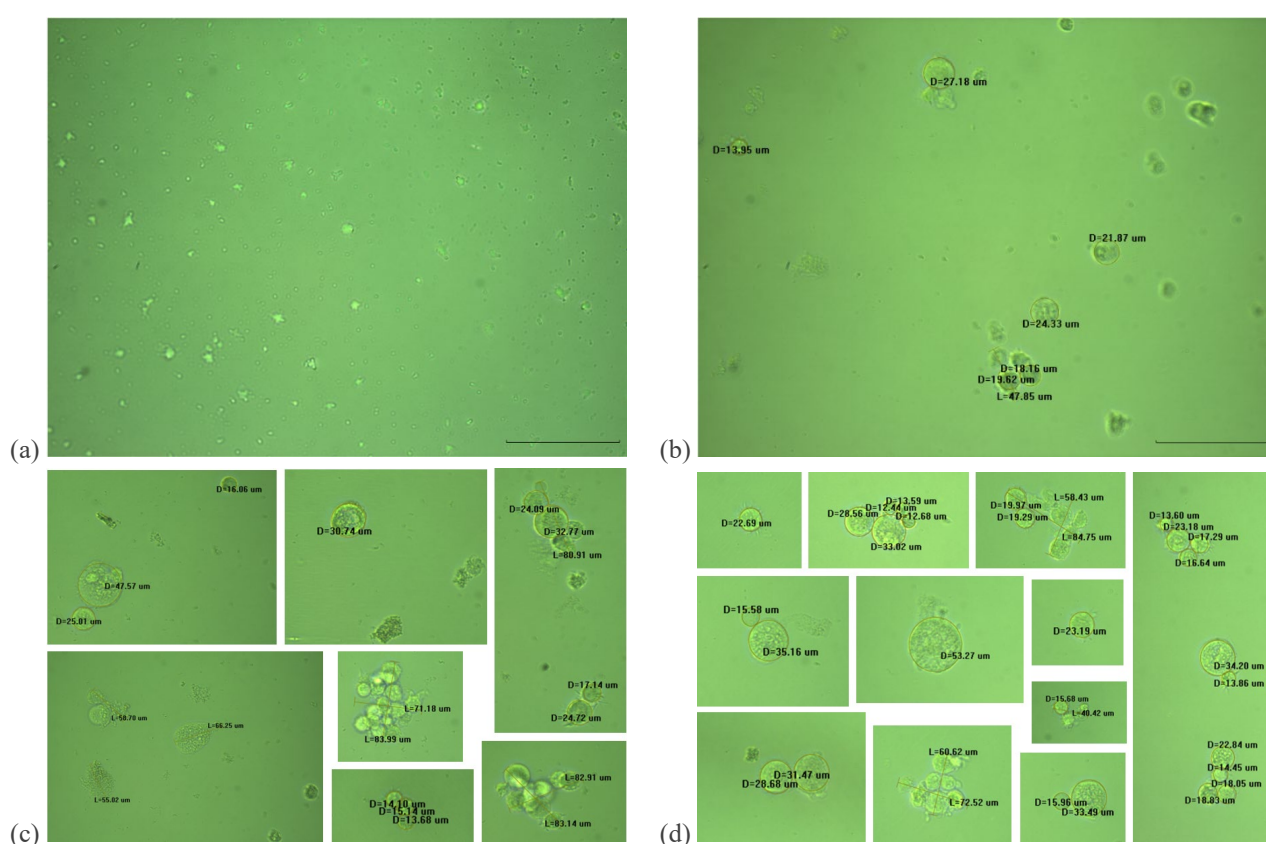


Figura 26. (a) Micrografía a 200 $\times$ de la suspensión filtrada en *buffer* FACS a 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. (b) Micrografía a 200 $\times$ de la suspensión filtrada en medio de cultivo RPMI sin suero a 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las líneas de referencia de escala representan 100 μm . (c) Recopilación de observaciones a 200 $\times$ de la recuperación de las células retenidas en la membrana luego del filtrado en *buffer* FACS. (d) Recopilación de observaciones a 200 $\times$ de la recuperación de las células retenidas en la membrana luego del filtrado en medio RPMI sin suero.

Los resultados obtenidos evidencian que el *buffer* FACS es perjudicial a la hora de efectuar el filtrado, pues la vasta mayoría de las células son destruidas durante el proceso. Como se especificó en la sección 2.2.2, los cationes calcio juegan un rol fundamental en el proceso de autorregeneración de la membrana celular, disparando los procesos de parchado o cierre de las fisuras. Es decir, la ausencia de Ca^{2+} favorece la disgregación de cúmulos, pero hace que las tensiones producidas durante la operación de filtrado terminen destruyendo a las células. En vista de estas observaciones, quedó descartada la utilización de *buffer* FACS como medio para efectuar el filtrado de la línea celular.

Otra dificultad a la hora de poner a punto el método de clasificación celular es la existencia de un volumen de suspensión celular que no es filtrado, de entre 0,3 y 0,4 mL. Éste volumen

permanece en la mordaza de la jeringa reservorio y corresponde aproximadamente a la mitad del volumen de la cámara de filtrado. Toda célula que se encuentre en este volumen termina en la placa de recuperación, correspondiente a las células retenidas en la membrana, aun cuando ésta por su tamaño no debería ser retenida.

Por otro lado, se efectuó un breve análisis del efecto de la velocidad de deformación, a través del caudal de filtrado de una suspensión celular en medio de cultivo RPMI sin suero. Luego del filtrado a 90 $\mu\text{L}/\text{min}$, se observó en la placa de suspensión filtrada una imagen prácticamente idéntica a la de una suspensión no filtrada, mientras que en la placa de recuperación no se observaron células. Esto indica que el caudal utilizado está muy por debajo del caudal óptimo, pues incluso las células más grandes del cultivo celular (aprox. 55 μm de diámetro) atravesaron los poros de la membrana.

En cambio, luego del filtrado a 190 $\mu\text{L}/\text{min}$, si bien en la placa de suspensión filtrada se observaron resultados similares a los del filtrado a 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, a diferencia de éste se observaron grandes cantidades de células de tamaño cercano al promedio de la línea celular (alrededor de 19 μm) en la placa de recuperación, lo que significa que la velocidad de deformación es demasiado alta como para que las células chicas atravesen la membrana.

Aun así, los resultados obtenidos en cuanto al efecto del caudal de filtrado, es decir, de la velocidad de deformación, no fueron del todo concluyentes, puesto que en las cápsulas de Petri se observaron células o cúmulos celulares muy aislados entre ellos, dada la baja concentración de la suspensión filtrada. Además, al tratarse de un sistema biológico, no es suficiente un solo ensayo para determinar el efecto del caudal, sino que deben ejecutarse replicados. Para un análisis intensivo, se propuso el filtrado de volúmenes mayores de suspensión celular, utilizando jeringas *Luer-Lok* de 50 mL, y la recuperación de las células retenidas en el filtro en una jeringa de 5 mL. De este modo, aumentaría la densidad celular en la placa de recuperación, permitiendo cuantificar la eficiencia de captura y el grado de enriquecimiento de células de Reed-Sternberg. No obstante, ocurrió la contaminación de la línea celular L-1236 incubada que, sumada al impedimento de descongelar nuevos viales por motivos ajenos a este trabajo, imposibilitó la continuidad de esta rama de estudio.

4.4. Rediseño de la unidad filtrante

4.4.1. Unidad filtrante por microbomba de jeringas

Ante la presunción de la citotoxicidad de la unidad filtrante, se planteó un rediseño inspirado en ésta y manteniendo el mecanismo de funcionamiento, pero modificando los materiales de construcción, la aleación de aluminio de las mordazas y el caucho sintético NBR de los *O-rings*, por materiales poliméricos biocompatibles.

El nuevo diseño se esquematiza en la Figura 27. Cuenta con una cámara de filtrado de PDMS, un elastómero transparente, generalmente inerte, no tóxico, no inflamable e hidrofóbico tras su reticulación; ampliamente utilizado en la fabricación de dispositivos microfluídicos. Dicha cámara se encuentra dividida en dos partes que se encuentran cada una dentro de una mordaza para facilitar la manipulación y proveer, a través de una carcasa roscada, la presión de cierre de la cámara. Estas tres piezas pueden ser fabricadas de cualquier material, pues no entran en contacto con la suspensión celular durante el filtrado. En este caso, se propone la fabricación en resina polimérica por estereolitografía, un método de fabricación aditiva en el cual un láser UV fotopolimeriza selectivamente una resina líquida fotosensible. La conexión entre la cámara de PDMS y las jeringas reservorio y receptora de la suspensión celular a filtrar se efectuaría a través de mangueras microfluídicas de PTFE o teflón, polímero de conocida biocompatibilidad (USP clase VI), y conectores *Luer-Slip*.

Las ventajas de este nuevo diseño son: (1) su presumible biocompatibilidad, aunque debe complementarse con la utilización de una membrana citocompatible; (2) el ahorro en juntas o sellos, dado que el PDMS, al ser elastómero, puede sellar la cámara por presión; (3) la posible minimización de volumen no filtrado, dado que el PDMS puede ser moldeado a escala micrométrica; y (4) la utilización de jeringas no roscadas, con acople *Luer-Slip*, que son menos costosas que su contraparte

con el sistema *Luer-Lok*. En contraposición, la mayor desventaja es que es más complejo de fabricar que el diseño anterior, que solo consta del mecanizado de una barra metálica.

En cuanto a la esterilización del dispositivo, eligiendo una resina de estereolitografía adecuada, como por ejemplo la Dental SG (Formlabs; Estados Unidos), el dispositivo es esterilizable por calor húmedo en autoclave, dado que tanto el PDMS como el PTFE son también esterilizables por este método (Angély, 2020).

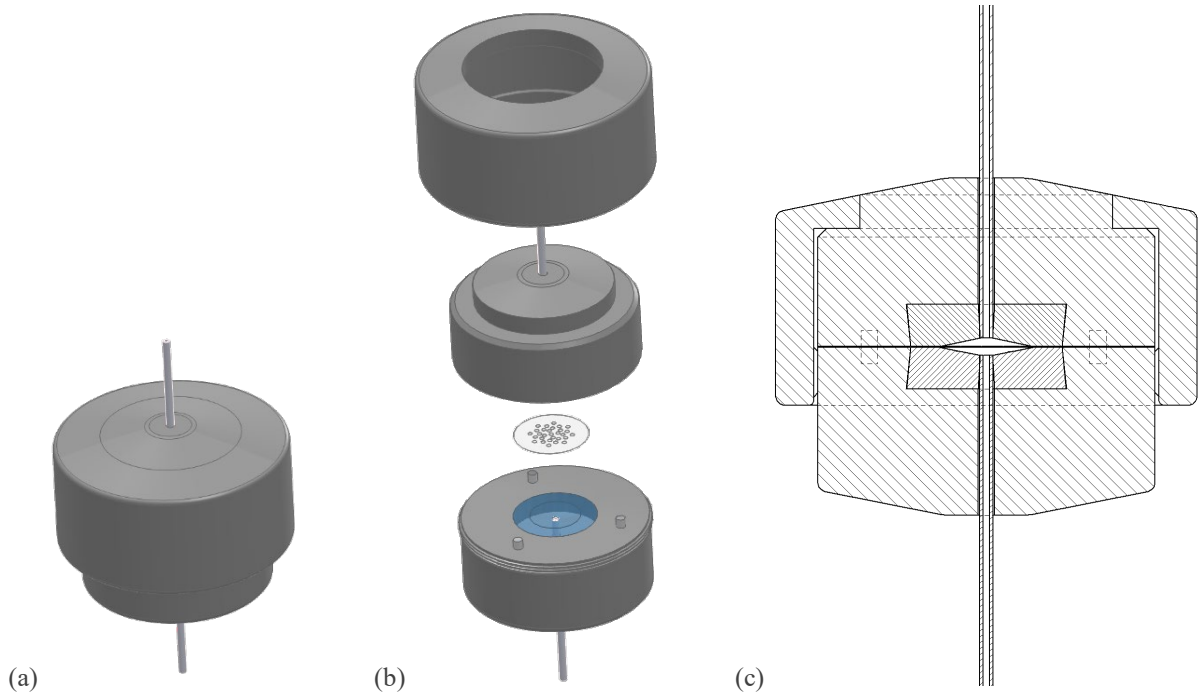


Figura 27. (a) Dibujo esquemático del nuevo diseño de la unidad filtrante armada. (b) Dibujo esquemático del nuevo diseño de la unidad filtrante desarmada. (c) Corte longitudinal de la unidad filtrante.

4.4.2. Unidad filtrante por centrifugación

Ante la complejidad del dispositivo y el procedimiento de filtrado, se diseñó una alternativa de uso mucho más simple, orientada principalmente a la aplicación de la membrana microporosa en un método de diagnóstico. El mecanismo de acción se vio modificado hacia la centrifugación, puesto que un laboratorio de análisis clínicos suele contar con una centrífuga pero no necesariamente con una bomba de jeringas. De este modo, se simplifica el equipamiento y se facilita la aplicación del método. La velocidad de deformación aplicada en las células dependerá de la velocidad de giro.

El diseño se encuentra inspirado en el dispositivo comercial OncoQuick[®], brevemente mencionado en la sección 2.2.3. Como se muestra en la Figura 28, éste consiste en un tubo de centrífuga estéril de polipropileno de 50 mL con una barrera porosa de polietileno de alta densidad en su interior, justo por encima de un medio de separación que contiene azul de tripán. Permite el filtrado por centrifugación de hasta 30 mL de sangre completa anticoagulada. Los eritrocitos y la gran mayoría de los linfocitos atraviesan la membrana hacia el medio de separación, desplazándolo. El plasma sanguíneo permanece por encima de la membrana y del medio de separación y los trombocitos y las eventuales CTC quedan retenidos en la interfaz.

El nuevo diseño se esquematiza en la Figura 29. Se trata de un encamisado para un tubo de centrífuga de 50 mL que cubre aproximadamente la mitad de su longitud y contiene a la membrana microporosa en su extremo. Dicha membrana se encuentra entre dos sellos planos conformados por arandelas de PTFE comercialmente disponibles (M10, $21 \times 2 \times 10,5$ mm) y sujeta por otra pieza que va colocada a presión dentro del encamisado, cerrando las juntas. Tanto la camisa como esta última pieza podrían fabricarse masivamente por inyección plástica, por ejemplo, de polipropileno, el mismo material que los tubos de centrífuga.

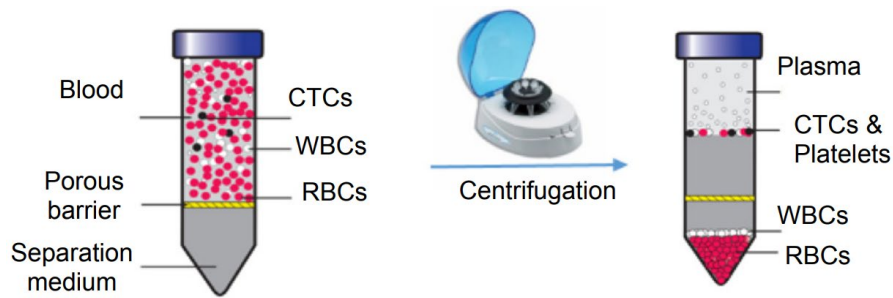


Figura 28. Esquema del funcionamiento del dispositivo de clasificación celular por densidad diferencial OncoQuick®. Las siglas WBCs y RBCs hacen referencia a leucocitos (*white blood cells*) y eritrocitos (*red blood cells*), respectivamente. *Nota.* Tomado de “Novel approaches in cancer management with circulating tumor cell clusters”, por P. Rostami y otros, 2019, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 4.

Si bien se encuentra inspirado el dispositivo OncoQuick®, se diferencia de éste en que luego de la centrifugación, las CTC quedarían retenidas sobre la membrana, adheridas a ésta. Además, resultaría más versátil, dado que si uno desea podría llenar la zona inferior del tubo de centrifuga hasta la membrana con medio celular para recuperar las células sanguíneas en él y separar el plasma; pero también podría efectuarse el filtrado al aire si no se desea separar los constituyentes de la sangre.

Una vez que las CTC quedan retenidas en la superficie de la membrana y se completa la operación de centrifugado, se procedería a abrir el tubo de centrifuga, retirar el sobrenadante de plasma si lo hubiera y remover el encamisado. Para el análisis de las células retenidas en la membrana, se procede a la rotura del encamisado, separando el extremo de la membrana del resto del encamisado. Esto busca facilitar la manipulación y permite efectuar el análisis citológico correspondiente en un microscopio óptico. El encamisado cuenta con una entalla para tal fin. De este modo, además se imposibilita la reutilización de la membrana, que debe ser descartada luego del análisis.

En cuanto a la membrana microporosa, es un requisito prácticamente indispensable para los exámenes citológicos que ésta sea transparente, con lo cual se propone la utilización, de confirmarse la factibilidad en su fabricación, de las membranas de fotorresina SU-8.

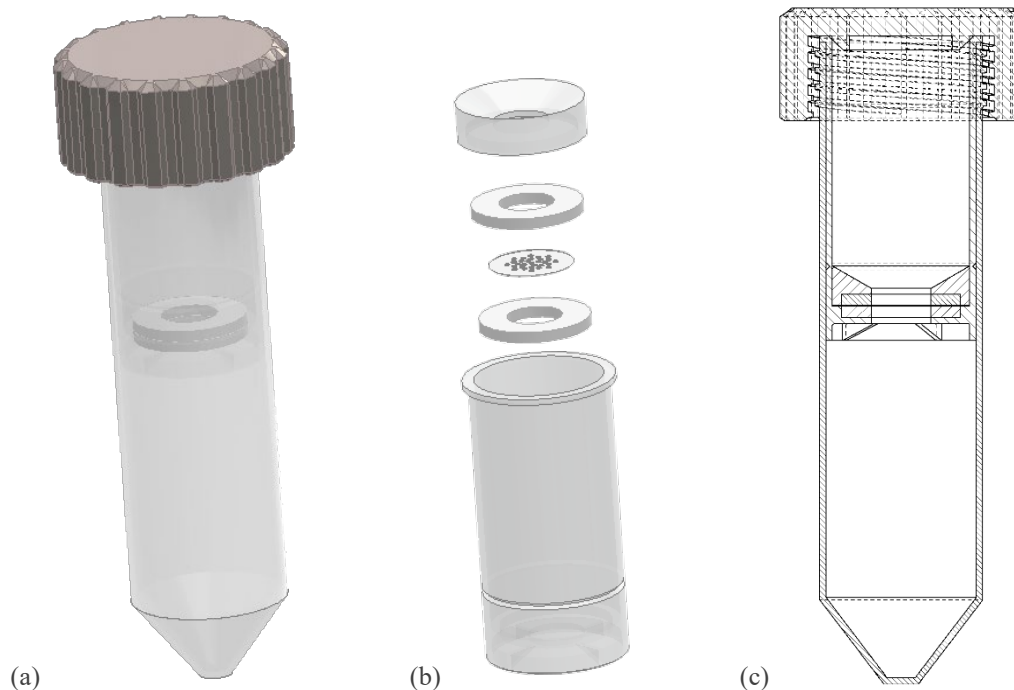


Figura 29. (a) Dibujo esquemático del tubo de centrifuga con el nuevo diseño de la unidad filtrante armada en su interior. (b) Despiece del nuevo diseño de la unidad filtrante. (c) Corte longitudinal de la unidad filtrante en el tubo de centrifuga.

En cuanto a la esterilidad del dispositivo, se pretende que los últimos pasos del proceso de fabricación sea la esterilización por óxido de etileno y el empaquetamiento individual por termoformado, al igual que como ocurre con pipetas serológicas, jeringas y otro material de laboratorio estéril descartable.

Las ventajas de este diseño son: (1) la posibilidad de fabricarse masivamente por inyección plástica; (2) su bajo costo, que viene de la mano con la facilidad de fabricación; (3) su facilidad de uso, requiriendo solamente la apertura del empaquetado y la colocación del dispositivo en un tubo de centrifuga; (4) ser autodescartable, pues no permite su reutilización; y (5) poder optimizarse para lograr la separación por densidad de los componentes de la sangre.

Por último, rediseñando la fotomáscara de la Figura 9 para la fabricación de membranas de menor diámetro, puede adaptarse este diseño para tubos de centrifuga de 15 mL, lo cual es ideal para reducir la utilización de material descartable innecesario, puesto que una muestra de sangre periférica como la utilizada en este tipo de diagnóstico tendría un volumen cercano a los 7 mL.

5. CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones del presente trabajo

El recubrimiento de membranas microporosas metálicas con titanio por evaporación térmica no ha sido satisfactorio, dadas la falta de recubrimiento completo de la superficie, la obstrucción de los poros y la pobre adherencia al material base. Aun así, permitió la utilización de las membranas en ensayos para la caracterización funcional de la unidad filtrante.

La fabricación íntegra de membranas microporosas metálicas por depósito electroquímico (*electroplating*) de níquel, que en las primeras pruebas aparentaba ser un proceso exitoso, produjo membranas frágiles y no manipulables, principalmente por la presencia de altas tensiones residuales en el depósito.

La fabricación íntegra de membranas microporosas poliméricas por fotolitografía de resina SU-8 brindó un resultado prometedor, pudiendo obtenerse membranas enteras con poros definidos. Sin embargo, dado el bajo espesor de resina utilizado, dichas membranas resultaron no ser manipulables. La utilización de resina AZ 125nXT como alternativa para fabricar membranas de mayor espesor no resultó favorable con las condiciones de proceso utilizadas.

Los ensayos de citocompatibilidad efectuados brindaron resultados poco concluyentes. Si bien a un día de la exposición del cultivo celular a los diferentes materiales ensayados la viabilidad celular resultó muy similar en todos los casos; a cinco días de la exposición se observó una aparente tendencia del aluminio a disminuir la viabilidad celular, a diferencia de los materiales de la membrana (cobre, cobre/titanio, níquel), que mantuvieron viabilidades celulares de orden comparable al ensayo control. Sin embargo, estas observaciones deben ser tomadas con precaución, dados los altos márgenes de error relativo obtenidos.

Los ensayos de caracterización funcional del dispositivo encontraron como principal obstáculo la imposibilidad de disgregar completamente los cúmulos celulares. La utilización de un quelante de cationes calcio resultó perjudicial para el filtrado de la línea celular, pues no solo que los cúmulos permanecieron, sino que además las células resultaron destruidas dada su necesidad de cationes calcio para activar los mecanismos de parchado y cierre de fisuras de la membrana celular. En cuanto a la velocidad de deformación aplicada, una primera aproximación pareció indicar que el caudal óptimo de filtrado se encuentra acotado dentro del rango de 90 a 190 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Se han planteado dos alternativas de rediseño de la unidad filtrante, de modo de obtener una cámara de filtrado biocompatible, orientadas a aplicaciones específicas de investigación y desarrollo, por un lado, y de aplicación en laboratorios de análisis clínicos, por el otro.

En resumen, se han obtenido avances significativos en el logro de los objetivos planteados en este trabajo. Sin embargo, resulta fundamental destacar que aún existen interrogantes sin resolver, los cuales serán abordados en detalle en la sección 5.2. Estas cuestiones pendientes representan oportunidades para futuras investigaciones y refuerzan la importancia de continuar explorando y ampliando el conocimiento en este campo.

5.2. Perspectivas futuras

5.2.1. Microfabricación de las membranas

En cuanto a los procedimientos relacionados con el desarrollo y la fabricación de las membranas microporosas, pueden resaltarse las siguientes propuestas.

La evaluación intensiva del efecto de la densidad de corriente y la distancia entre electrodos en el depósito electroquímico (*electroplating*) de níquel, de modo de obtener membranas de espesor uniforme y con tensiones residuales menores, que permitan completar el procedimiento de microfabricación.

La fabricación de membranas por fotolitografía utilizando fotorresina SU-8 para mayores espesores, con la correspondiente evaluación de resultados. Posiblemente sea necesario efectuar correcciones a la etapa de exposición a la luz UV para poder definir los poros, dado que el aumento en el espesor de la fotorresina se traduce en una mayor dispersión de la luz.

La fabricación de membranas por fotolitografía utilizando fotorresina AZ 125nXT-10A incluyendo una película intermedia que separe físicamente la capa de fotorresina de sacrificio y la capa de AZ 125nXT.

El estudio de otras rutas de fabricación alternativas, que no pudieron llevarse a cabo con la capacidad técnica actual del DMNT. Algunas sugerencias son:

- fabricación íntegra de las membranas por CVD de parileno C o policloro-*p*-xilileno, un polímero reconocido por su nula actividad química, su resistividad eléctrica, su baja permeabilidad a la humedad y su biocompatibilidad (USP clase VI);
- el recubrimiento de las membranas metálicas por PVD de aluminio y un posterior anodizado que forme una capa compacta de alúmina que separe el metal citotóxico de la suspensión celular, o bien el recubrimiento con alúmina por PVD reactivo.
- el recubrimiento de las membranas metálicas con una película densa de óxido de silicio o de titanio por proceso sol-gel.

5.2.2. Citocompatibilidad y caracterización funcional de la unidad filtrante

En cuanto a los procedimientos relacionados con el cultivo celular, la evaluación de la citocompatibilidad de materiales y la caracterización funcional de la unidad filtrante, pueden destacarse las siguientes sugerencias.

La repetición de los ensayos de citotoxicidad realizados, aumentando el tamaño muestral para disminuir el error y obtener resultados concluyentes para establecer un orden comparativo de citocompatibilidad de materiales.

El diseño y la realización de ensayos de citotoxicidad que involucren el contacto directo entre el cultivo celular y los materiales ensayados, para complementar los ensayos del punto anterior.

La evaluación de la citotoxicidad de otros materiales propuestos en el presente trabajo que no han sido ensayados, tales como las fotorresinas SU-8 y AZ 125nXT, así como también de los materiales surgidos del rediseño de la unidad filtrante.

El ensayo de la compatibilidad de los materiales utilizados y los propuestos con la línea celular L-1236 de linfoma de Hodgkin clásico, dado que la respuesta de las células a determinados estímulos depende, entre otras cosas, del tipo de célula.

La evaluación intensiva del efecto de la velocidad de deformación aplicada a través del caudal en los ensayos de filtrado de la línea celular L-1236, utilizando mayores volúmenes de filtrado para aumentar la concentración de células y así poder cuantificar la eficiencia de captura y el grado de enriquecimiento.

El ensayo del filtrado de la línea celular L-1236 utilizando otras membranas, específicamente aquellas de mayor espesor, dado que esto puede modificar sustancialmente los resultados.

La extensión de los ensayos de filtrado a otras líneas de células que crecen en suspensión y a sangre periférica, en principio de origen animal, con la presencia de células tumorales.

5.2.3. Rediseño de la unidad filtrante

En lo concerniente al rediseño de la unidad filtrante, debería pulirse el diseño para poder comenzar el prototipado. Posteriormente, de confirmarse a través de ensayos pertinentes la utilidad del dispositivo como clasificador celular o como método de diagnóstico clínico, debería evaluarse la factibilidad de su fabricación, que puede dar como resultado el inicio de la producción del dispositivo o bien la necesidad de un nuevo rediseño.

REFERENCIAS

- ACS. (2023a). *Exams and Tests for Cancer*. Recuperado el 09 de marzo de 2023, de American Cancer Society: <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests.html>
- ACS. (2023b). *What Is Hodgkin Lymphoma?* Recuperado el 07 de mayo de 2023, de American Cancer Society: <https://www.cancer.org/cancer/types/hodgkin-lymphoma/about/what-is-hodgkin-disease.html>
- Aggarwal, P., & Limaïem, F. (2022). *Reed Sternberg Cells*. Recuperado el 11 de mayo de 2023, de National Library of Medicine, StatPearls: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542333/>
- Angély, C. (10 de noviembre de 2020). *Autoclaving techniques and microfluidics: a review*. Recuperado el 07 de julio de 2023, de Darwin Microfluidics: <https://darwin-microfluidics.com/blogs/reviews/different-autoclaving-techniques-and-the-most-used-autoclavable-materials-in-microfluidics>
- Ashworth, T. R. (1869). A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *The Medical Journal of Australia*, 14, 146-147.
- Bankó, P., Lee, S. Y., Nagygyörgy, V., Zrínyi, M., Chae, C. H., Cho, D. H., & Telekes, A. (2019). Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *Journal of Hematology & Oncology*, 12:48.
- Braeuninger, A., Küppers, R., Strickler, J. G., Wacker, H. M., Rajewsky, K., & Hansmann, M. L. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9337-9342.
- ECACC, & Merck KGaA. (2018). *Fundamental techniques in cell culture, Laboratory handbook (Fourth edition)*.
- Fachin, F., Chen, G. D., Toner, M., & Wardle, B. L. (2011). Integration of bulk nanoporous elements in microfluidic devices with application to biomedical diagnostics. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 20(6), 1428-1438.
- Felix Pozzi, M., Mercado, D., Pérez, D., Ostapchuk, G., Ferrari, C., Catalano, P. N., & Berlín, G. (2022a). Proyecto FiCelTar. Filtro de células tumorales argentino. 107.º Reunión de la Asociación Física Argentina. San Carlos de Bariloche.
- Felix Pozzi, M., Mercado, D., Pérez, D., Ostapchuk, G., Ferrari, C., Catalano, P. N., & Berlín, G. (2022b). Classic Hodgkin Lymphoma cell enrichment using “Dead End” mechanical filtering. *III Brazil-Argentina Microfluidics Congress; VI Congreso de Microfluidica Argentina*. Buenos Aires.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453-458.
- Fromm, J. R., Kussick, S. J., & Wood, B. L. (2006). Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *American Journal of Clinical Pathology*, 126(5), 764-780.
- Hench, L. L. (1980). Biomaterials. *Science*, 208(4446), 826-831.
- Heness, G., & Ben-Nissan, B. (2004). Innovative biooceramics. *Materials forum*, 27, 104-114.
- Kanzler, H., Hansmann, M. L., Kapp, U., Wolf, J., Diehl, V., Rajewsky, K., & Küppers, R. (1996). Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell Line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood*, 87(8), 3429-3436.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M. L., & Rajewsky, K. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 184(4), 1495-1505.
- Krog, B. L., & Henry, M. D. (2018). Biomechanics of the circulating tumor cell microenvironment. En C. Dong, N. Zahir, & K. Konstantopoulos (Edits.), *Biomechanics in Oncology, Advances in Experimental Medicine and Biology 1092* (págs. 209-233). Springer.
- Krumm, A. (20 de septiembre de 2018). *Cytotoxicity – These assays tell you what your cells don't like*. Recuperado el 21 de junio de 2023, de BMG LABTECH: <https://www.bmglabtech.com/en/blog/cytotoxicity-these-assays-tell-you-what-your-cells-dont-like/>
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., & Hansmann, M. L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 10962-10966.
- Lei, K. F. (2020). A review on microdevices for isolating circulating tumor cells. *Micromachines*, 11(5), 531.

- Li, Y. Q., Chandran, B. K., Lim, C. T., & Chen, X. (2015). Rational design of materials interface for efficient capture of circulating tumor cells. *Advanced Science*, 2(11), 1500118.
- Madou, M. J. (2012). *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology, Volume II (Third Edition). Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology*. CRC Press.
- Mierke, C. T. (2018). *Physics of Cancer, Volume 1 (Second Edition). Interplay between tumor biology, inflammation and cell mechanics*. IOP Publishing.
- NCI. (2023). *Diccionario del cáncer del NCI*. Recuperado el 10 de marzo de 2023, de National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/biopsia-liquida>
- Nemani, K. V., Moodie, K. L., Brennick, J. B., Su, A., & Gimi, B. (2013). In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility. *Materials Science and Engineering: C. Materials for Biological Applications*, 33(7), 4453–4459.
- Nguyen, N.-T., Truong, T.-Q., Wong, K.-K., Ho, S.-S., & Low, C. L.-N. (2003). Micro check valves for integration into polymeric microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14(1), 69-75.
- Opinto, G., Agostinelli, C., Ciavarella, S., Guarini, A., Maiorano, E., & Ingravallo, G. (2021). Hodgkin lymphoma: A special microenvironment. *Journal of Clinical Medicine*, 10, 4665.
- Reichel, J., Chadburn, A., Rubinstein, P. G., Giulino-Roth, L., Tam, W., Liu, Y., . . . Roshal, M. (2014). Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*, 125(7), 1061-1072.
- Rostami, P., Kashaninejad, N., Moshksayan, K., Saidi, M. S., Firoozabadi, B., & & Nguyen, N.-T. (2019). Novel approaches in cancer management with circulating tumor cell clusters. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 4, 1-18.
- Roth, J., Daus, H., Trümper, L., Gause, A., Salamon-Looijen, M., & Pfreundschuh, M. (1994). Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement at the single-cell level in malignant lymphomas: No rearrangement is found in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *International Journal of Cancer*, 57(6), 799-804.
- Shaw Bagnall, J., Byun, S., Begum, S., Miyamoto, D. T., Hecht, V. C., Maheswaran, S., . . . Manalis, S. R. (2015). Deformability of tumor cells versus blood cells. *Scientific reports*, 5(1), 18542.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209-249.
- Termo Fisher Scientific. (2023). *Cytotoxicity assays*. Recuperado el 21 de junio de 2023, de Termo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/ar/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cytotoxicity.html>
- WHO. (02 de febrero de 2022). *Cáncer*. Recuperado el 07 de marzo de 2023, de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.
- Williams, P. L. (Ed.). (1995). *Gray's Anatomy: The anatomical basis of medicine and surgery (Thirty-eighth edition)*. Churchill Livingstone.
- Young, B., O'Dowd, G., & Woodford, P. (2013). *Wheater's Functional histology: A text and colour atlas (Sixth edition)*. Churchill Livingstone.
- Zheng, S., Lin, H., Liu, J. Q., Balic, M., Datar, R., Cote, R. J., & Tai, Y. C. (2007). Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *Journal of Chromatography A*, 1162(2), 154–161.

AGRADECIMIENTOS

No me gustaría concluir este escrito sin expresar mi más sincero agradecimiento a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer al Instituto de Tecnología Sabato y a sus distinguidos profesores por la calidad excepcional de la educación que recibí durante los últimos cuatro años. Su dedicación a la excelencia académica y su compromiso con la formación integral de los estudiantes han sido fundamentales para mi desarrollo académico y profesional.

Hago extensivo mi agradecimiento al Departamento Micro y Nanotecnología (CNEA) y al Instituto de Nanociencia y Nanotecnología (CNEA-CONICET) por brindarme las facilidades necesarias para llevar a cabo este trabajo. Sus instalaciones especializadas y su apoyo constante han sido de inestimable valor este trabajo.

A mis directores, el Dr. Paolo Catalano y el Ing. Claudio Ferrari, les debo mi gratitud por su instrucción, asistencia, seguimiento y dirección a lo largo de este proyecto. Su vasto conocimiento, experiencia y dedicación han sido una guía indispensable en las labores de ingeniería e investigación. Además, agradezco su excelente predisposición para responder mis consultas y brindar valiosas recomendaciones en cada etapa del trabajo.

Quiero agradecer asimismo a Marcelo Pozzi y Dante Mercado, miembros fundadores del proyecto FiCelTAR, quienes, de manera informal, actuaron como tutores durante esta investigación en los campos de cultivo celular y microfabricación, respectivamente. Su generosidad al compartir su conocimiento y su disposición para brindar ayuda en todo momento han sido invaluable.

A Natalia Sciletta, Gabriel Ostapchuk, Federico Checozzi, María José Deiana, Leonardo Ibáñez, Diego Ceregeido, Manuel Teubal y Matías Heredia, les agradezco por los momentos de distensión compartidos durante este proceso, que me permitieron recargar energías y retomar el trabajo con renovado entusiasmo. A Natalia y Gabriel agradezco también sus valiosos consejos y recomendaciones en el campo de la biología celular, la bioquímica y las tareas de cultivo celular.

Mi gratitud se extiende a Andrés di Donato por su valiosa asistencia técnica en el área de la microfabricación. Asimismo, agradezco a Diego Pérez por su asistencia en el rediseño de la unidad filtrante y por la operación del haz de iones focalizados. Del mismo modo, agradezco a Enrico Petriella y Pablo Leiva por su colaboración en la operación de los equipos de evaporación térmica y *magnetron sputtering*.

Agradezco también a la Dra. Mariángeles Díaz, del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", por su asistencia técnica y procedimental en las tareas de cultivo de células en suspensión.

De igual modo dirijo mi reconocimiento a todo el personal del Laboratorio de Nanomedicina (CNEA), quienes gentilmente me prestaron equipos e insumos. En particular, agradezco a Rodrigo Lloyd por su asistencia técnica y procedimental en las tareas de cultivo de células adherentes.

Agradezco asimismo a la Dra. Magdalena Pezzoni, del Departamento de Radiobiología (CNEA), por llevar a cabo las mediciones de absorbancia en el lector de placas.

Por último, pero no menos importante, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia y amigos por su confianza inquebrantable y su apoyo incondicional a lo largo de esta travesía académica. Su comprensión y aliento constante han sido un pilar fundamental en mi vida y especialmente en estos años de carrera universitaria. Quiero mencionar especialmente a mi pareja, Victoria Grosso, cuyo amor, apoyo y compañerismo han sido mi brújula en este camino.

A todos los que, de una u otra manera, han contribuido al desarrollo y finalización de este Trabajo de Seminario, les brindo mi más sincero agradecimiento. Su apoyo y colaboración han dejado una huella imborrable en mi camino académico y personal.