

Cambios metabólicos de células tumorales bajo condiciones de hipoxia en un modelo de *tumor-on-a-chip*

Metabolic switching of tumor cells under hypoxic conditions in a tumor-on-a-chip model.

Micromachines 2020, 11, 382, doi:10.3390/mi11040382

Valentina Palacio-Castañeda¹, Lucas Johannes Kooijman^{2#}, Bastien Venzac^{2#},
Séverine Le Gac^{2*} y Wouter P.R. Verdurmen^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS),
Radboud. University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

² Applied Microfluidics for BioEngineering Research (AMBER), MESA+ Institute for
Nanotechnology, TechMed center, University of Twente, Enschede, The Netherlands

**/# contributed equally*

Introducción. La hipoxia es un fenómeno que tiende a generarse en el centro de tumores densos y mal vascularizados, lo que conlleva a la formación de gradientes de nutrientes y oxígeno hacia el centro del tumor y al desarrollo de un fenotipo hipóxico en las células en estas zonas de los tumores. Este fenómeno se ha visto que induce fuertemente la agresividad de células tumorales y que a menudo representa un obstáculo en la efectividad de inmunoterapias. Hoy en día no existen terapias que puedan atacar específica y efectivamente a las células tumorales hipóxicas. El desarrollo de este tipo de terapias depende fuertemente en utilizar modelos *ex vivo* que puedan recapitular las condiciones de hipoxia presentes en el microambiente del tumor, lo más cercano posible a la realidad.

Objetivo. Diseñar y validar una plataforma de microfluidos conocida como un tumor-on-a-chip, la cual pueda reproducir robustamente el microambiente de un tumor hipóxico.

Métodos. El modelo de tumor-on-a-chip está constituido por un dispositivo de microfluidos fabricado en polidimetilsiloxano (PDMS) con una cámara central para el cultivo 3D de células tumorales embebidas en una matriz de colágeno, y dos canales adyacentes para la perfusión de medio de cultivo. Los canales se encuentran bloqueados por un microfilamento al momento de inyectar las células embebidas en la matriz y tras la polimerización de la matriz de colágeno, los filamentos son retirados para permitir el contacto del medio de cultivo con las células. Con el fin de impedir la difusión de oxígeno en el chip, una lámina de polimetilmetacrilato (PMMA) de 170- μm de espesor, se embebió en la parte superior del chip.

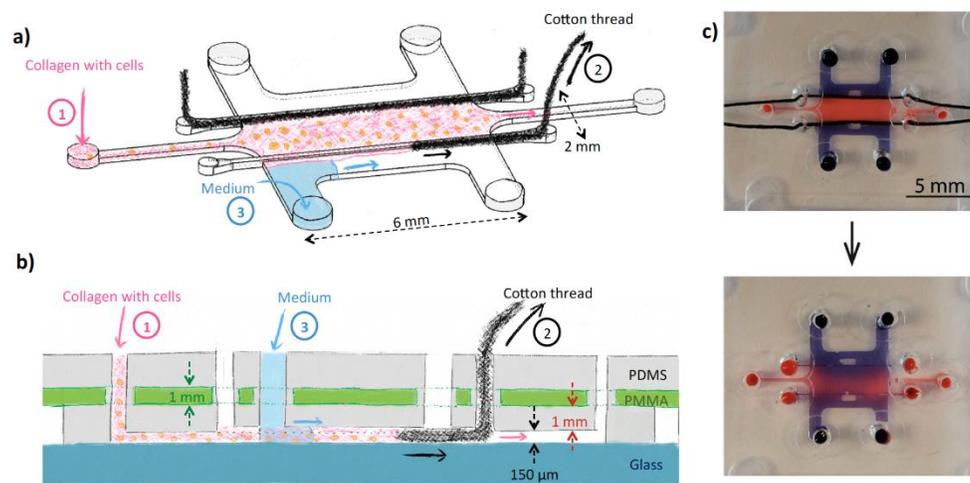


Figura 1. Representación esquemática del tumor-on-a-chip visto desde arriba (a) y lateralmente (b). (c) fotos del dispositivo conteniendo los colorantes azul de tripano y el dextrano marcado con fluoresceína y TAMRA en rojo, antes (arriba) y 5 minutos después (abajo) de remover los filamentos. Figura y texto original se encuentran en : Palacio-Castañeda, V., Kooijman, L., Venzac, B., Verdurmen, W., & Le Gac, S. (2020). Metabolic Switching of Tumor Cells under Hypoxic Conditions in a Tumor-on-a-chip Model.

Micromachines, 11(4), 382. doi:10.3390/mi11040382

Resultados. Utilizando sondas sensibles a diferencias en oxígeno, fue posible confirmar la presencia de regiones hipóxicas en el chip. De igual manera, los efectos en el cultivo 3D de las células tumorales fue investigado utilizando un dextrano cuyos cambios en fluorescencia son sensibles a los cambios en pH y los efectos metabólicos fueron investigados por medio de un análogo de glucosa con un marcador de fluorescencia. Al comparar los dispositivos con y sin la lámina de PMMA, los que contenían la lámina presentaron una reducción en los niveles de oxígeno en la matriz de colágeno al igual que en el pH extracelular. Se observó también un incremento en el consumo del análogo de glucosa 2-NBDG en los chips con la lámina de PMMA, luego de 48h en cultivo, lo que indica un rápido cambio metabólico de las células tumorales bajo las condiciones de hipoxia, conllevando a un aumento en la glucólisis.

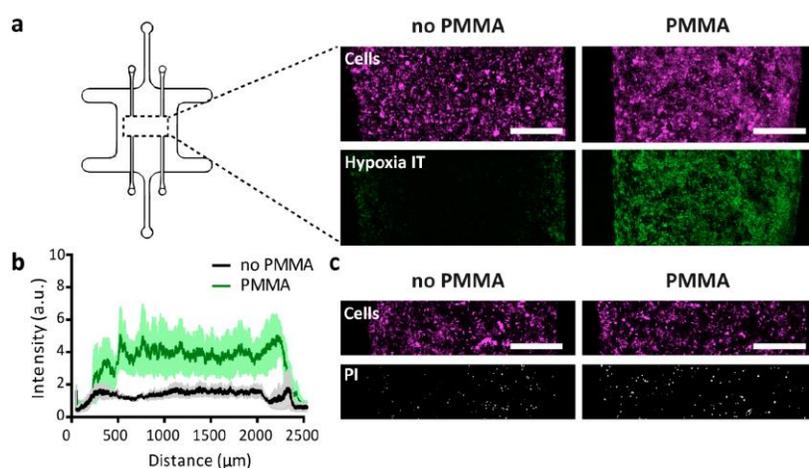


Figura 2. Evaluación de la generación de hipoxia en el tumor-on-a-chip. (a) Cultivos 3D de células tumorales U-251 MG (en magenta) embebidas en colágeno en dispositivos con y sin lámina de PMMA e incubados con la sonda sensible al oxígeno ImageIT (verde). (b) Cuantificación de la intensidad de la sonda ImageIT en los dispositivos mostrados en a. (c) Fotos mostrando similitud en la densidad de células en los dispositivos con y sin PMMA al igual que un porcentaje similar de muerte celular, indicado por el marcaje con yoduro de propidio (PI). Figura y texto original se encuentran en: Palacio-Castañeda, V., Kooijman, L., Venzac, B., Verdurmen, W., & Le Gac, S. (2020). Metabolic Switching of Tumor Cells under Hypoxic Conditions in a Tumor-on-a-chip Model. *Micromachines*, 11(4), 382.

doi:10.3390/mi11040382

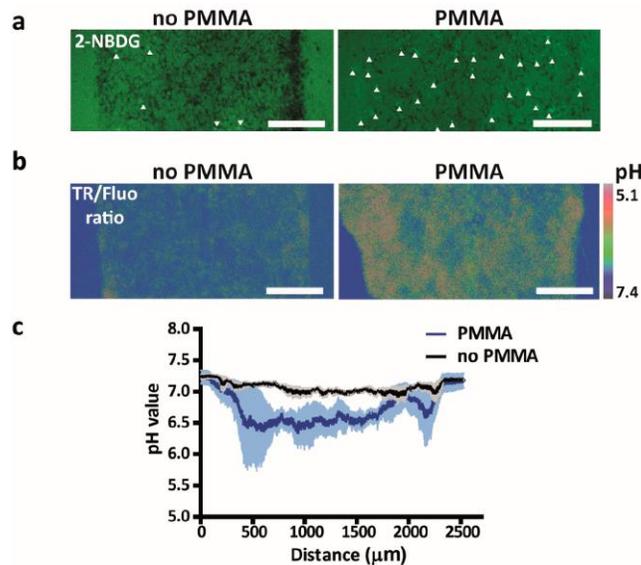


Figura 3. Investigación del cambio metabólico en células U-251 MG cultivadas en la plataforma de tumor-on-a-chip. (a) Consumo de 2-NBDG en dispositivos con y sin lámina de PMMA. Las flechas indican regiones con mayor consumo de 2-NBDG. (b) Imagen representativa de la proporción entre TAMRA y fluoresceína en el dextrano utilizado como sensor de pH. (c) Cuantificación de los valores de pH en el dispositivo, basada en la proporción de intensidades entre TAMRA y fluoresceína. Figura y texto original se encuentran en: Palacio-Castañeda, V., Kooijman, L., Venzac, B., Verdurmen, W., & Le Gac, S. (2020). Metabolic Switching of Tumor Cells under Hypoxic Conditions in a Tumor-on-a-chip Model. *Micromachines*, 11(4), 382. doi:10.3390/mi11040382

Conclusión. En este trabajo, reportamos una plataforma de tumor-on-a-chip en la cual las condiciones de hipoxia presentes en el microambiente de un tumor pueden ser reproducidas en una matriz de colágeno cargado de células tumorales, gracias a la inserción de una lámina de PMMA en la parte superior del dispositivo. Estas condiciones de hipoxia fueron ampliamente reproducibles a través de los dispositivos y llevadas a cabo en una incubadora estándar de cultivo. Esta plataforma abrirá nuevas maneras de estudiar terapias anticáncer orientadas específicamente a las regiones hipóxicas de un tumor.