

Desarrollo, simulación y validación de dispositivos microfluídicos para aplicaciones biológicas: cultivo de líneas celulares, producción de anticuerpos monoclonales y tamizaje de fármacos en protozoarios parásitos

Development, simulation, and validation of microfluidic devices for biological applications: cell line culture, monoclonal antibody production, and drug screening in parasitic protozoa

Doctorando:

Daniel Chamorro Encalada

<https://orcid.org/0009-0007-6046-6784>

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Haedo, Centro INREN, Haedo, Buenos Aires, Argentina

daniel.chamorro89@gmail.com

Director:

Maximiliano Pérez

Codirector:

Betiana Lerner

Resumen

La microfluídica y los dispositivos lab-on-a-chip (LOC) permiten la miniaturización y automatización de procesos biológicos complejos a escalas micro y nanométricas. El objetivo de este trabajo de tesis es desarrollar, simular y validar dispositivos microfluídicos aplicados a tres áreas clave: el cultivo de células mamíferas y madre, la producción intensificada de anticuerpos monoclonales (AcMo) y el tamizaje automatizado de fármacos en protozoarios parásitos. Se diseñó e implementó un biorreactor de gran superficie (LM-biorreactor) en PDMS/vidrio para la producción continua de un anticuerpo recombinante anti-hIFN- α 2b en células CHO, logrando el doble de constante de afinidad (K_a) en comparación con cultivos en frascos T convencionales. Asimismo, se desarrolló un milli-biorreactor con arquitectura de micropilares para el control pasivo de burbujas en el cultivo de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), manteniendo altos niveles de expresión de los marcadores de

pluripotencia Oct4, Nanog y Sox2 durante 5 días. Por último, se aplicó un dispositivo microfluídico dilutor para evaluar 18 compuestos tripanocidas sobre *Trypanosoma cruzi* mediante seguimiento automatizado de motilidad (software TR-KF), identificando al candidato 2161-X con alta potencia ($IC_{50} = 0,2 \mu M$) e índice de selectividad ($SI = 115,6$). En conjunto, estos desarrollos ratifican la microfluídica basada en moldes flexográficos de bajo costo y modelado CFD como una plataforma eficiente, escalable y accesible para la biotecnología y el descubrimiento de fármacos.

Palabras clave: Microfluídica; Lab-on-a-chip; Anticuerpos monoclonales; Células madre; *Trypanosoma cruzi*; Tamizaje de fármacos.

Abstract

Microfluidics and lab-on-a-chip (LOC) devices enable the miniaturization and automation of complex biological processes at micro- and nanoscale levels. The objective of this thesis work is to develop, simulate, and validate microfluidic devices applied to three key areas: mammalian and stem cell culture, intensified production of monoclonal antibodies (mAbs), and automated drug screening in parasitic protozoa. A large-scale microfluidic bioreactor (LM-bioreactor) made of PDMS/glass was designed and implemented for the continuous production of a recombinant anti-hIFN- $\alpha 2b$ antibody in CHO cells, achieving double the affinity constant (K_a) compared to conventional T-flask cultures. Additionally, a milli-bioreactor with a micropillar architecture was developed for passive bubble control during the culture of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), maintaining high expression levels of pluripotency markers Oct4, Nanog, and Sox2 for 5 days. Finally, a microfluidic dilutor device was used to evaluate 18 trypanocidal compounds against *Trypanosoma cruzi* via automated video tracking of motility (TR-KF software), identifying candidate 2161-X with high potency ($IC_{50} = 0.2 \mu M$) and selectivity index ($SI = 115.6$). Overall, these developments confirm low-cost flexographic mold-based microfluidics combined with CFD modeling as an efficient, scalable, and accessible platform for biotechnology and drug discovery.

Keywords: Microfluidics; Lab-on-a-chip; Monoclonal antibodies; Stem cells; *Trypanosoma cruzi*; Drug screening.

Introducción

La microfluídica representa un campo interdisciplinario que combina física, química, biología y ciencia de materiales para manipular volúmenes reducidos de fluidos con alta precisión y bajo costo (Rivas, 2008; Rodríguez et al., 2023). La integración de funciones de laboratorio en sistemas miniaturizados lab-on-a-chip (LOC) ha mejorado sustancialmente la sensibilidad de los ensayos, optimizado el uso de reactivos y minimizado riesgos de contaminación en áreas diagnósticas, modelado de órganos y cribado de fármacos (Whitesides, 2006).

A pesar de sus múltiples ventajas, la adopción masiva de la microfluídica se encuentra frecuentemente limitada por la necesidad de instalaciones complejas de sala limpia para el prototipado. Para superar esta barrera, esta investigación se enfoca en el desarrollo, simulación y validación de dispositivos microfluídicos fabricados mediante metodologías accesibles de bajo costo —combinando fotopolímeros flexográficos y moldes de resina epoxi— aplicados a tres desafíos biotecnológicos concretos: cultivo celular, producción intensificada de biológicos y evaluación de fármacos.

El trabajo se estructura en tres capítulos que articulan diseño asistido por computadora, simulaciones de dinámica de fluidos computacional (CFD) y validación biológica experimental en plataformas de perfusión e imágenes automatizadas.

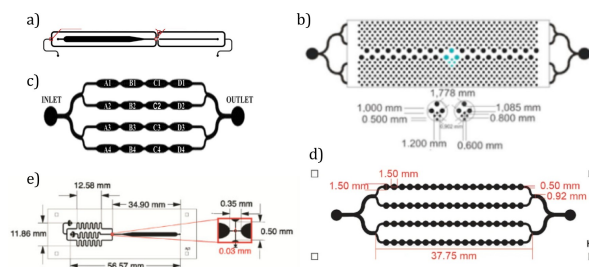


Figura 1. Diseños microfluídicos desarrollados previamente por el equipo de trabajo.

Desarrollo

El desarrollo experimental se organizó en tres ejes metodológicos e ingenieriles principales:

Biorreactor de gran superficie (LM) para producción de biológicos: Se diseñó un dispositivo de gran escala (20×30 cm) fabricado en PDMS/vidrio con 32 microcanales paralelos de 1800 μm de ancho y 200 μm de alto, proporcionando una superficie útil de 184 cm^2 y un volumen interno de 2,8 mL. La geometría incorporó conexiones curvas para prevenir la formación y atrapamiento de burbujas. Tras la caracterización hidrodinámica mediante CFD en COMSOL Multiphysics, se cultivó la línea celular adherente CHO-ahIFN- $\alpha 2\text{b}$ en perfusión continua durante 18 días para producir el anticuerpo recombinante scFv-Fc anti-hIFN- $\alpha 2\text{b}$ (Attallah et al., 2017).

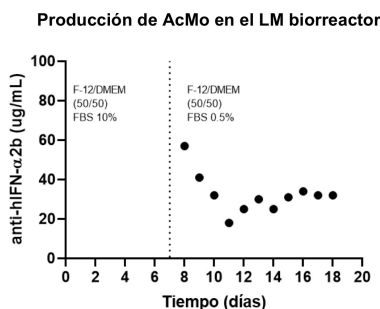


Figura 2. Producción de anticuerpo anti-hIFN- $\alpha 2\text{b}$ en el LM-biorreactor a lo largo del cultivo.

Mili-biorreactor de micropilares para cultivo de hiPSC: Se propuso una cámara microfluídica equipada con una matriz de micropilares diseñada como mecanismo pasivo para desacoplar y remover burbujas de aire sin interrumpir el flujo ni generar estrés de cizallamiento elevado (Grimmer et al., 2019; Zhao et al., 2022). Se evaluaron configuraciones de 3 y 10 pilares a alturas de 270 μm y 2 mm mediante modelado CFD en SolidWorks y ensayos de llenado con colorante. El diseño seleccionado (3 pilares, 2 mm de altura) se utilizó para el cultivo prolongado de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC).

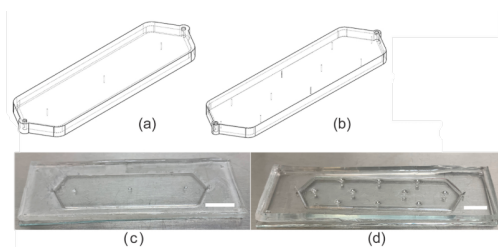


Figura 3. Diseños del chip de micropilares (3 y 10 pilares) y dispositivos fabricados en PDMS/vidrio.

Tamizaje de fármacos antichagásicos mediante LOC: Para hacer frente a la necesidad de nuevos tratamientos para la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi* (World Health Organization, 2023), se implementó un dispositivo microfluídico 'dilutor' de mezcla difusiva (Sun et al., 2019). Este chip genera una gradiente de diluciones seriadas 1:2 de un compuesto y las distribuye en seis pocillos paralelos de cultivo. Se evaluaron 18 compuestos candidatos y el fármaco de referencia benznidazol sobre tripomastigotes de *T. cruzi*, cuantificando la viabilidad mediante seguimiento automatizado de motilidad parasitaria (software TR-KF) y validando posteriormente su efecto sobre la capacidad infectiva en células Vero.

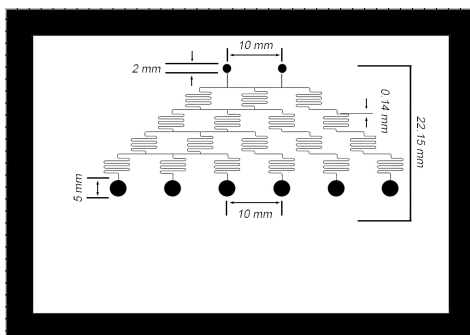


Figura 4. Diseño del chip dilutor utilizado en el cribado de fármacos.

Resultados

En el LM-biorreactor, la producción del anticuerpo anti-hIFN- α 2b comenzó en $\sim 57 \mu\text{g/mL}$ y se mantuvo estable alrededor de $32 \mu\text{g/mL}$ entre el día 12 y 18. Los anticuerpos producidos en este microambiente confinado mostraron una constante de afinidad significativo mayor que los obtenidos en frascos T tradicionales ($K_a = 3,6 \pm 0,3$ vs. $1,8 \pm 0,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$; $p < 0,05$), acompañada de una mayor capacidad neutralizante en ensayos de actividad antiviral e inhibición celular (Attallah et al., 2020).

En el milli-biorreactor de micropilares, la simulación e inspección experimental del flujo demostraron un avance del menisco más regular en el diseño de 3 pilares. La validación biológica con hiPSCs confirmó una elevada confluencia y viabilidad. La expresión de los marcadores de pluripotencia Oct4, Nanog y Sox2 se mantuvo elevada y estable durante 5 días de perfusión continua, según el análisis por RT-qPCR e inmunofluorescencia.

En el ensayo de cribado antichagásico, la cuantificación automatizada mediante el software TR-KF mostró excelente concordancia estadística con el conteo manual tradicional en cámara de Neubauer (IC₅₀ para benznidazol de $6,66 \mu\text{M}$ vs. $6,59 \mu\text{M}$; $p = 0,68$). Entre los 18 compuestos evaluados, 2161-X exhibió la mayor potencia in vitro (IC₅₀ = $0,2 \mu\text{M}$; SI = 115,6). No obstante, en los ensayos de infección secundaria en células Vero, benznidazol mantuvo una mayor capacidad de reducción de la infectividad (4,5% de células infectadas vs. 9,7% con 2161-X), demostrando la importancia de complementar las medidas de motilidad con ensayos funcionales de invasión.

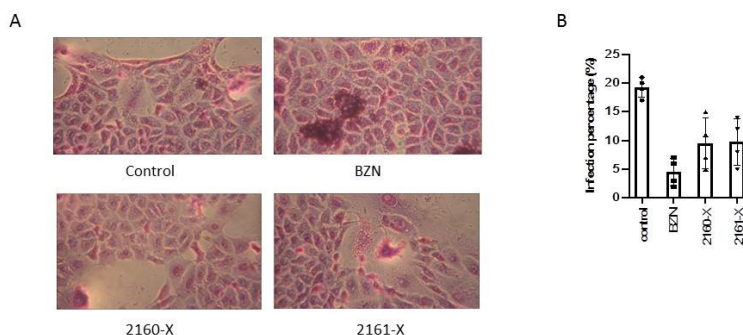


Figura 5. Efecto de los compuestos candidatos sobre la infección de células Vero por T. cruzi.

Conclusiones

Los resultados de esta tesis doctoral demuestran el valor de la microfluídica como plataforma tecnológica para intensificar bioprocesos y optimizar el descubrimiento de fármacos. La estrategia de fabricación basada en moldes fotopoliméricos flexográficos y réplicas de resina epoxi permitió obtener dispositivos de PDMS precisos, de alta fidelidad y bajo costo sin necesidad de salas limpias.

La combinación sistemática de modelado CFD con validación experimental redujo significativamente los ciclos de prototipado. Se validó la capacidad de los dispositivos microfluídicos para mejorar la calidad funcional de anticuerpos monoclonales, mantener la pluripotencia celular en cultivos prolongados y automatizar el tamizaje farmacológico mediante análisis de imágenes. Esta metodología integrada ofrece una infraestructura reproducible y accesible para aplicaciones biomédicas y de salud pública.

Utilización de IA generativa / herramientas IA

Declaro la utilización de herramientas de IA generativa (Claude y Gemini) para la síntesis y adaptación del contenido del trabajo con el fin de ajustar la extensión y estructurar el formato según las pautas requeridas. Confirmando que los contenidos resultantes fueron revisados, validados y editados, asumiendo plena responsabilidad por el contenido presentado en el presente documento.

Referencias

- Attallah, C., Aguilar, M. F., Forno, G., Etcheverrigaray, M., Brigido, M. D. M., Maranhão, A. Q., & Oggero, M. (2020). The glycosylation of anti-rhIFN- α 2b recombinant antibodies influences the antigen-neutralizing activity. *Biotechnology Letters*, 42(8), 1369-1381.
- Attallah, C., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Oggero, M. (2017). A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species. *Protein Expression and Purification*, 132, 27-33.
- Bourguignon, N., Attallah, C., Karp, P., Booth, R., Peñaherrera, A., Payés, C., Oggero, M., Pérez, M. S., Helguera, G., & Lerner, B. (2018). Production of monoclonal antibodies in microfluidic devices. *Integrative Biology*, 10(3), 136-144.
- Bourguignon, N., Olmos, C. M., Sierra-Rodero, M., Peñaherrera, A., Rosero, G., Pineda, P., Vizuite, K., Arroyo, C. R., Cumbal, L., Lasorsa, C., Perez, M. S., & Lerner, B. (2018). Accessible and cost-effective method of PDMS microdevices fabrication using a reusable photopolymer mold. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 56(21), 1433-1442.
- Cadena, M. F., Rosero-Yanez, G., Isa-Jara, R., Belaunzarán, M. L., Giulianotti, M. A., Pinilla, C., Alba Soto, C. D., Perez, M., Lerner, B., & Gimenez, G. (2024). Lab on a chip (LOC) platform for drug screening against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Microchemical Journal*, 203.
- Gharib, G., Bütün, İ., Muganlı, Z., Kozalak, G., Namlı, İ., Sarraf, S. S., Ahmadi, V. E., Toyran, E., van Wijnen, A. J., & Koşar, A. (2022). Biomedical applications of microfluidic devices: A review. *Biosensors*, 12(11), 1023.
- Grimmer, A., Frank, T., Nesch, S., Emmerich, K., & Ertl, P. (2019). Optimized microfluidic circuits for

bubble removal in microfluidic systems.

Niculescu, A.-G., Chircov, C., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4).

Olmos, C. M., Peñaherrera, A., Rosero, G., Vizuite, K., Sierra-Rodero, M., Arroyo, C. R., Debut, A., Cumbal, L., Lasorsa, C., Pérez, M. S., & Lerner, B. (2019). Epoxy resin mold and PDMS microfluidic devices through photopolymer flexographic printing plate.

Rivas, D. F. (2008). Microfluidos: ¿cuánto hay de nuevo? *Rev. Cub. de Física*, 25(2B).

Rodríguez, C. F., Andrade-Pérez, V., Vargas, M. C., Mantilla-Orozco, A., Osma, J. F., Reyes, L. H., & Cruz, J. C. (2023). Breaking the clean room barrier: exploring low-cost alternatives for microfluidic devices. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11.

Rosero, G., Peñaherrera, A., Olmos, C., Boschan, A., Granel, P., Golmar, F., Lasorsa, C., Lerner, B., & Perez, M. (2018). Design and analysis of different models of microfluidic devices evaluated in Enhanced Oil Recovery (EOR) assays. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23(2).

Sun, J., Warden, A. R., & Ding, X. (2019). Recent advances in microfluidics for drug screening. *Biomicrofluidics*, 13(6).

Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368-373.

World Health Organization (2023). Chagas disease (American trypanosomiasis).

Zhao, X., Ma, C., Park, D. S., Soper, S. A., & Murphy, M. C. (2022). Air bubble removal: Wettability contrast enabled microfluidic interconnects. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 361, 131687.