

**Caracterización del
comportamiento de nanopartículas
magnéticas alojadas en células
Natural Killer bajo campos
magnéticos.**



**Antonio Luis Fernández Montero
Máster de Física Médica**

Facultad de Ciencias

Tutora UNED: Cristina Santa Marta Pastrana

Tutora FIBHGM: María Isabel González Gutiérrez

Octubre 2020

Este trabajo se lo dedico
a mis padres,
cimientos de mi vida.
A Jesús y Alba,
los pilares que
me sustentan.
A vosotras,
tejado que me
cobija.

Abstract

Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children ages 2 to 5. Immunotherapy is a type of treatment to fight cancer. One type of immunotherapy uses artificially treated NK cells that attack cancer cells in the red bone marrow. To optimize this therapy, the use of magnetic nanoparticles inside NK cells is essential, since it is possible to guide and reduce the detection time of these cells with cancer cells. To achieve this objective, in recent years research has been carried out using microfluidic platforms called lab on a chip that simulate the behavior of different cells in vitro. In this work, we seek to design, build and evaluate, using analytical and simulated calculations, a lab on a chip for future use with this type of cells.

Keywords: Magnetic nanoparticles, red bone marrow circulation, Lab on a chip.

Resumen

La leucemia linfoblástica aguda pediátrica (LLA) es el cáncer más común en niños de entre 2 a 5 años. La inmunoterapia es un tipo de tratamiento para combatir el cáncer. Un tipo de inmunoterapia utiliza células NK tratadas artificialmente que atacan a las células cancerosas de la médula ósea roja. Para optimizar esta terapia el uso de nanopartículas magnéticas en el interior de las células NK es fundamental pues se consigue guiar y disminuir el tiempo de detección de estas células con las células cancerosas. Para conseguir este objetivo, en los últimos años se están realizando investigaciones que utilizan plataformas microfluidas denominadas *lab on a chip* que simulan el comportamiento de diferentes células in vitro. En este trabajo, se busca diseñar, construir y evaluar, haciendo uso de cálculos analíticos y simulados, de un *lab on a chip* para su uso futuro con este tipo de células.

Palabras clave: Nanopartículas magnéticas, circulación medula ósea roja, *Lab on a chip*.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis hijos, Jesús y Alba, luces que iluminan mi vida, la motivación que me aportan. A mis padres y tita Sisi pues sin ellos no estaría escribiendo estas líneas. A mi Tati, Oncóloga en el Hospital Reina Sofia, por sus revisiones de este manuscrito. A Lourdes, mi mujer, por su apoyo incondicional. A Cristina Santa Marta, Maestra entre las Maestras/os, por su comprensión, saber hacer y estar y por conducirme a poder disfrutar de la investigación. A Isabel González, por sus buenos consejos y ánimos. A José Luis Castillo por hacerme lo difícil, fácil y por ayudarme con este trabajo. A Rubén Díaz por estar siempre ahí y soportar mis infinitas dudas en programación. A Daniel Rodríguez por regalarme su tiempo, dedicación y aportarme conocimientos teóricos y de desarrollo de un trabajo de investigación. Al resto de profesores de este Máster por ayudarme desde sus distintas áreas. Y como no, a mis queridos niños del Instituto La Fuensanta por sus ánimos y cariño.

Muchas gracias a todos.

| | |
|---|-----------|
| Índice de figuras. | VII |
| Índice de gráficas. | VIII |
| 1. Introducción. | 9 |
| 1.1 La leucemia linfoblástica aguda pediátrica. | 9 |
| 1.1.1 Evolución de esta enfermedad. | 9 |
| 1.2 Nanopartículas magnéticas. | 10 |
| 1.2.1 Evolución de las NPMs. | 11 |
| 1.2.1.1 Evolución de las NPMs en Nanomedicina. | 11 |
| 1.3 Nanopartículas aplicadas a los tratamientos del cáncer. | 12 |
| 1.3.1 Evolución de las NPMs aplicadas a los tratamientos del cáncer. | 12 |
| 1.3.1.1 Hipertermia. | 12 |
| 1.3.1.2 Administración de fármacos. | 12 |
| 1.3.1.3 Terapia génica. | 13 |
| 1.3.1.4 Inmunoterapia con NPMs. | 13 |
| 1.4 Utilización de <i>lab on a chip</i> en tratamientos del cáncer. | 14 |
| 1.4.1 Evolución de <i>los lab on a chip</i> . | 15 |
| 2. Objetivos. | 17 |
| 3. Organización del manuscrito. | 18 |
| 4. <u>PRIMER BLOQUE. Estudio teórico, simulación e implementación de la dinámica de NPMs libres.</u> | 20 |
| 4.1 Material y métodos. | 20 |
| 4.1.1 Nanopartículas magnéticas. | 20 |
| 4.1.2 Fluido. | 20 |
| 4.1.3 Agarosa. | 20 |
| 4.1.4 Imán permanente. | 20 |
| 4.1.5 <i>Lab on a chip</i> . | 20 |
| 4.1.6 Microscopio. | 20 |
| 4.1.7 Ordenador. | 21 |
| 4.1.8 Dremel. | 21 |
| 4.2 Estudio físico de la trayectoria de la NPM. | 21 |
| 4.2.1 Movimiento de la NPM influenciada por un campo magnético externo en el microcanal. | 21 |
| 4.2.2 Ecuación del movimiento. | 21 |
| 4.2.3 Fuerza magnética. | 22 |
| 4.2.4 Fuerza fluídica. | 25 |
| 4.2.5 Determinación de la trayectoria de la (NPM). | 26 |
| 4.3 Análisis y evaluación de la deposición de la NPM sobre la superficie del capilar. | 26 |
| 4.4 Migración de la NPM al MMOR. | 26 |
| 4.4.1 Fuerza fluídica. | 28 |
| 4.4.1.1 Ecuación de Darcy. | 28 |
| 4.4.1.2 Expresión de la fuerza fluídica. | 29 |
| 4.4.2 Determinación de la trayectoria de la (NPM). | 29 |
| 4.5 Simulación de las trayectorias de las NPMs. | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.5.1 | Definición de las interfases (físicas) a utilizar. | 30 |
| 4.5.2 | Creación del modelo. | 30 |
| 4.5.2.1 | Definición de las geometrías. | 30 |
| 4.5.2.2 | Definición de los materiales. | 30 |
| 4.5.2.3 | Definición de los parámetros globales. | 31 |
| 4.5.2.4 | Generación de las físicas (interfaces). | 31 |
| 4.5.2.5 | Definición de los estudios. | 31 |
| 4.5.3 | Representación esquemática de la simulación. | 32 |
| 4.6 | Fabricación de una plataforma microfluídica, lab on a chip. | 32 |
| 4.6.1 | Diseño. | 32 |
| 4.6.2 | Construcción. | 33 |
| 4.6.3 | Evaluación. | 36 |
| 4.6.4 | Puesta en funcionamiento. | 36 |
| 5. | <u>SEGUNDO BLOQUE. Estudio teórico y simulación de la dinámica del complejo CNK-NPM.</u> | 37 |
| 5.1 | Materiales y métodos. | 37 |
| 5.1.1 | Células NK. | 37 |
| 5.1.2 | Fluido. | 38 |
| 5.1.3 | MMOR. | 38 |
| 5.1.4 | Introducción de las NPMs en células NK. | 38 |
| 5.2 | Estudio de la trayectoria del complejo CNK-NPM bajo un campo magnético. | 40 |
| 5.2.1 | Ecuación del movimiento. | 40 |
| 5.2.2 | Fuerza magnética. | 40 |
| 5.2.3 | Fuerza fluídica. | 42 |
| 5.2.4 | Fuerzas gravitatoria y de flotabilidad (buoyancy). | 43 |
| 5.2.5 | Determinación de la trayectoria del complejo CNK-NPM. | 43 |
| 5.3 | Migración del complejo CNK-NPM al MMOR. | 44 |
| 5.3.1 | Paso de las células a través del endotelio capilar. | 44 |
| 5.3.2 | Ecuación del movimiento. | 44 |
| 5.3.3 | Fuerza fluídica. | 44 |
| 5.3.3.1 | Ecuación de Darcy. | 44 |
| 5.3.4 | Determinación de la trayectoria del complejo CNK-NPM. | 45 |
| 5.4 | Simulación de las trayectorias de los complejos CNK-NPM en el MMOR. | 45 |
| 6. | Resultados. | 47 |
| 7. | Discusión de los resultados. | 58 |
| 8. | Conclusiones del trabajo. | 60 |
| 9. | Trabajos futuros. | 61 |
| 10. | Bibliografía. | 62 |
| 11. | Webgrafía. | 69 |

Índice de figuras.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de un sistema de Transfección (magnetofección) de placa de múltiples fuentes. | 13 |
| Figura 2. Historia de la inmunoterapia. | 14 |
| Figura 3. Formación del nicho óseo perivascular para análisis de colonización por cáncer de mama. | 15 |
| Figura 4. Diagrama de la metodología seguida en este trabajo. | 19 |
| Figura 5. Fuerzas más importantes que actúan sobre una partícula en un campo de flujo. | 21 |
| Figura 6. Órdenes de magnitud de diferentes fuerzas en función de los diámetros de partículas característicos. | 21 |
| Figura 7. Microambiente de la médula ósea roja. | 23 |
| Figura 8. Representación esquemática del movimiento de las NPMs en el microcanal y MMOR. | 24 |
| Figura 9. Proceso de hematopoyesis. | 27 |
| Figura 10. Tipos de células, diferentes a las células sanguíneas, presentes en el MMOR. | 27 |
| Figura 11 . Principales componentes de la matriz extracelular. | 28 |
| Figura 12. Definición de las dimensiones de cada elemento del <i>lab on a chip</i>. | 33 |
| Figura 13. Construcción del <i>lab on a chip</i>. | 34 |
| Figura 14. <i>Lab on chip</i> construido. | 35 |
| Figura 15. Endocitosis de NPMs en células NK. | 39 |
| Figura 16 .Rotación de control DMF de nanopartículas magnéticas. | 39 |
| Figura 17 . Efecto Fahraeus-Linquist. | 42 |
| Figura 18. Densidad de flujo magnético generada por el imán permanente sobre las NPMs en el microcanal y el MMOR. | 51 |
| Figura 19. Simulación de la trayectoria de las NPMs en el microcanal y el MMOR. | 51 |

Índice de gráficas.

| | |
|--|----|
| <u>Gráfica 1. Fuerza magnética en el eje X sobre la NPM en el microcanal.</u> | 47 |
| <u>Gráfica 2. Fuerza magnética en el eje Y sobre la NPM en el microcanal.</u> | 48 |
| <u>Gráfica 3. Representación de la trayectoria de la NPM en el microcanal.</u> | 49 |
| <u>Gráfica 4. Fuerza magnética en los ejes X e Y sobre la NPM en el MMOR.</u> | 49 |
| <u>Gráfica 5. Representación de la trayectoria de la NPM en el MMOR.</u> | 50 |
| <u>Gráfica 6. Fuerza magnética en el eje X sobre el complejo CNK-NPM en el microcanal.</u> | 53 |
| <u>Gráfica 7. Fuerza magnética en el eje Y sobre el complejo CNK-NPM en el microcanal.</u> | 54 |
| <u>Gráfica 8. Representación de la trayectoria del complejo CNK-NPM en el microcanal.</u> | 55 |
| <u>Gráfica 9. Fuerza magnética en los ejes X e Y sobre el complejo CNK-NPM en el MMOR.</u> | 55 |
| <u>Gráfica 10. Representación de la trayectoria del complejo CNK-NPM en el MMOR.</u> | 56 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La leucemia linfoblástica aguda pediátrica.

La leucemia linfoblástica aguda pediátrica (LLA) [1.] aparece, con mayor probabilidad, en niños de entre 2 a 5 años [1]. Es el cáncer infantil más extendido en estas edades [2]. Esta leucemia es, junto a la leucemia mieloide aguda (LMA) y a la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), las que mayor mortandad producen en niños de entre 1 a 18 años. En España se diagnostican alrededor de 300 LLA al año. La tasa de curación de esta leucemia, en las últimas décadas, es superior al 80%. Esto se debe, entre otros factores, a la identificación de factores pronóstico y a la creación de protocolos terapéuticos según grupos de riesgo. Es de suma importancia el poder tipificar que pacientes pueden sufrir una recaída según los grupos de riesgo. Por ello, es necesario reconocer las futuras recaídas antes de que se produzcan y elaborar protocolos de tratamiento para poder evitarlas [3]. Por tanto, el problema que surge es la recaída y la refractariedad terapéutica que conducen a unas tasas de supervivencia inferiores al 30% con los tratamientos que existen en la actualidad [4].

Dentro de esta leucemia, las células precursoras de células B (BCP)-LLA producen aproximadamente el 80% de los casos de LLA e inciden mayoritariamente en niños, con una incidencia de 3-4 casos por 100,000 cada año. La recaída es debida a la aparición de quimiorresistencia produciendo que la terapia aplicada no haya sido exitosa. Las células BCP-ALL tienen una importante dependencia de las interacciones con el microambiente de la médula ósea roja (MMOR). Este, produce las regulaciones esenciales para la proliferación, supervivencia y resistencia a los medicamentos de estas células. Esto puede conllevar al fracaso del tratamiento y a la recaída de la enfermedad. De ahí la importancia del análisis del MMOR. Dentro del MMOR, se encuentran las células mesenquimales estromales (CMEs) que se caracterizan por ser soporte esencial del microambiente leucémico hematopoyético. Esto se debe a que son capaces de definir nichos exclusivos del MMOR donde se alojan las células leucémicas creando una barrera y perjudicando al desarrollo hematopoyético normal, además de crear una resistencia a la quimioterapia. Además, las quimiocinas podrían ayudar al desarrollo de BCP-ALL al conducir la migración de estas células leucémicas hacia esos nichos, así como al generar señales antiapoptóticas [5].

1.1.1 Evolución de esta enfermedad.

La detección, tratamiento y descubrimiento de nuevos subtipos de esta enfermedad ha ido evolucionando con el tiempo. A finales de los años 40, Farber et al.(1948) dieron el primer paso en la era de la quimioterapia. Utilizando aminopterina, un antagonista del ácido fólico, descubrieron una "remisión temporal" de la leucemia aguda en cinco niños.

En la década de los 60, Frei et al. (1961) consiguieron un logro importante en la terapia de esta enfermedad. Obtuvieron una tasa de remisión completa del 59% y una tasa de supervivencia de, aproximadamente, dos años utilizando mercaptopurina y metotrexato en 39 pacientes. En esta misma década se inició un nuevo enfoque curativo ("terapia total") para poder tratar la LLA. Este nuevo enfoque estaba compuesto por diferentes tipos de terapia: terapia de inducción a la remisión, terapia dirigida al sistema nervioso central (SNC) con irradiación craneal y metotrexato intratecal, terapia de intensificación (consolidación) y tratamiento de continuación. Estas cuatro terapias siguen siendo la columna vertebral de los tratamientos de LLA.

En los años 70 se realizaron estudios aportando que la terapia de intensificación aplicada justo después de la terapia de la inducción a la remisión podría aumentar las tasas de curación hasta un 70%. También se introduce la triple terapia intratecal con metotrexato, hidrocortisona y citarabina y dosis intermedia de metotrexato intravenoso para evitar la irradiación craneal profiláctica [6]. En 1975 se describe por primera vez la actividad de las células NK [7].

En la década de los 80 se implanta la terapia basada en el riesgo y comienzan los trasplantes de médula ósea como terapia para niños con leucemia refractaria o reincidente [8]. En 1988 aparece la terapia celular adoptiva (TCA) [9]. En la TCA se aíslan células T del paciente para su modificación y multiplicación y posterior reinyección al mismo. Recientemente también se han

utilizado células NK. Un año más tarde se informa de la primera utilización de células T diseñadas genéticamente para ser derivadas y modificadas y de esta manera poder atacar a las células cancerosas [7]. A mediados de esta década comienza a aplicarse la nanotecnología en medicina con la utilización de nanoportadores en ensayos clínicos [10].

En los años 90 se implantan las "dosis personalizadas" [6]. Se introducen, en los estudios de la LLA, los conocimientos y las herramientas de la biología molecular y se crea un sistema uniforme de calificación de riesgo [8]. A mediados de la década de 1990 aparecen por primera vez las células T antigénicas quiméricas (células T CAR) [7]. En 1997, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) aprueba el primer anticuerpo monoclonal, el Rituximab, para tratar el cáncer, el linfoma no Hodgkin [10]. El fármaco busca a las células B inmaduras para eliminarlas utilizando células NK [7]. A mediados de esta década empiezan a comercializarse productos derivados de la nanotecnología basados en liposomas y conjugados polímero-proteína [10].

A finales de la primera década del siglo XXI, introducción del imatinib para mejorar el resultado en el tratamiento temprano de la LLA positiva para el cromosoma Filadelfia [6], utilización de una forma de acción prolongada de PEG L-asparaginasa para pacientes recién diagnosticados, y aprobación de la nelarabina y clofarabina, para pacientes con LLA de células T refractaria o reincidente y pacientes con LLA refractaria o reincidente, respectivamente [8].

En estos últimos años, se ha avanzado bastante en la investigación de células CAR-T y CAR-NK. La FDA aprueba, por primera vez, en 2017 la utilización de células CAR-T para una enfermedad, la leucemia linfoblástica aguda recurrente de células B en niños. Seguidamente, en el 2018, se aprueba la aplicación en el linfoma difuso de células B grandes y en otros tipos de linfomas [7].

En los últimos 4-5 años, instituciones tanto de Estados Unidos como, últimamente, de China han evolucionado notablemente en este tipo de tratamiento [4].

El Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2018 se concede a James P. Allison y Tasuku Honjo por sus contribuciones a la terapia contra el cáncer e inhibición de la regulación inmune negativa [11].

1.2 Nanopartículas magnéticas.

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) son partículas que experimentan una fuerza cuando se encuentran influenciadas por un gradiente de campo magnético. Estas NPMs se aplican en un gran número de campos como pueden ser la ingeniería, la microbiología, la nanomedicina o la biotecnología. En estas tres últimas disciplinas, las NPMs se utilizan para diferentes fines. Algunos ejemplos son: la magnetoforesis, la entrega de medicamentos a células diana o el dirigir células a tumores. En nanomedicina, sus usos más frecuentes se encuentran en biosensores, hipertermia de fluido magnético (HFM), imágenes por resonancia magnética (IRM) y administración magnética de fármacos y genes.

Algunas de sus propiedades más importantes estriban en poder ser funcionalizadas en su superficie para poderse unir a biomateriales o poder introducirse en el citoplasma de células.

La magnetita (Fe_3O_4), es el material más común utilizado en las NPMs. Es un material no tóxico. Los organismos vivos lo toleran bien si es sintetizado. Cuando las NPMs se encuentran en el rango de 1 a 100 nm se convierten en superparamagnéticas. Esta propiedad provoca que las NPMs sean fácilmente magnetizadas por un campo magnético pero vuelven a su estado de desmagnetización cuando se suprime el efecto del imán. Sobre las NPMs se crea una fuerza cuando su momento dipolar, inducido por el imán, se acopla a un gradiente de campo magnético. Cuando desaparece este, las NPMs pierden esta fuerza. Otro agente que influye en la magnetización de las NPMs es el medio en el que se encuentran. Los fluidos como el suero fisiológico o la sangre típicamente tienen un nivel bajo de susceptibilidad magnética intrínseca. Este hecho produce que actúen como sustancias "transparentes" al campo magnético [12].

1.2.1 Evolución de las NPMs.

Las primeras referencias que se tienen de la utilización de nanopartículas se remontan al siglo IV DC en una copa Romana, la Copa Lycurgus, en exhibición en el Museo Británico de Londres. Esta Copa posee incrustaciones de vidrio dicróico. Esta propiedad se debe a la presencia de nanopartículas coloidales de plata y oro. Estas confieren al vidrio diferentes colores, dependiendo de la incidencia de la luz sobre él. El vidrio torna a rubí cuando la copa es iluminada desde atrás y a verde cuando se la ilumina frontalmente.

Otro ejemplo de utilización de nanopartículas coloidales de plata y oro se encuentra en las ventanas de Iglesias medievales tardías. Los cristales de estas ventanas alojan estas nanopartículas que producen un brillo rojo y amarillo.

También, aparecen nanotubos de carbono en una espada damascena del siglo XVII que le confieren elasticidad y resistencia [13].

En los años 40, los óxidos de hierro, como el Fe_2O_3 (nanopartícula magnética) adquirieron relevancia en el campo de la grabación magnética, siendo Poulsen en 1900 pionero en este tipo de grabación. En esta ocasión, estas se utilizaron como coloide, suspendidas en un disolvente. Posteriormente, se depositaron y unieron, con un aglutinante polimérico, a una película delgada de plástico. La obtención de la información almacenada era similar a la captación de imágenes por microscopía de fuerza magnética. En 1948, Néel propuso un modelo formal del ferrimagnetismo incluyendo a la maghemita [14].

1.2.1.1 Evolución de las NPMs en Nanomedicina.

La introducción de la hipertermia como herramienta para el calentamiento selectivo de órganos se produjo en 1957, por Medal y sus compañeros de trabajo utilizando nanopartículas de Fe_2O_3 de tamaño 20-100 nm [15].

El comienzo de la quimioterapia se produjo a principios del siglo XX por Paul Ehrlich. Esté intentó realizar "balas mágicas" cargadas con drogas para atacar patógenos. Fue la primera acción terapéutica específica de esta clase. Las primeras nanopartículas utilizadas para la terapia farmacológica dirigida se desarrollaron a finales de la década de 1960 por Peter Paul Speiser [16].

Las NPMs también se han introducido para mejorar la obtención de imágenes por IRM. Se introdujeron, por primera vez, a mediados de los años 80, como agentes de contraste de resonancia magnética [17].

A principios de los años 90, se consiguió que nanopartículas modificadas pudieran transportar ADN y genes. Además, en colaboración con anticuerpos, las nanopartículas pudieron ser alojadas en el interior de las células. Otro avance en la utilización de nanopartículas fue el descubrimiento, en 1986, del efecto EPR (permeabilidad y retención mejoradas) a cargo de Yasuhiro Matsumura e Hiroshi Maeda. Este efecto explica la tendencia de las nanopartículas a depositarse, en mayor medida, en los vasos inmaduros y con amplias fenestraciones que aparecen en los tumores que en los tejidos sanos [13].

En marzo de 2003, se realizó el primer estudio clínico sobre la aplicación de hipertermia inducida por nanopartículas influenciadas por campos magnéticos en 14 pacientes que padecían glioblastoma multiforme [15].

En la última década, se han producido grandes avances en un campo emergente, la espintrónica de semiconductores. Esta se aplica a los dispositivos nanoelectrónicos de próxima generación. Estos dispositivos espintrónicos se han propuesto para su utilización en diversas aplicaciones biomédicas. Estas aplicaciones incluyen plataformas de reconocimiento biomolecular estáticas o dinámicas (ADN-ADNc, anticuerpo-antígeno, fagos-bacterias, ...), citómetros, dispositivos de separación celular, plataformas de bioensayo lateral, dispositivos basados en microelectrodos para aplicaciones neuroelectrónicas y matrices de sensores híbridos para aplicaciones de imágenes [18][19].

Otro campo que está surgiendo tanto en el diagnóstico como en la terapia es la Teranosis. En

el tratamiento del cáncer, la Teranosis utiliza una nanoplataforma constituida por nanopartículas magnéticas sobre la que acoplan múltiples dispositivos con objetivos diagnósticos y terapéuticos [20].

En los últimos años han surgido dispositivos nanomagnéticos como los biosensores con transistores de efecto nano campo o las terapias de inducción magnética de radiofrecuencia, debido al desarrollo de nanomateriales médicos. La función de los biosensores con transistores de efecto nano campo es la de detectar la carga de las biomoléculas. Cuando un biosensor detecta una biomolécula cargada esta biomolécula afecta a la densidad de carga del biosensor. Además, se ven afectadas tanto la conductividad del transistor de efecto nano campo como el desplazamiento del punto de Dirac (conductividad más baja). En consecuencia, la secuencia de biomoléculas se detecta por cambio en las señales eléctricas [21].

1.3 Nanopartículas aplicadas a los tratamientos del cáncer.

Como consecuencia de los grandes avances en la síntesis y acoplamiento de biosensores en las NPMs se han conseguido mejoras sustanciales en diferentes tipos de aplicaciones de interés en medicina como las enumeradas en el apartado precedente.

Las NPMs se utilizan en diferentes terapias para combatir el cáncer [2.]. En algunas de ellas, como la hipertermia, las NPMs alojadas en el interior de una célula vibran, al estar sometidas a un campo magnético variable y calientan el interior de la célula hasta destruirla.

Otra función de las NPMs es la de transportar medicamentos hasta las células tumorales, introduciéndolos en el interior de ellas. También, pueden transportar genes y radionucleidos para introducirlos en los núcleos y citoplasmas, respectivamente, de las células [22].

En inmunoterapia, la función de las NPMs en el interior de las células es la de dirigir las trayectorias de estas para llegar lo antes posible a las células cancerosas. Este movimiento se consigue gracias a un imán permanente situado en el exterior. Una propiedad importante en este tipo de procesos es la permeabilidad magnética. Los glóbulos blancos son diamagnéticos. Por tanto, repelen el campo al que están sometidos. Este hecho, junto al poseer una susceptibilidad magnética baja, generan dificultades a la hora de producir el movimiento deseado bajo la aplicación de un campo magnético externo [23].

1.3.1 Evolución de las NPMs aplicadas a los tratamientos del cáncer.

1.3.1.1 Hipertermia.

El estudio de la hipertermia comenzó en 1991 por parte de Roizin-Towle y Pirro que analizaron la sensibilidad de varios tipos de células expuestas a hipertermia. Llegaron a la conclusión de que la hipertermia era terapéuticamente eficaz si se localizaba específicamente en el tejido tumoral. En los primeros años de la segunda década del siglo XXI se producen significativos avances en el estudio y aplicación de la hipertermia. Esta, dirigida específicamente a las células cancerosas, aplicada mediante el uso de nanopartículas calentadas con campos magnéticos alternos se ha usado como un nuevo tratamiento frente al cáncer [24].

1.3.1.2 Administración de fármacos.

Los primeros intentos de focalización magnética de fármacos se remonta al 1970, siendo su eficacia, el número de moléculas efectoras o la concentración que se requiere para conseguir un efecto deseado, bastante pobre [25].

La terapia frente al cáncer utilizando NPMs para la administración magnética de fármacos se introdujo por primera vez en la década de los 80 por Widder et al.(1980) y Kost y Langer, en 1986. En las dos últimas décadas, se han publicado bastantes revisiones sobre la administración magnética de fármacos. En los últimos años se han producido grandes avances en esta terapia como consecuencia del desarrollo de imanes más fuertes y sondas magnéticas de más alta sofisticación con múltiples funciones, es decir, sondas teranósticas por parte de Nan et al.(2017), Sun, Q.et al.(2018) y Tang et al.(2018). Estas sondas cumplen dos funciones. La primera es una función diagnóstica, a través de imágenes por resonancia magnética (IRM) o imágenes por

partículas magnéticas. La segunda, es una función terapéutica, que podría contener hipertermia y liberación de fármacos, así como administración de fármacos dirigida [25].

1.3.1.3 Terapia génica.

Otro tipo de terapia asociada al tratamiento contra el cáncer es la transfección genética (figura 1). Esta técnica consiste en la introducción de ácidos nucleicos en las células utilizando NPMs. Durante los últimos 50 años se han investigado y desarrollado diferentes usos para el suministro de ácidos nucleicos en la investigación virológica y han surgido los primeros conceptos visionarios de la terapia génica.

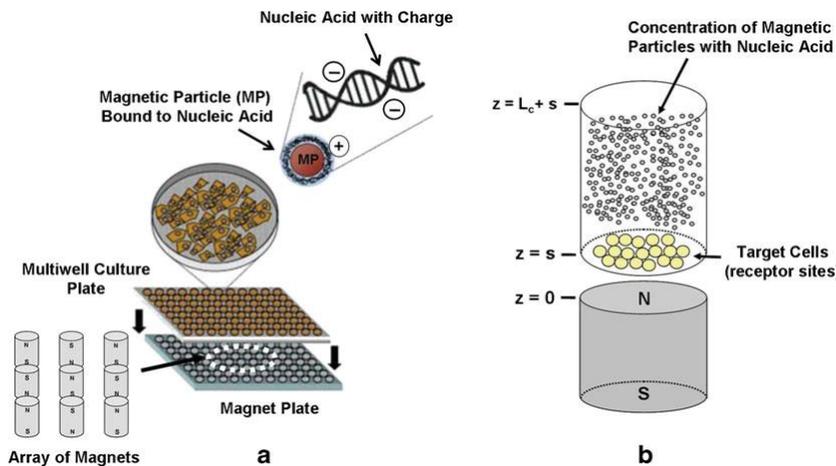


Figura 1. Esquema de un sistema de Transfección (magnetofección) de placa de múltiples fuentes: (a) placa de petri con cultivos celulares situados sobre una matriz de imanes cilíndricos, (b) el campo magnético genera una fuerza sobre las NPMs, con genes en su superficie, hacia las células. Imagen de (Edward P Furlani et al.(2008)) [12]

El primer ensayo clínico de terapia génica se realizó en 1990, generándose, posteriormente, más de 1600 ensayos clínicos. De estos ensayos, los que han tenido éxito terapéutico, se realizaron a finales de la primera década del siglo XXI. La idea del suministro de ácidos nucleídos utilizando NPMs aparece en la literatura de patentes en 1996 y 1998, con poca evidencia experimental. En el año 2000, surge el término transfección, refiriéndose a "la entrega de ácidos nucleídos bajo la influencia de un campo magnético que actúa sobre los vectores de ácidos nucleídos que están asociados con (nano) partículas magnéticas" [25].

En las últimas décadas, se han tratado enfermedades como cánceres, enfermedad de Parkinson, enfermedades cardiovasculares o el síndrome inmunodeficiencia adquirida (SIDA), con terapia génica. Para ello, se han introducido y/o modificado secuencias de genes. En el 2014, Hartono, S.B et al.(2014) utilizaron NPMs conjugadas con nanosistemas basados en sílice, como vectores, para mejorar la administración de siRNA en células cancerosas de osteosarcoma. Además, también han sido utilizadas para otras aplicaciones como la obtención de imágenes o la administración de fármacos [26].

1.3.1.4 Inmunoterapia con NPMs.

"La inmunoterapia contra el cáncer es una estimulación artificial del sistema inmunológico para reconocer las células cancerosas y activar células inmunitarias específicas para detectar y atacar las células cancerosas. En ensayos clínicos, la inmunoterapia ha mostrado recientemente resultados impresionantes en el tratamiento de cánceres múltiples. Por lo tanto, la inmunoterapia contra el cáncer ha ganado mucha atención por sus ventajas únicas y su futuro prometedor. Con una amplia investigación sobre la inmunoterapia contra el cáncer, se ha revelado gradualmente su seguridad y eficacia. Sin embargo, sigue siendo un gran desafío expandir e impulsar esta terapia mientras se mantiene una baja toxicidad, una alta especificidad y una eficacia duradera.

están aportando grandes avances en el ámbito científico debido al uso de estas tecnologías. Con ello, se han conseguido sistemas que son capaces de diagnosticar a tiempo real y *ex vivo* anomalías o enfermedades del paciente. Además, en los últimos años, la comunidad científica ha aportado tecnologías de última generación que son capaces de detectar, con dispositivos portátiles, enfermedades de personas ubicadas en cualquier lugar del planeta y para cualquier nivel socio económico.

1.4.1 Evolución de los *lab on a chip*.

A mediados de los años 50 se introdujo el concepto de enfoque hidrodinámico para visualizar células en un flujo por Crossland-Taylor. Esta técnica ha posibilitado el poder manipular y administrar con precisión células inmersas en un líquido dentro de capilares estrechos [34].

La microfluídica comenzó a principios de la década de 1980, tratando el comportamiento del flujo y controlando al fluido que se encuentra restringido geoméricamente a una escala submilimétrica [34][35][36].

En la primera década del siglo XXI surgió la tendencia de la utilización de *lab on a chip* para la preparación de muestras y para poder aislar y analizar células. Estas células se separaban por diferentes técnicas como las hidrodinámicas, las dielectroforéticas, las inmunoquímicas y las magnetoforéticas de forma independiente o como combinación de varias [37].

Se han producido avances recientes en el campo del *lab on a chip* a partir de la nano / microfluídica para conseguir nuevas aplicaciones y funcionalidades en los campos de la biología molecular, el análisis genético y la proteómica. Esto conduce a un mayor acercamiento a la comprensión de la biología celular. Más concretamente, la microfluídica ha facilitado herramientas innovadoras para mejorar la investigación biológica celular. Con la microfluídica se puede controlar con precisión el entorno celular, imitarlo mediante la multiplexación y estudiar la información subcelular mediante ensayos de detección de alto contenido a nivel unicelular. Para ello, se han realizado, en microfluídica, diversas técnicas de manipulación celular. Estas técnicas pueden ser clasificadas en función de las fuerzas aplicadas externamente para la manipulación: ópticas, magnéticas, eléctricas, mecánicas y otras manipulaciones [34].

Uno de los avances más prometedores en los *lab on a chip* para crear el MMOR es la creación de los *niches on a chip* (figura 3) (figura 7) [3]. Estos nichos están constituidos por un *lab on a chip* sobre el que se depositan células endoteliales humanas y células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. Ambos tipos de células se cultivan en una matriz ósea nativa y se coloca en el *lab on a chip*. La función de este *niches on a chip* es aportar la mayor similitud posible al MMOR original [38].

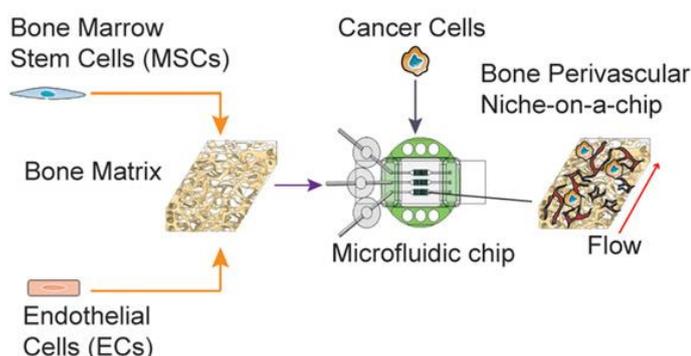


Figura 3. Formación del nicho óseo perivascular para análisis de colonización por cáncer de mama. Se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) y células endoteliales (CE) derivadas de la médula ósea humana en monocapas y en matriz ósea descelularizada en 3D. El cultivo involucró 1 semana en medio endotelial (EM). Posteriormente, 1 semana en medio de suero reducido (SRM), o 2 semanas en EM. Pasada una semana de cultivo estático, se introdujeron células cancerosas en el tejido óseo y se inició la perfusión en el *lab on a chip*. Imagen obtenida de (Marturano-Kruika A. et al.(2017)) [3].

Para poder contrastar los resultados obtenidos, una herramienta eficaz es realizar una simulación. Para ello, se puede utilizar el programa COMSOL Multiphysics® que es versátil e intuitivo en su forma de proceder y con una interfaz fácil de entender.

2. OBJETIVOS

Este TFM tiene dos finalidades. La primera es el diseño, fabricación, evaluación y puesta en funcionamiento de un *lab on a chip* ([figura 13](#)) y ([figura 14](#)) por el que circulan NPMs a través de un microcanal que posteriormente migran al MMOR debido a un campo magnético permanente externo. Para poder validar el funcionamiento de este *lab on chip* se evaluarán los diferentes parámetros (fuerza magnética, fuerza fluídica, etc.) que intervienen en el movimiento de las NPMs tanto en el microcanal como en el MMOR. Para ello, se realizarán un estudio analítico y una simulación. Los resultados que de este estudio y simulación deriven servirán como base para evaluar e identificar posibles errores en la fabricación del *lab on a chip*. Los resultados aportados por el análisis, simulación y experimentación han de ser similares.

Por último, y una vez obtenidos los datos anteriores, se pueden optimizar el tamaño y características tanto del imán permanente como el de las NPMs.

La segunda finalidad es el análisis y la obtención de datos, de manera simulada, del movimiento del complejo CNK-NPM. Esta finalidad se debe a una futura fabricación, siguiendo los mismos criterios del *lab on a chip* construido, de un *lab on a chip* por el que circule el complejo CNK-NPM. Este *lab on a chip* servirá para el estudio del movimiento del complejo CNK-NPM en leucemias linfoblásticas agudas pediátricas. El estudio se preparará para el Grupo de Investigación Traslacional en Cáncer Infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Paz (idiPAZ) (Madrid).

3. ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO.

El TFM está dividido en dos bloques. El primero genera información tanto simulada como experimental del movimiento de nanopartículas magnéticas libres (NPMs). El segundo realiza un análisis utilizando una simulación del movimiento de células NK (Natural Killer) en cuyo interior se alojan NPMs (complejo CNK-NPM).

Primer bloque: estudio teórico, simulación e implementación de la dinámica de NPMs libres.

En el primer bloque se incluyen dos módulos.

El primero versa sobre la aplicación de los conceptos físicos involucrados en el movimiento de NPMs. Estas NPMs se encuentran influenciadas por campo magnético externo. Las NPMs circulan en el interior de un microcanal (sinusoide en la médula ósea) y, posteriormente, avanzan hacia el MMOR. Para poder evaluar este movimiento se realizan dos análisis. El primero, con cálculos analíticos. El segundo, con una simulación con el programa de simulación (COMSOL 5.4).

En el segundo módulo, se realiza el diseño, construcción, evaluación y puesta en funcionamiento de una plataforma microfluídica. Esta plataforma microfluídica queda definida como un *lab on a chip*. En el interior de este *lab on a chip* circularán las NPMs, las cuales se encuentran influenciadas por el mismo campo magnético externo expresado anteriormente.

Este bloque tiene como objetivo la obtención de datos, tanto simulados (primer módulo) como experimentales (segundo módulo), del movimiento de NPMs para poder analizar su dinámica y poder validar empíricamente los resultados de la simulación.

Segundo bloque: estudio teórico y simulación de la dinámica del complejo CNK-NPM.

En el segundo bloque se realiza, en primer lugar, un estudio teórico. Posteriormente, se genera una simulación del movimiento del complejo CNK-NPM. Este movimiento del complejo CNK-NPM comienza en el microcanal para terminar migrando al MMOR donde se origina la LLA. Para ello, este bloque se divide en dos módulos.

En el primero se realiza un estudio pormenorizado de las células NK, de las NPMs, de la endocitosis de éstas en las células NK y de los diferentes factores involucrados en la simulación. El segundo es la simulación propiamente dicha.

La simulación consiste en la generación de las trayectorias de los complejos CNK-NPM, inmersos en un fluido (sangre) que fluye por el interior de un vaso sanguíneo (sinusoide) y bajo la influencia de un campo magnético externo. Estas células NK se moverán hacia el endotelio vascular, situándose sobre el mismo. Seguidamente, migrarán hacia el MMOR por el que continuarán su desplazamiento hasta detectar a las células cancerosas. Para poder simular lo anteriormente expuesto, han de definirse los diversos conceptos físicos que emanan del sistema en estudio, las propiedades de cada uno de los elementos que constituyen los diferentes tejidos (sanguíneo, epitelial y conectivo) y la definición de sus geometrías.

Este segundo bloque tiene como objetivo el análisis y la obtención de datos, de manera simulada, del movimiento del complejo CNK-NPM.

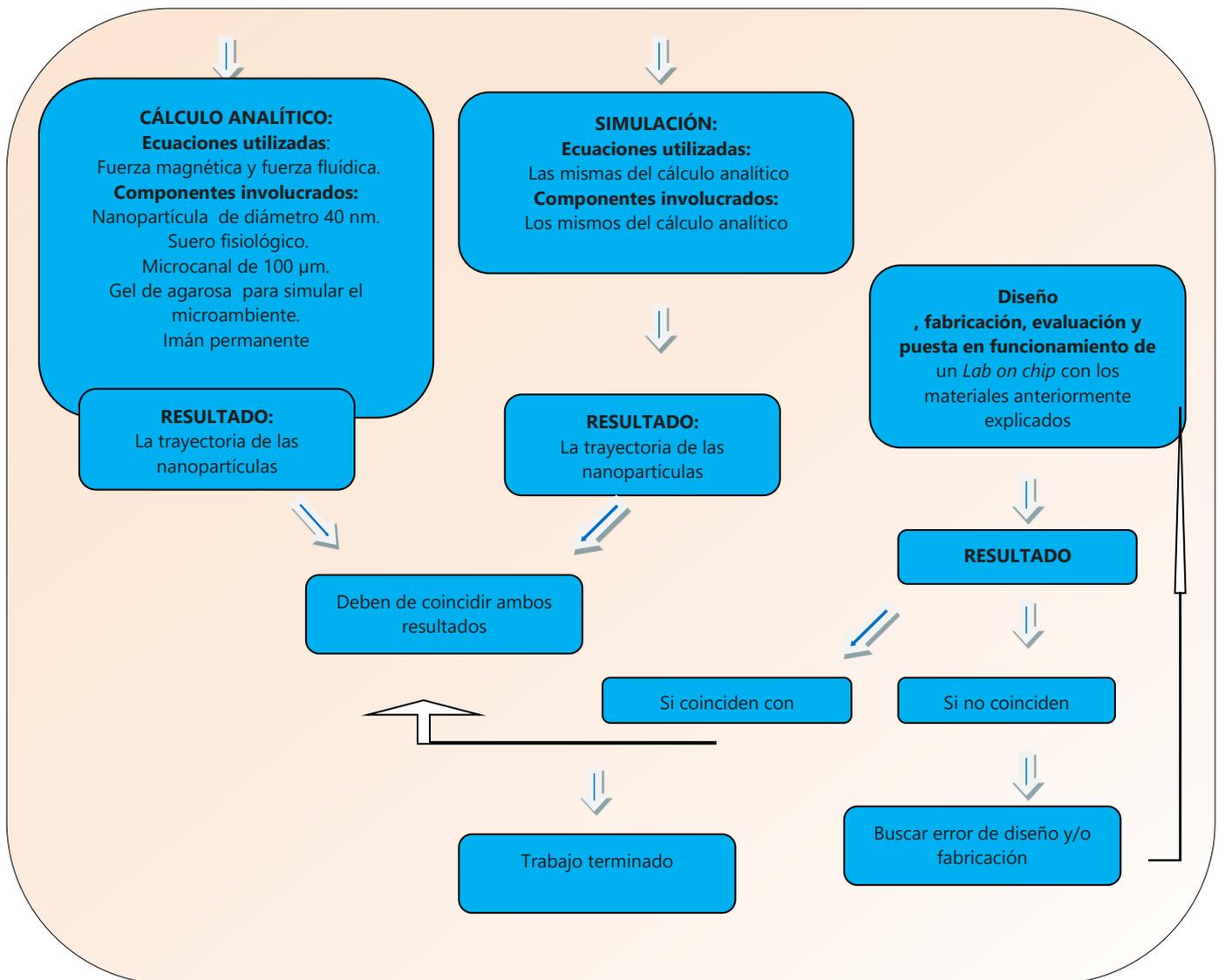


Figura 4. Diagrama de la metodología seguida en este trabajo.

4. PRIMER BLOQUE. Estudio teórico, simulación e implementación de la dinámica de NPMs libres.

4.1 Materiales y métodos.

4.1.1 Nanopartículas magnéticas.

Para evaluar la fuerza magnética generada en las NPMs era imprescindible definir primero sus características [4.]. Las NPMs se adquirieron a través de una marca comercial (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, USA) y tenían un diámetro de 40 nm, fabricadas con Fe_3O_4 (magnetita). Su densidad y magnetización de saturación eran $\rho_p = 5000 \text{ kg/m}^3$ y $M_{sp} = 4.78 \cdot 10^5 \text{ A/m}$, respectivamente [39].

4.1.2 Fluido.

Para dejar completamente definida la fuerza magnética en las NPMs hubo que caracterizar las propiedades del fluido por donde estas circulaban. Este fluido se asumió como paramagnético (no magnético), por lo que su susceptibilidad magnética fue $\chi_f = 0$ y su permeabilidad magnética la del vacío, $\mu_f \approx \mu_0$ [23].

El fluido que se utilizó en el primer bloque fue suero fisiológico. Este suero tenía propiedades bastante similares a la del plasma sanguíneo y era fácil de conseguir y de conservar sin que se alterasen sus propiedades [40]. La viscosidad y densidad del suero fisiológico son, respectivamente, $\eta = 1.02 \cdot 10^{-3} \text{ N s/m}^2$, y $\rho_f = 1005 \text{ kg/m}^3$ [41].

4.1.3 Agarosa.

Para poder simular el MMOR se utilizó un hidrogel (gel de agarosa al 0.2% volumen/peso) con permeabilidad $k = 5.1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2$ [42] y porosidad 99.6 % . Se supuso que la viscosidad era igual a la del agua, $\eta = 10^{-4} \text{ N s/m}^2$ a 25°C [43] . Al igual que el fluido, este hidrogel se tomó como material paramagnético con susceptibilidad magnética $\chi_f = 0$ y permeabilidad magnética la del vacío , $\mu_f \approx \mu_0$.

4.1.4 Imán permanente.

Se utilizó un imán permanente para generar la fuerza magnética sobre las NPMs. Este imán tenía forma rectangular, con calidad N45 (neodimio) y dimensiones de 10 mm de ancho, 20 mm de profundidad y 2 mm de espesor. La magnetización de saturación fue de $M_s = 1.35 / (4 \cdot \pi \cdot 10^{-7}) = 10.7 \cdot 10^5 \text{ A/m}$, la intensidad de campo magnético de $H_a = 1.07 \cdot 10^6 \text{ A/m}$ y la densidad de campo magnético de $B_r = 1.35 \text{ T}$.

4.1.5 Lab on a chip.

Para reproducir experimentalmente el movimiento de las NPMs a través del microcanal se fabricó un *lab on a chip* fabricado en PMMA (polimetilmetacrilato) con un microconducto de $100 \mu\text{m}$ de anchura por $100 \mu\text{m}$ de profundidad y 18 mm de longitud, con dimensiones similares al vaso sinusoide simulado.

Para generar experimentalmente el movimiento de las NPMs en el MMOR se utilizó un hidrogel de agarosa que simulaba a este. El tamaño del MMOR considerado era el de la epífisis distal del fémur de un niño con 6 años de edad. Teniendo en cuenta que, para una misma edad el crecimiento infantil es diferente de unos niños a otros, se tomó como valor medio de este MMOR el de 60 mm de ancho y 18 mm de alto [44].

4.1.6 Microscopio.

Se utilizó un microscopio Zuzi modelo M_HB10 dispuesto en horizontal para poder registrar el movimiento de las NPMs en el microcanal y en el hidrogel. Para ello, se situó sobre ellos un portaobjetos. Se utilizó un objetivo de apertura numérica (NA) de 10X, 0,25. Se realizó micromanipulación para ajustar la posición del objetivo con respecto al *lab on chip*. Para la obtención de imágenes se utilizó una cámara WEBCAM C923e

4.1.7 Ordenador.

Para poder capturar digitalmente las imágenes obtenidas con el microscopio se utilizó un ordenador con un procesador 2.50GHz, memoria de 8GB y una tarjeta gráfica con memoria de gráficos de 4MB. El software que se utilizó fue VideoPad (NCH Software, CO, USA). Todas las imágenes se mostraron en ventanas de 300×300 píxeles en un monitor de 19 pulgadas con una resolución de 1366×768 píxeles (frecuencia de actualización de 60Hz).

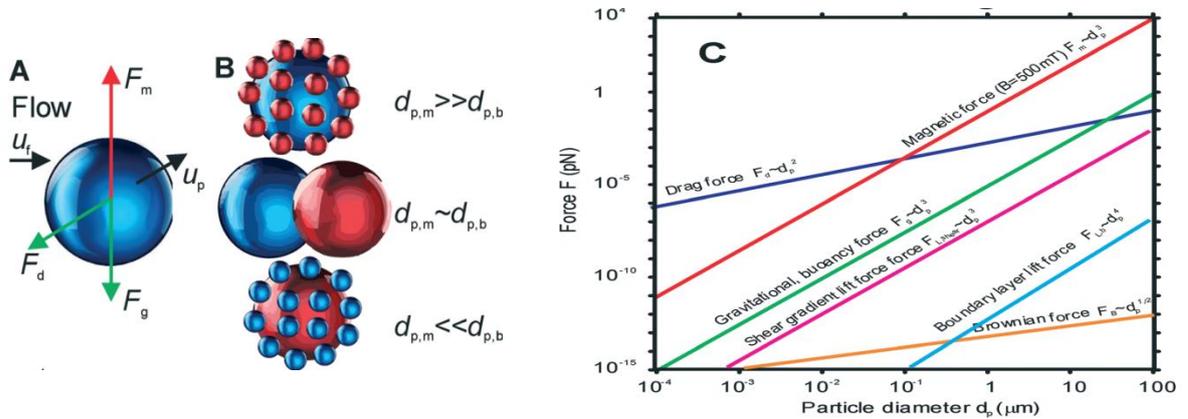
4.1.8 Dremel.

Para poder realizar la construcción del microcanal se utilizó una instalación compuesta por una máquina fresadora marca Dremel de 130 W de potencia y de 5000 a 32000 RPM, una mesa fresadora con soportes de fijación y micrómetro, una fresa de diámetro 200 μm y elementos secundarios para su sustentación.

4.2 Estudio físico de la trayectoria de la NPM.

4.2.1 Movimiento de NPMs influenciadas por un campo magnético externo en el microcanal.

El movimiento de NPMs en el seno de un fluido influenciadas por un campo magnético externo (figura 8) se encuentra afectado por diferentes factores entre los que se incluyen fuerzas magnéticas y fluidicas, fuerza de la gravedad, fuerzas de flotabilidad (buoyancy), dinámica browniana, efectos entre partículas (interacciones entre dipolos magnéticos), transferencia entre momentos partícula/fluido [12], cinética térmica [30], fuerzas de Van der Waals, efectos de surfactantes [39], fuerzas de presión debidas a la presión diferencial en el fluido o fuerzas de aceleración/desaceleración de la partícula. De entre ellas, las que más afectaron al movimiento debido al tamaño de las NPMs fueron las fuerzas magnéticas y fluidicas (figura 5) (figura 6) [45].



Figuras 5 y 6. Fuerzas más importantes que actúan sobre una partícula en un campo de flujo: (A) componentes de las fuerzas magnética, gravitacional y fluidica (las direcciones de F_m y F_g son arbitrarias); (B) tamaños relativos entre partículas magnéticas (azul) y partículas diamagnéticas (biológicas) (rojo); (C) órdenes de magnitud de diferentes fuerzas en función de los diámetros de partículas característicos (a una velocidad típica de 1 mm/s y ancho y profundidad del canal de 100 μm). Imagen obtenida de [45].

En este trabajo, las NPMs estaban lo suficientemente diluidas en el fluido como para poder despreciar los efectos debidos a la interacción entre ellas o con el medio.

4.2.2 Ecuación del movimiento.

Para poder describir la trayectoria de las NPMs que se mueven en un fluido se utilizó la segunda ley de Newton, como se muestra a continuación.

$$m_p \cdot \frac{\partial v_p}{\partial t} = \mathbf{F}_m + \mathbf{F}_f \quad (\text{ec.1})$$

donde, m_p y \mathbf{v}_p son la masa y la velocidad de las NPMs y \mathbf{F}_m , y \mathbf{F}_f son, respectivamente, las

fuerzas magnéticas y fluidicas.

Se seleccionaron NPMs con un diámetro de 40 nm para que pudieran cumplir dos condiciones. La primera era que el [tiempo de saturación](#) fuera lo más pequeño posible, esto es, el tiempo que todas las NPMs tardarían en alcanzar la pared del sinusoides para, posteriormente, migrar hasta el nicho osteoblástico donde comienza la proliferación de células madre hematopoyéticas (médula ósea roja) ([figura 7](#)). La segunda, que estas NPMs fueran lo [más pequeñas posible](#) para poder superar la barrera del endotelio vascular y circular libremente, sin ser influenciadas por los demás componentes del microambiente [\[30\]](#).

Por este motivo, el movimiento de las NPMs en el fluido fue del tipo transporte dominado por la deriva, despreciándose el movimiento browniano, como puede desprenderse de la (ec.1). Esto se debe a que existe una separación entre estos dos movimientos, cuya frontera queda definida por el radio de la nanopartícula. Este concepto fue introducido por Gerber et al. (1983) [\[46\]](#) que desarrollaron el criterio expuesto a continuación para definir este radio [\[23\]\[47\]\[48\]](#).

$$|F|D_p \leq kT$$

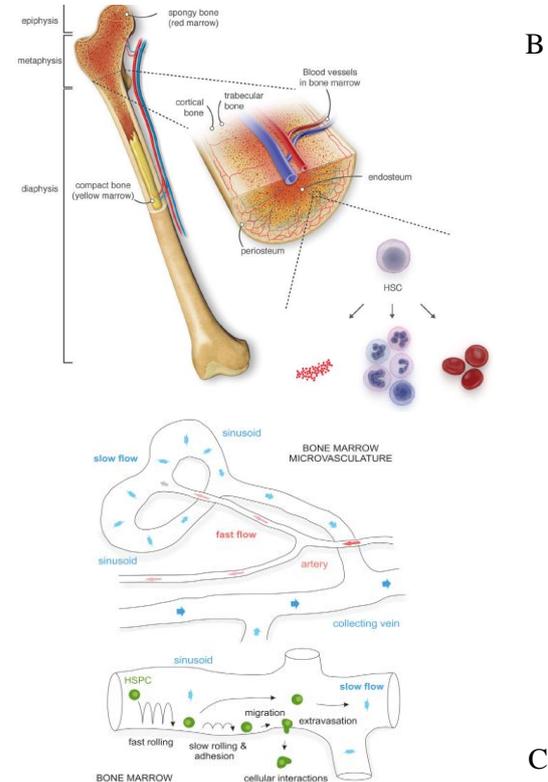
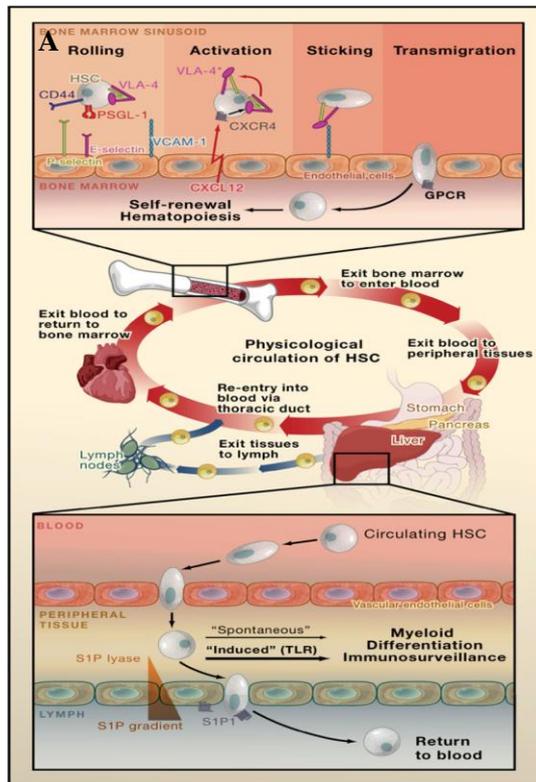
Donde $|F|$ es la magnitud de la fuerza que actúa sobre las NPMs, k es la constante de Boltzmann, y T es la temperatura absoluta. Gerber et al. (1983) analizaron, para una [fuerza](#) dada ($|F| = 0.1$ pN utilizada para este tipo de experimentos), que el tamaño de la partícula frontera entre el movimiento browniano (para diámetros pequeños) y por deriva (para diámetros superiores), en el caso del Fe_3O_4 , en el agua era de 40 nm [\[47\]](#).

4.2.3 Fuerza magnética

El cálculo de la trayectoria de las NPMs se realizó evaluando el movimiento de una de ellas. Para poder definir la fuerza magnética ([figura 5](#)) en una NPM [\[49\]](#) se utilizó el método del momento dipolar "efectivo" [\[50\]](#). En este método, un dipolo puntual "equivalente" reemplaza a esta NPM con un momento $\mathbf{m}_{p,eff}$. Esta fuerza quedó definida como

$$\mathbf{F}_m = \mu_f (\mathbf{m}_{p,eff} \cdot \nabla) \mathbf{H}_a \quad (ec.2)$$

donde μ_f es la permeabilidad magnética del fluido por el que circula la NPM, $\mathbf{m}_{p,eff}$ es el



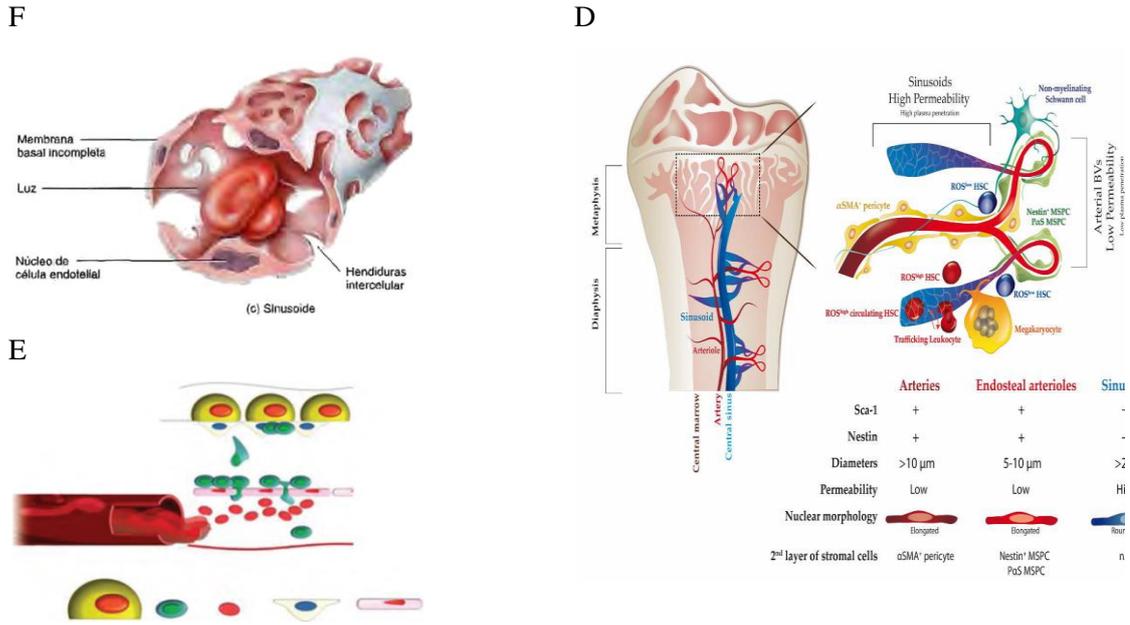


Figura 7. A) Migración de células madre hematopoyéticas adultas y progenitoras. Imagen obtenida de The Role of Kindlin-3 in Hematopoietic Stem Cell Homeostasis and Mature Effector Cells. Raphael Hubert Ruppert (2014). B) Anatomía de la médula ósea (MO). La anatomía normal de la médula ósea (aquí utilizando el ejemplo del fémur) está formada por diferentes tipos de hueso, vasos sanguíneos y médula roja y amarilla. Las HSPC habitan en la médula roja donde se diferencian en glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas a través de diferentes etapas progenitoras (no se muestra). La médula amarilla forma en gran parte regiones ricas en adipocitos con hematopoyesis mínima. Imagen obtenida de Daniela S. Krause et al (2015) [59]. C) Reconstrucción 3D detallada de la microvasculatura de la médula ósea. Dinámica del flujo sanguíneo a tamaño celular en microvasos óseos. Mapa de flujo en detalle con parámetros hemodinámicos en arterias y sinusoides altamente ramificados. Dinámica celular de migración de HSPC a sinusoides de médula ósea. Imagen obtenida de Flow Dynamics and HSPC Homing in Bone Marrow Microvessels M. Gabriele Bixel et al. (2017). D) Representación de un modelo propuesto de vasos sanguíneos de médula ósea y regulación de la hematopoyesis por células endoteliales de médula ósea arterial, células endoteliales sinusoidales, megacariocitos, células madre y progenitoras mesenquimales e innervación de fibras nerviosas de células de Schwann. Imagen obtenida de Development and characterization of a bone marrow stem cell niche model. Davide Confalonieri (2017). E) Nichos de la médula ósea endotelial y vascular. El nicho endosteal está inactivo y mantiene las HSC inactivas a largo plazo. El nicho vascular mantiene el grupo de autorrenovación por división asimétrica y produce progenitores multipotentes. Imagen obtenida de Tissue Engineering of Normal and Abnormal Bone Marrow T. Mortera-Blanco, N Panoskaltsis y A Mantalaris (2011). F) Representación de un sinusoides fenestrado de la médula ósea roja donde se aprecian las fenestraciones y hendiduras intercelulares. Imagen obtenida de Tortora Gerard J. et al [57].

momento dipolar "efectivo" de la NPM, y \mathbf{H}_a es la intensidad del campo magnético externo, creado por el imán permanente [5.], generado en el centro de la NPM, donde se sitúa concentrado el dipolo puntual equivalente. Es importante observar que $\mathbf{m}_{p,eff} = V_p M_p$, donde V_p y M_p son el volumen y magnetización de la NPM, depende de \mathbf{H}_a . Seguidamente, se relacionaron analíticamente estos conceptos para poder determinar la \mathbf{F}_m [30].

En primer lugar, se debía determinar $\mathbf{m}_{p,eff}$, y para ello, se necesitaba definir un modelo para la magnetización de la NPM. En este trabajo, se consideró que el radio hidrodinámico de la NPM $R_{p,hid}$ coincidía con su radio físico R_p . En este modelo, $\mathbf{m}_{p,eff} = V_p \cdot f(H_a) \cdot \mathbf{H}_a$, donde $f(H_a)$ es una función que depende de las susceptibilidades magnéticas de la nanopartícula y de fluido, χ_p y χ_f , respectivamente, de M_{sp} , la magnetización de saturación de la nanopartícula y de \mathbf{H}_a . Este concepto refleja la influencia de la partícula misma que da lugar a un campo de autodesmagnetización, produciendo una disminución del campo magnético \mathbf{H}_a en el interior de la misma [47].

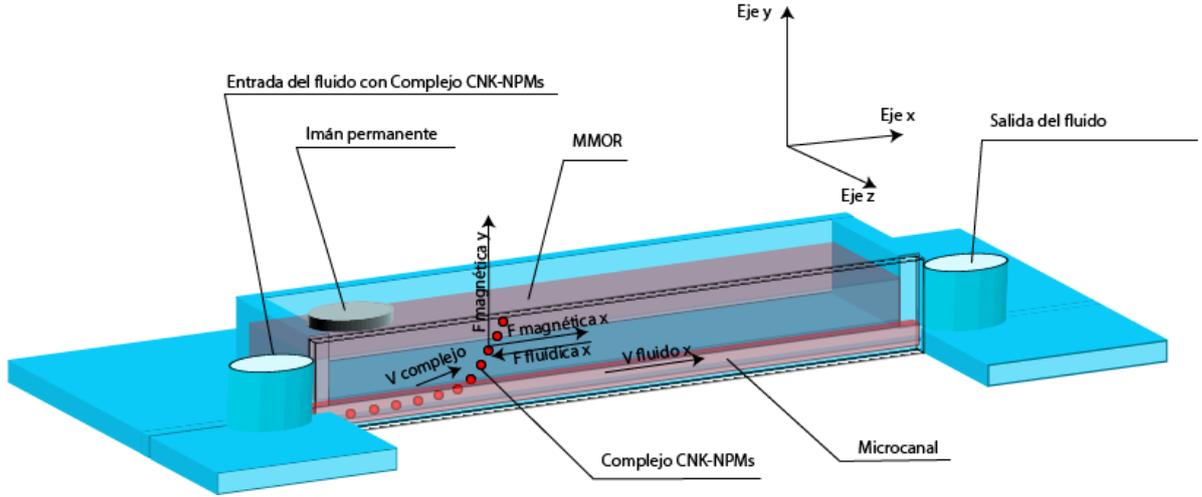


Figura 8. Representación esquemática del movimiento de las NPMs en el microcanal y MMOR.

[Ir a discusión](#)

Este modelo fue definido por E.P. Furlani entre los años 2006-2007 y su expresión quedó definida como:

$$f(H_a) \begin{cases} \frac{3(\chi_p - \chi_f)}{(\chi_p - \chi_f) + 3} Ha < \left(\frac{(\chi_p - \chi_f) + 3}{3\chi_p} \right) \cdot M_{sp} \\ \frac{M_{sp}}{H_a} & Ha \geq \left(\frac{(\chi_p - \chi_f) + 3}{3\chi_p} \right) \cdot M_{sp} \end{cases}$$

La conjunción de la (ec.2) y del modelo anteriormente definido aportó la ecuación que gobernaba la fuerza generada sobre una NPM situada en el seno de un fluido bajo la influencia de un campo magnético externo [30].

$$\mathbf{F}_m = \mu_f \cdot V_p \cdot f(H_a) \cdot (\mathbf{H}_a \cdot \nabla) \mathbf{H}_a \quad (\text{ec.3})$$

El modelo de magnetización descrito por Takayasu et al. (1983) [51] es consistente con el modelo de magnetización descrito anteriormente cuando $\chi_p \gg 1$. Este modelo es el que a continuación se describe.

$$f(H_a) \begin{cases} 3 & Ha < M_{sp}/3 \\ \frac{M_{sp}}{H_a} & Ha \geq M_{sp}/3 \end{cases}$$

Según este modelo, la magnetización de la NPM cuando se encuentra por debajo de la saturación es $\mathbf{M}_p = 3\mathbf{H}_a$, mientras que, si se encuentra por encima es $\mathbf{M}_p = \mathbf{M}_{sp}$. Los valores de la susceptibilidad magnética para que este modelo pueda ser aplicado se encuentran en el rango de 1 a 6 [47].

El desarrollo de las ecuaciones analíticas tanto del campo magnético como del gradiente quedan definidas en [23].

Y la expresión de la fuerza se expresó como

$$\mathbf{F}_m(x, y) = F_{mx}(x, y)\hat{\mathbf{x}} + F_{my}(x, y)\hat{\mathbf{y}} \quad (\text{ec.4})$$

donde

$$F_{mx}(x, y) = \mu_0 V_p f(H_a) \frac{M_s}{2\pi} \left(\frac{M_s}{4\pi} \left(\ln \left(\frac{(x+w)^2+(y-h)^2}{(x+w)^2+(y+h)^2} \right) - \ln \left(\frac{(x-w)^2+(y-h)^2}{(x-w)^2+(y+h)^2} \right) \right) \left(\frac{x+w}{(x+w)^2+(y-h)^2} - \frac{x+w}{(x+w)^2+(y+h)^2} - \frac{x-w}{(x-w)^2+(y-h)^2} + \frac{x-w}{(x-w)^2+(y+h)^2} \right) + \left(\frac{M_s}{2\pi} \left(\tan^{-1} \left(\frac{2h(x+w)}{(x+w)^2+y^2-h^2} \right) - \tan^{-1} \left(\frac{2h(x-w)}{(x-w)^2+y^2-h^2} \right) \right) \right) \left(\frac{y-h}{(x+w)^2+(y-h)^2} - \frac{y-h}{(x-w)^2+(y-h)^2} - \frac{y+h}{(x+w)^2+(y+h)^2} + \frac{y+h}{(x-w)^2+(y+h)^2} \right) \right) \quad (\text{ec.5})$$

$$F_{my}(x, y) = \mu_0 V_p f(H_a) \frac{M_s}{\pi} \left(\frac{M_s}{4\pi} \left(\ln \left(\frac{(x+w)^2+(y-h)^2}{(x+w)^2+(y+h)^2} \right) - \ln \left(\frac{(x-w)^2+(y-h)^2}{(x-w)^2+(y+h)^2} \right) \right) \left(\frac{h(y^2-(x+w)^2-h^2)}{((x+w)^2+y^2-h^2)^2+4h^2(x+w)^2} - \frac{h(y^2-(x-w)^2-h^2)}{((x-w)^2+y^2-h^2)^2+4h^2(x-w)^2} \right) + \left(\frac{M_s}{2\pi} \left(\tan^{-1} \left(\frac{2h(x+w)}{(x+w)^2+y^2-h^2} \right) - \tan^{-1} \left(\frac{2h(x-w)}{(x-w)^2+y^2-h^2} \right) \right) \right) \left(\frac{2hy(x-w)}{((x-w)^2+y^2-h^2)^2+4h^2(x-w)^2} - \frac{2hy(x+w)}{((x+w)^2+y^2-h^2)^2+4h^2(x+w)^2} \right) \right) \quad (\text{ec.6})$$

4.2.4 Fuerza fluidica.

Para poder obtener la fuerza fluidica (figura 5) se hizo uso de la aproximación de Stokes para la fuerza sobre una partícula esférica. Esta aproximación es válida cuando la partícula es esférica y rígida, se mueve en un fluido que se supone estacionario (su velocidad relativa con respecto a la de la partícula es pequeña) y el diámetro de la partícula es muy superior al recorrido libre medio de las moléculas del fluido. Dado que el recorrido libre medio de las moléculas del suero fisiológico es de 2 Å, se cumplió que el diámetro de la NPM era muy superior. Por lo tanto, la fuerza fluidica tuvo como expresión:

$$\mathbf{F}_f = -6\pi\eta R_p(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}_f) \quad (\text{ec.7})$$

donde \mathbf{v}_f es la velocidad del fluido y η su viscosidad.

Para resolver esta ecuación, es necesario, en primer lugar, conocer cuál era el campo de velocidades en el fluido, $\mathbf{v}_f(t)$, además de las condiciones iniciales de posición y velocidad inicial de la nanopartícula para poder determinar su trayectoria.

Para poder determinar la velocidad del fluido, se definió un sistema de coordenadas tal que el eje X se situaba a lo largo del eje del microcanal mientras que el eje Y quedó centrado en el eje vertical, perpendicular al anterior [52]. Los cálculos se realizaron en el plano XY. Para determinar si el flujo era laminar o turbulento se analizó el número de Reynolds, R_e , en el microcanal.

$$R_e = \frac{v_f \cdot D \cdot \rho}{\eta} \quad (\text{ec.8})$$

donde $v_f = 10^{-4}$ m/s era la velocidad del fluido [53], $D = 100$ μm, la longitud característica (el diámetro hidráulico), ρ la densidad y η la viscosidad. La frontera entre el flujo en régimen laminar y turbulento se encuentra aproximadamente en torno al valor de $R_e = 2300$ [54] [55]. En el caso que nos ocupaba

$$R_e = \frac{0.0001 \cdot 100 \cdot 10^{-6} \cdot 1.005 \cdot 10^3}{1.02 \cdot 10^{-3}} \quad (\text{ec.9})$$

Por lo que en nuestro caso, con $Re = 8 \cdot 10^{-3}$, podíamos considerar el flujo en régimen laminar y paralelo al eje X [55]. Sólo hubo componente 'x' para la velocidad del fluido. Por lo tanto, la componente 'y' de la fuerza fluídica solo dependió de la velocidad 'y' de la NPM. Esta velocidad estaba provocada por la acción del campo magnético y no por la diferencia entre las velocidades de la nanopartícula y del fluido.

Para poder determinar la velocidad del fluido se tomó el caso de un flujo estacionario y totalmente desarrollado en un canal de sección circular, la velocidad del fluido en cada punto del canal es independiente del tiempo, solo tiene componente a lo largo del canal y está dada por la ley de Poiseuille. Si las variaciones temporales en la velocidad del fluido son muy lentas, el fluido se ajusta en cada momento a la distribución de Poiseuille correspondiente a esa velocidad media

$$v_{f,x}(y) = 2\bar{v}_f \left[1 - \frac{y^2}{R_v^2} \right] \quad (\text{ec.10})$$

donde R_v fue el radio del microcanal y \bar{v}_f la velocidad media del fluido en el canal (promediada en la sección del canal). Para obtener la componente de la fuerza en el eje Y, se sustituyó la velocidad de la NPM en la (ec.7), mientras que para poder determinarla en el eje X se sustituyó la (ec.10) en la (ec.7) [47]. Por lo tanto, las componentes de la fuerza fluídica fueron

$$F_{fy} = -6\pi\eta R_p v_y \quad (\text{ec.11})$$

$$F_{fx} = -6\pi\eta R_p \left\{ v_x - 2\bar{v}_f \left[1 - \frac{y^2}{R_v^2} \right] \right\} \quad (\text{ec.12})$$

donde v_x y v_y eran las dos componentes de la velocidad de la NPM.

4.2.5 Determinación de la trayectoria de la NPM.

Para poder evaluar la (ec.1) y determinar la trayectoria de la nanopartícula, fue necesario descomponer esta trayectoria en las dos dimensiones del espacio donde se iba a analizar.

$$m_p \cdot \frac{\partial v_y}{\partial t} = F_{my}(x, y) - 6\pi\eta R_p v_y \quad (\text{ec.13})$$

$$m_p \cdot \frac{\partial v_x}{\partial t} = F_{mx}(x, y) - 6\pi\eta R_p \left\{ v_x - 2\bar{v}_f \left[1 - \frac{y^2}{R_v^2} \right] \right\} \quad (\text{ec.14})$$

$$v_x = \frac{dx}{dt} \quad v_y = \frac{dy}{dt} \quad (\text{ec.15})$$

Estas ecuaciones conformaban un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs. Estas ecuaciones podían ser resueltas si se conocían los valores iniciales del movimiento $x(0)$, $y(0)$, $v_x(0)$ y $v_y(0)$. Para su cálculo, se hizo uso del programa de cálculo Maple que utiliza elementos finitos.

4.3 Análisis y evaluación de la deposición de la NPM sobre la superficie del capilar.

Debido a que el tamaño de la NPM fue de 40 nm de diámetro y el tamaño de las fenestraciones y hendiduras intercelulares [6] de los sinusoides [7] alcanzó el valor de 100 nm [56] (figura 7), la NPM traspasó el endotelio sin generarse el proceso de migración que conlleva el rodamiento, adhesión y paso a través de las células endoteliales [57].

4.4 Migración de la NPM al MMOR.

En la médula ósea roja (figura 7) se produce la hematopoyesis (figura 9). Este proceso consiste en la generación de células sanguíneas como los eritrocitos, plaquetas, linfocitos, granulocitos y monocitos. Esta médula se distribuye por todas las estructuras esqueléticas desde la vida intrauterina hasta alrededor del quinto año de vida [8].

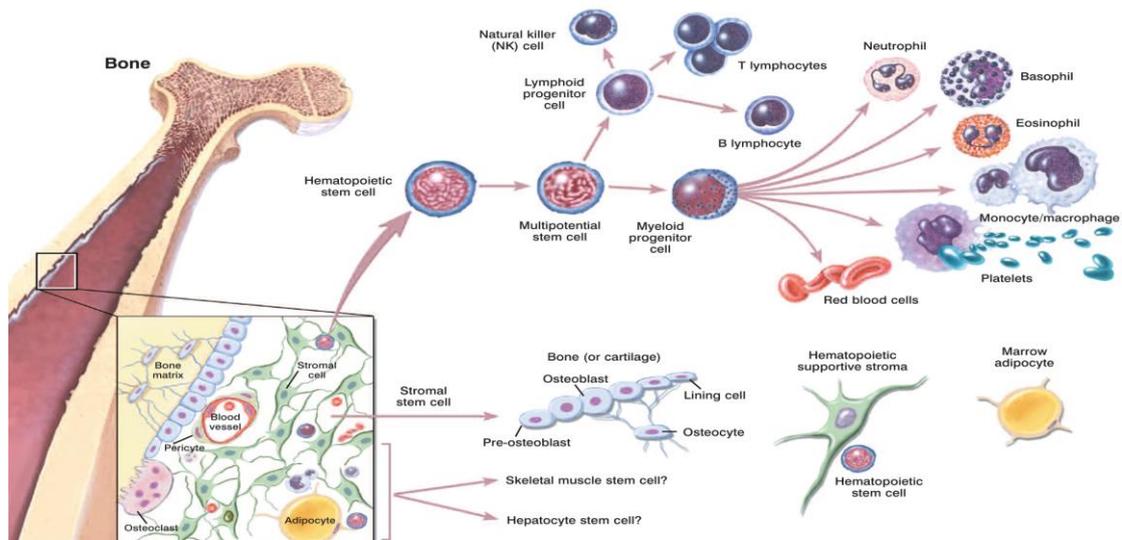


Figura 9. Proceso de hematopoyesis. Formación de los eritrocitos, plaquetas, linfocitos, granulocitos y monocitos a partir de las células madre hematopoyéticas. Estas células madre se encuentran alojadas en la médula ósea roja que también contiene células de estroma. (imagen: © 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk).

Todas las células sanguíneas se crean de las células madre hematopoyéticas (CMHs) [9] que utilizan la médula ósea para renovarse y diferenciarse normalmente. Además de las células sanguíneas y las CMHs, en la médula ósea roja existen otros tipos de células. Estas células son las células estromales, adipocitos, células endoteliales, osteoblastos y fibroblastos (figura 10) [10]. La matriz extracelular (ECM) (figura 11) está constituida por proteínas como el colágeno, fibronectina y tenascina secretadas por las células estromales. Estas proteínas forman compartimentos especializados que localizan y dirigen a las quimiocinas y citocinas integrales para poder regular los diferentes componentes de la hematopoyesis [58].

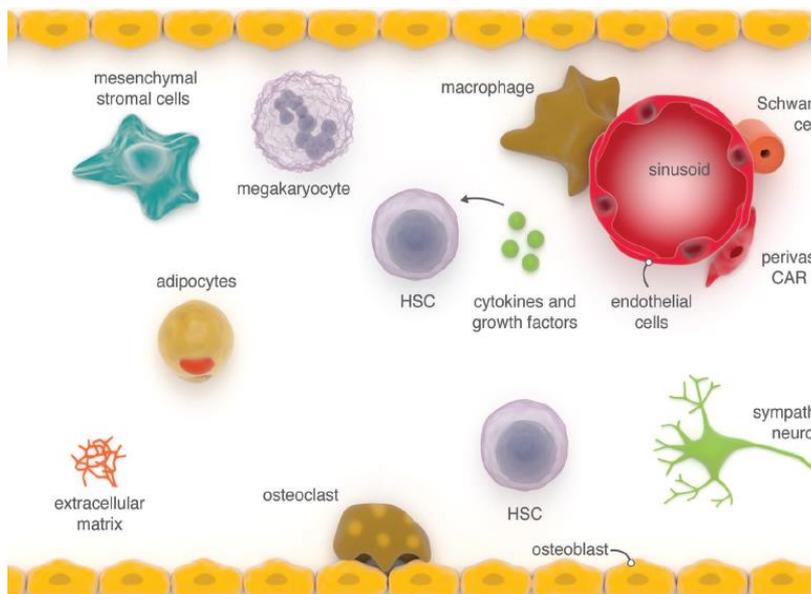


Figura 10. Tipos de células, diferentes a las células sanguíneas, presentes en el MMOR. Pueden apreciarse adipocitos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales formando el sinusoid, células de osteolinaje, neuronas simpáticas, células de Schwann no mielinizantes, células madre mesenquimales, células CAR, macrófagos, megacariocitos, citocinas y matriz extracelular. Imagen obtenida de Daniela S. Krause et al (2015) [59].

El movimiento de la NPM en este microambiente se produjo en el seno de un fluido que fluía entre los diferentes componentes que conformaban el microambiente (figura 8).

La composición de este MMOR estaba formada por células endoteliales de tipo arteriolar y sinusoidal, células de osteolinaje, osteoclastos, osteocitos, adipocitos, neuronas simpáticas, células de Schwann no mielinizantes, células madre mesenquimales, células reticulares abundantes en Cxcl12 (CAR cell), macrófagos, megacariocitos, citocinas y matriz extracelular [59] (figura 10) [11].

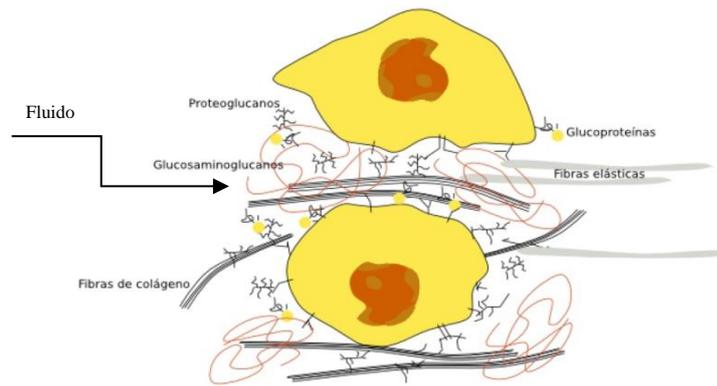


Figura 11 . Principales componentes de la matriz extracelular. Pueden apreciarse proteoglucanos, glucosaminoglucanos, fibras de colágeno, glicoproteínas y fibras elásticas. Imagen obtenida de Atlas de Histología Animal y Vegetal. Megías, Manuel; Molis, Pilar; Pombal, Manuel A.

Esta matriz se componía fundamentalmente de macromoléculas como proteínas estructurales, principalmente fibrosas (colágeno y elastina), glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glicoproteínas [60][12]. También contenía plasma sanguíneo (compuesto de 91.5 % de agua, 7 % de proteínas plasmáticas y 1.5 % de otros solutos [57] con una baja concentración de estas proteínas) [55] (figura 11).

La ecuación del movimiento que gobernaba esta NPM tenía la misma forma que la del apartado precedente. El campo magnético que influía en el movimiento de la NPM operaba de la misma manera que en el apartado anterior, por lo que, los conceptos físicos eran igualmente aplicables en este microambiente.

4.4.1 Fuerza fluidica.

Como quedó definido en el punto anterior, las físicas que involucraban al campo magnético y al movimiento siguieron el mismo patrón. En cambio, el concepto fluidífico sí varió al ser un medio poroso en el que intervinieron físicas diferentes que en los microcanales de mayor tamaño.

Las leyes que determinaban el movimiento del suero fisiológico en el gel de agarosa aparecieron debido a la porosidad (o tortuosidad) del microambiente producido por los diferentes elementos que lo constituían. Por ello, apareció la ecuación de Darcy que aportó la velocidad del suero fisiológico en un medio poroso [55][61].

La fuerza fluidica quedó definida por la aproximación de Stokes. Se tomó como velocidad del fluido la determinada por la ecuación de Darcy. Esta aproximación siguió siendo válida, como en el apartado anterior, al ser la misma partícula y la velocidad del fluido fue incluso más baja que en el microcanal, debido a la tortuosidad y amplitud del microambiente.

$$\mathbf{F}_f = -6\pi\eta R_p(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}_f) \quad (\text{ec.16})$$

donde \mathbf{v}_f es la velocidad del fluido y η su viscosidad.

La velocidad del fluido se calculó con el mismo sistema de coordenadas que para los microcanales. El flujo fue laminar, puesto que, el diámetro en el MMOR tenía una amplitud mucho mayor que en el microcanal. Este flujo fue paralelo al eje Y.

4.4.1.1 Ecuación de Darcy.

En tumores, tejidos musculares perfundidos o flujos en tejidos conectivos blandos el modelo de Darcy era el más propicio a aplicar [61].

Esta ecuación se definió como

$$\nabla P = \frac{\mu}{k} \mathbf{v}_f \quad (\text{ec.17})$$

donde k es la permeabilidad.

La presión hidrostática, cuando los vasos sanguíneos se aproximan o superan un diámetro de aproximadamente $40 \mu\text{m}$, se mantiene constante. Además, como el gradiente de la presión osmótica a través de los sinusoides toma el valor de cero, esta presión osmótica es también constante [55]. Por lo anteriormente descrito, la presión en el MMOR se mantuvo constante [62]. Aplicando la ecuación de Darcy se llegó a la conclusión de:

$$0 = \frac{\mu}{k} \mathbf{v}_f \quad (\text{ec.18})$$

Por tanto, el fluido fue estacionario con velocidad en el MMOR igual a 0.

Este hecho se produjo porque la velocidad en el microcanal era pequeña. Además, aparecieron fuerzas viscosas en la zona situada en la frontera entre el microcanal y el MMOR. Estas produjeron una desaceleración del flujo en un espacio reducido conllevando a la estaticidad del fluido en el MMOR.

4.4.1.2 Expresión de la fuerza fluidica.

Para la situación anteriormente expuesta, la velocidad del fluido fue 0, era un fluido estacionario. En este caso, la expresión de la fuerza de arrastre quedó como

$$F_{fy} = -6\pi\eta R_p(v_y) \quad (\text{ec.19})$$

$$F_{fx} = -6\pi\eta R_p(v_x) \quad (\text{ec.20})$$

4.4.2 Determinación de la trayectoria de la (NPM).

Para poder evaluar la (ec.1) y calcular la trayectoria de la nanopartícula, había que descomponer esta trayectoria en las dos dimensiones del espacio donde se iba a analizar.

$$m_p \cdot \frac{\partial v_y}{\partial t} = F_{my}(x, y) - 6\pi\eta R_p(v_y) \quad (\text{ec.21})$$

$$m_p \cdot \frac{\partial v_x}{\partial t} = F_{mx}(x, y) - 6\pi\eta R_p(v_x) \quad (\text{ec.22})$$

$$v_x = \frac{dx}{dt} \quad v_y = \frac{dy}{dt} \quad (\text{ec.23})$$

La masa de la nanopartícula se calculó a partir de su volumen y densidad.

$$V_{NPM} = \frac{4}{3}\pi R^3 \quad (\text{ec.24})$$

$$V_{NPM} = \frac{4}{3}\pi(20 \cdot 10^{-9})^3 = 3.3510^{-23} m^3$$

$$m_p = \rho V_{NPM} = 5000 \cdot 3.3510^{-23} = 1.675 \cdot 10^{-19} Kg$$

Estas ecuaciones conformaban un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs. Estas ecuaciones podían ser resueltas si se conocían los valores iniciales del movimiento $x(0)$, $y(0)$, $v_x(0)$ y $v_y(0)$.

4.5 Simulación de las trayectorias de las NPMs.

El programa COMSOL 5.4 multifísico (COMSOL Inc, Burlington, MA) se basa en el modelado por elementos finitos. La simulación de las trayectorias de las NPMs se realizó en el seno de un fluido y su posterior salida al MMOR.

Esta simulación consistió en la generación de las trayectorias de las NPMs a través de un fluido (suero fisiológico) inmerso en el interior de un microcanal (sinusoide) y a través del MMOR (hidrogel). Para ello, las NPMs viajaron hacia el endotelio vascular, traspasándolo. Posteriormente avanzaron hacia el MMOR desplazándose en el mismo. Se hubo de tener en cuenta los diversos conceptos físicos que emanaban del sistema en estudio, las propiedades de cada uno de los elementos que simulaban los diferentes tejidos (sanguíneo, epitelial y conectivo) y la definición de sus geometrías.

4.5.1 Definición de las interfases (físicas) a utilizar.

Estas nanopartículas se encontraron influenciadas por un campo magnético externo. Para la simulación se utilizaron diferentes interfases (físicas) de este programa. En concreto, el campo magnético debido al imán permanente se generó utilizando la interfaz “Magnetic Fields, no Currents” del módulo AC/DC [13]. Para determinar las trayectorias de las NPMs en todo su recorrido se utilizaron diferentes interfaces debido al diferente comportamiento físico en los compartimentos. Para simular el flujo de fluido en el microcanal se utilizó la interfaz “Creeping Flow” incorporada en el submódulo “Single-Phase Flow” del módulo “Fluid Flow” [14][15]. Para analizar las trayectorias de las NPMs en el MMOR se empleó la interface “Darcy's Law” encuadrada en el submódulo “Porous Media and Subsurface Flow” del mismo módulo que el anterior [16]. Para poder describir las trayectorias de las NPMs en los dos compartimentos de forma conjunta se utilizó la interfaz “Particle Tracing for Fluid Flow” inmersa en el submódulo “Particle Tracing” del módulo “Fluid Flow” [63].

4.5.2 Creación del modelo.

Se realizó una simulación. Esta describió conjuntamente las trayectorias de las NPMs a través del microcanal y, posteriormente, del MMOR.

El cálculo de estas trayectorias se realizó creando un modelo que constaba de los siguientes pasos:

El primer paso fue generar un modelo maestro nuevo, en el cual se incluyeron la dimensión del espacio, en este trabajo 2D, las diferentes físicas (interfaces) que se iban a aplicar en los estudios, que quedan definidas en el apartado físicas, y los diferentes estudios a utilizar.

4.5.2.1 Definición de las geometrías.

En el siguiente paso se definieron las geometrías de los diferentes elementos que constituyeron el modelo. Se pudo determinar el tamaño y la forma de cada elemento. También se describió un rectángulo más grande que representaba el contorno, englobando a los demás elementos, y quedó definido por las propiedades magnéticas del vacío.

Se simuló un microcanal recto de 100 μm de anchura por 100 μm . de profundidad y 500 μm . de longitud. El eje del microcanal coincidía con el eje X de los cálculos analíticos.

Para definir el tamaño del MMOR, se diseñó una microsuperficie de 42 mm de ancho y 15 mm de alto cuyo eje vertical coincidía con el eje Y del imán. El MMOR fue un hidrogel (gel de agarosa).

El tamaño de las NPMs fue de 40 nm de diámetro, para poder penetrar por las fenestraciones del microcanal [56] (figura 7).

4.5.2.2 Definición de los materiales.

Seguidamente, se describieron los materiales que componían cada geometría generada. Para simular el fluido en el microcanal se utilizó suero fisiológico al tener propiedades similares al plasma sanguíneo. Estas propiedades fueron la viscosidad, la densidad, la susceptibilidad y la permeabilidad magnéticas del vacío.

Para realizar los cálculos del MMOR se dividió este en dos tipos de compartimentos. El primero, por donde fluía el fluido. Las propiedades de este fluido fueron la densidad y la viscosidad anteriormente mencionadas.

El segundo fue la matriz extracelular con propiedades como la porosidad y la permeabilidad [64]. Para esta matriz extracelular se simuló un hidrogel (gel de agarosa al 0.2% volumen/peso). Las propiedades de este hidrogel fueron la permeabilidad [42], la densidad, la porosidad, la susceptibilidad y permeabilidad magnéticas. Se supuso que la viscosidad era igual a la del agua [43].

El imán permanente simulado tuvo la misma magnetización de saturación que en los cálculos analíticos [47].

Por último, se describió el contorno como el vacío con permeabilidad magnética de $\mu_0 = 4 \pi 10^{-7} \text{ N/A}^2$.

4.5.2.3 Definición de los parámetros globales.

En las definiciones globales, se introdujeron los parámetros cuyos valores no estaban implícitamente definidos en el programa. La porosidad de la matriz extracelular y las permeabilidades magnéticas relativas de las NPMs y de la matriz extracelular, con valores de $\mu_r = \chi_p + 1 = 3$ y $\mu_r = \chi_f + 1 = 1$, respectivamente.

4.5.2.4 Generación de las físicas (interfaces).

A continuación, se definieron las físicas (interfaces). En estas físicas se describieron los dominios y los contornos. Los dominios son regiones cuya función es poder definir tanto las propiedades de los materiales que las conforman como las físicas aplicables en dichos dominios. Los contornos son líneas que definen la entrada y salida de elementos. A estos elementos se les pudo definir su comportamiento inicial. En el siguiente párrafo, se describieron las diferentes físicas que componían el modelo y que se estructuraban en dos estudios como se explicó posteriormente.

La interfaz “Magnetic Fields, no Currents” fue configurada simulando un imán permanente. Esta física fue aplicada al conjunto de componentes que conformaban la simulación. Estos componentes consistían en un microcanal recto que simulaba el senoide, una microsuperficie que simulaba el MMOR y el vacío, como medio, que los envolvía.

La interfaz “Creeping Flow” se describió para simular el flujo de fluido por el microcanal. El flujo fue del tipo laminar, incompresible, homogéneo y Newtoniano [65], despreciando la contribución del término de inercia de las ecuaciones de Navier-Stokes. Esta simplificación se conoce como flujo de Stokes y se aplica para números de Reynolds pequeños, como es el caso, para microfluidos [64].

La presión a la entrada y salida del microcanal se mantuvo constante tomando el valor de 0 [65]. La velocidad a la entrada fue de 0.0001 m/s [66].

La interfaz “Darcy's Law” fue configurada para simular el MMOR por el que fluía el líquido intersticial. Se eligió esta interfaz pues el MMOR se asemejaba a una matriz porosa. La Ley de Darcy se utiliza para el cálculo del movimiento de fluidos en medios porosos. Esta matriz simulaba, entre otros componentes, a las células que formaban parte del MMOR. El líquido intersticial coincidía con el flujo a través de las partículas (por ejemplo, estas células) [55]. Además, este fluido se encontraba influenciado por los esfuerzos cortantes en sus límites que lo desaceleraba hasta conseguir que permaneciera en estado estacionario [64]. En este caso, el flujo fue también laminar y se despreció la contribución del término de inercia de las ecuaciones de Navier-Stokes. Este fluido fue también suero fisiológico.

La presión en el MMOR varió entre -0.5 y 3 mm Hg tomándose el valor de 0 como valor de la presión promedio [62]. La velocidad, como se definió en el apartado ecuación de Darcy, tomó el valor de 0.

La interfaz “Particle Tracing for Fluid Flow” [67] se diseñó para poder evaluar las trayectorias de las NPMs a través de los compartimentos anteriores. Estas trayectorias de las NPMs estuvieron influenciadas por la fuerza fluídica y la fuerza magnética.

Hay que tener en cuenta que la magnetización de las NPMs dependen de H_a como ya se describió en el apartado de la fuerza magnética.

4.5.2.5 Definición de los estudios.

Por último, se definieron los estudios, cada uno de ellos constituido por la interrelación de diferentes físicas. Posteriormente se combinaron estos estudios para poder realizar la simulación completa del modelo, esto es, para poder construir un análisis en conjunto de la evolución, en el

espacio y en el tiempo, de las NPMs en los dos compartimentos, el microcanal y el MMOR. Por ello, se definieron las físicas en cada uno de ellos.

En el primero, se introdujeron tanto la creación del campo magnético debido al imán permanente (Magnetic Fields, no Currents) como el flujo del fluido que circulaba por el microcanal (Creeping Flow).

El segundo, que se encontraba conectado con el primero, estuvo influenciado por el campo magnético. Se introdujeron el flujo del fluido que circulaba por el microcanal (Creeping Flow), seguimiento de partículas para flujo de fluidos (Particle Tracing for Fluid Flow) y las ecuaciones de Darcy (Darcy's Law) [68].

4.5.3 Representación esquemática de la simulación

Los diferentes pasos descritos se esquematizaron para poder realizar una entrada de datos secuencial en el programa de simulación.

1º Model wizard

- ✓ Seleccionar dimensión de espacio (describe si el modelo se realiza en 1, 2 ó 3 dimensiones).
- ✓ Seleccionar físicas (son las diferentes condiciones físicas que se van a aplicar en el estudio, p.ej. fluidos, campos magnéticos, etc.).
- ✓ Seleccionar estudio (es la unión de varias físicas. Puede haber varios estudios)

2º Geometría.

- ✓ Definir las dimensiones de los diferentes elementos (imán externo, vaso sanguíneo, etc.).

3º Materiales.

- ✓ Servía para definir el tipo de material de cada geometría generada.

4º Definiciones globales

- ✓ Eran los parámetros generales

5º Físicas. Eran las diferentes físicas que se van a aplicar en el estudio, p.ej. fluidos, campos magnéticos, etc.

- ✓ Definir
 - Dominios: Regiones cuya función es poder definir tanto las propiedades de los materiales que las conforman como las físicas aplicables en dichos dominios.
 - Contornos: Líneas que definen la entrada y salida de elementos a los que se les puede definir su comportamiento inicial. Hay que introducir datos (p. ej. Velocidad entrada, o presión de salida) en el contorno seleccionado(p.ej. contorno de entrada, contorno de salida).

6º Estudio

Es la unión de varias físicas. Puede haber diferentes estudios, unos interconectados con otros.

4.6 Fabricación de una plataforma microfluidica, lab on a chip.

Para la fabricación de un *lab on a chip* se ha de tener en cuenta que uso va a tener. En este trabajo la utilidad de esta plataforma microfluida fue la del movimiento de NPMs a través de un microcanal y su posterior migración al MMOR influenciadas por un campo magnético externo.

Esta fabricación constó de los siguientes pasos: diseño, construcción, evaluación y puesta en funcionamiento ([figura 4](#)).

4.6.1 Diseño

El punto de partida del diseño del *lab on a chip* fue definir el objetivo que se quería alcanzar. La finalidad era poder cuantificar la trayectoria de las NPMs inmersas en un fluido (suero fisiológico). Estas NPMs circulaban en el interior de un microcanal fabricado en PMMA, con propiedades similares al sinusoide. Las NPMs, posteriormente, migraron hacia un hidrogel (agarosa) con características similares al MMOR ([figura 8](#)).

Para poder evaluar el diseño del *lab on a chip* [17], en primer lugar, se definieron las

propiedades, parámetros y características de los diferentes materiales que componían el experimento a realizar. Se caracterizaron el sinusoide, el flujo que por él transitaba, el MMOR, el imán permanente y las NPMs. Estos valores quedaron reflejados en los apartados precedentes salvo los inherentes a la propia experimentación.

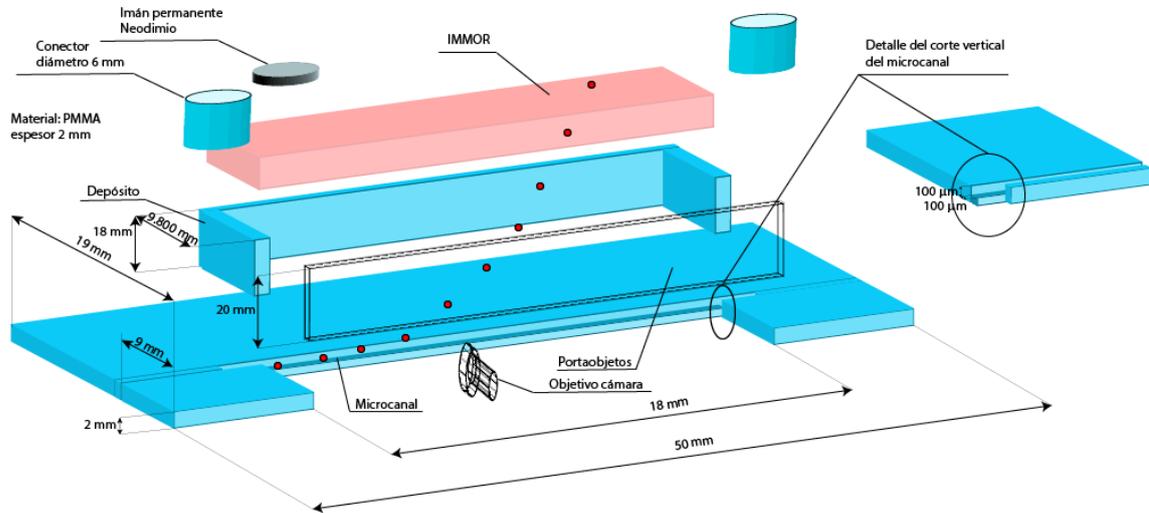


Figura 12. Definición de las dimensiones de cada elemento del *lab on a chip*.

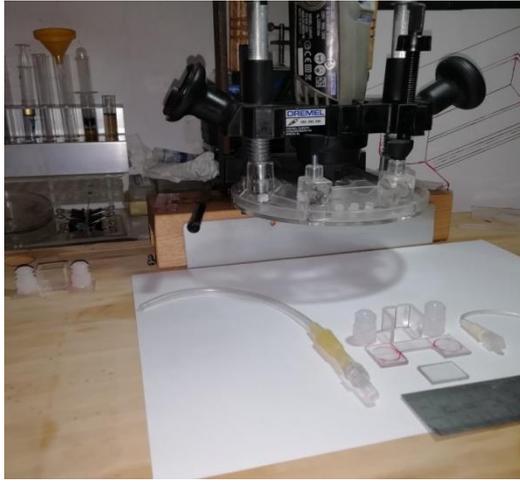
El tipo de plástico que se utilizó para poder reproducir el movimiento del fluido y las NPMs a través del microcanal fue PMMA. Se eligió este material debido a su bajo coste, facilidad de fabricación, biocompatibilidad [67], excelente transparencia óptica, buenas propiedades mecánico/químicas [69], óptimas propiedades térmicas [70] y baja humectabilidad [71][18].

Para el MMOR se utilizó un hidrogel (agarosa) que era de origen natural. Este hidrogel se eligió por su alta permeabilidad [72], difusión libre para moléculas pequeñas, ópticamente claro, fácil de obtener y biocompatible [73]. También, se podría haber optado por gelatina [74]. El módulo de microelasticidad del hidrogel oscilaba entre los valores de 0.1 a 1 kPa, dependiendo del mayor o menor porcentaje, en el espacio, de los diferentes componentes del mismo [75]. Para este trabajo se tomó un valor de 0.7 kPa que coincide con un 0.2 % (% en peso/volumen) de agarosa [73].

Una vez definidos los anteriores conceptos, se optó por la fabricación de un *lab on a chip* con características análogas a los datos aportados [19].

4.6.2 Construcción.

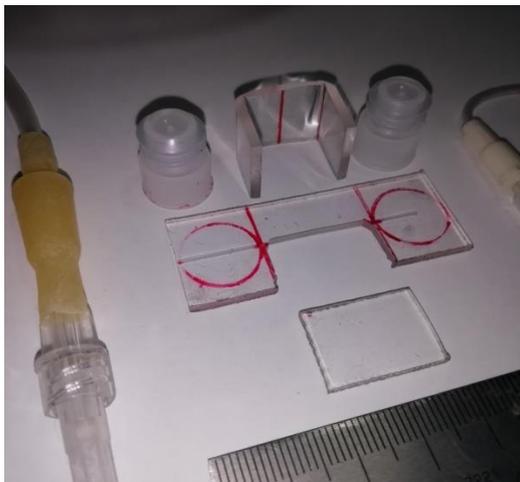
Para la construcción del microcanal se utilizó una instalación compuesta por una máquina fresadora marca Dremel, una mesa fresadora con soportes de fijación y micrómetro, una fresa de diámetro 200 μm y elementos secundarios para su sustentación (figura 13). Este microcanal se realizó sobre una placa de PMMA de 50 mm de ancho, 19 de profundidad y 2 mm de espesor (figura 12). Se realizó un dibujo esquemático sobre la placa para mayor facilidad y precisión de fresado.



A



B



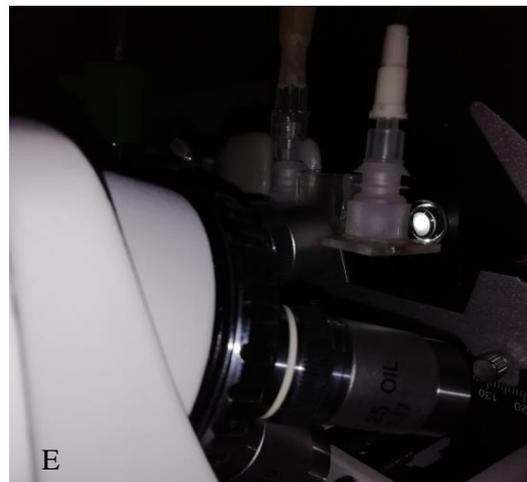
C



D

Figura 13. Construcción del *lab on a chip*. A) Máquina fresadora marca Dremel sobre su mesa fresadora con soportes para la fijación de la placa de PMMA y micrómetro. Se utilizaron elementos secundarios para su sustentación. B) Imagen con los diferentes componentes del *lab on a chip*. C) Detalle del microcanal. D) Equipamiento para el registro del movimiento de las NPMs en el microcanal y en el hidrogel. Este equipamiento se componía de un microscopio sobre el que se situaba el *lab on chip*, una instalación para el soporte de este y de la cámara y un ordenador, conectado a la cámara para el registro de las imágenes. E) Detalle del *lab on chip* y del objetivo del microscopio.

[Ir a discusión](#)



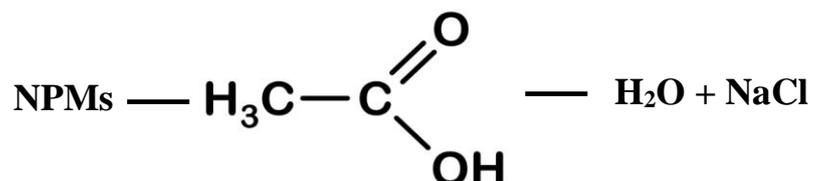
E

Antes de realizar el fresado se aplicó sobre la superficie de la placa un lubricante para absolver el calor generado en la eliminación de material y no producir fusión del mismo. La fresa perforó la placa hasta una profundidad de $100\ \mu\text{m}$ y comenzó a desbastar material generando un primer microcanal de $200\ \mu\text{m}$ de ancho. La longitud del microcanal fue de $24\ \text{mm}$. Esta longitud se repartió entre los $3\ \text{mm}$ que quedaban en la parte inferior de cada conector y los $18\ \text{mm}$ del microcanal. Para eliminar las impurezas que quedaron se aplicó un gel exfoliante que no dañaba al PMMA.

El siguiente paso fue retirar la parte de la placa que se situaba en la zona anterior al microcanal. Este proceso se realizó con una herramienta de corte utilizada por el dremel. Las dimensiones de

esta placa fueron de 18 mm de ancho, 9 mm de profundidad y 2 mm de espesor. Esto supuso el rebajar el microcanal de 200 μm de anchura a 100 μm . Este fue el ancho definitivo como queda reflejado en el detalle de la [figura 12](#).

Las NPMs que se adquirieron eran solubles en disolvente orgánico (apolar) por su bajo coste. Para poder disolverlas en el suero fisiológico (polar) se utilizó ácido acético con una concentración del 6.7% en agua. Su composición química es $\text{CH}_3\text{-COOH}$ compuesta de dos monómeros. El primero, un grupo polar (grupo carboxilo) y, el segundo, un grupo apolar, el monómero orgánico CH_3 . La función de estos monómeros era el conectar las NPMs, unidas al primer monómero con el suero fisiológico enlazado con el segundo.

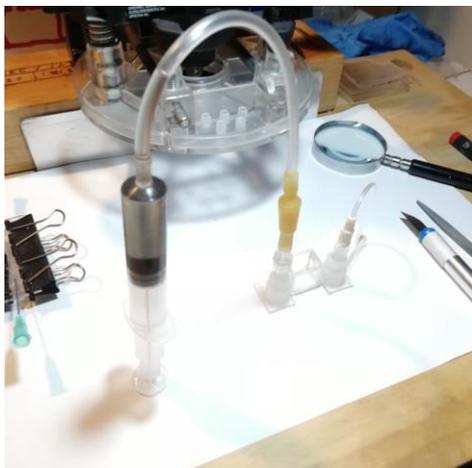


Para la disolución se vertió 3 10^{-2} ml de NPMs disueltas en el disolvente orgánico sobre 1 ml de ácido acético en un tubo de ensayo a temperatura ambiente. La disolución resultante se agitó vigorosamente durante 30 segundos para su homogenización.

La [inyección](#) del suero fisiológico con las NPMs se realizó a través de una jeringuilla conectada a un conducto. Este conducto se introducía en un conector de 6 mm de diámetro en su parte superior y 12 mm en la inferior. La altura de este conector fue de 30 mm. Este se situó sobre el microcanal, en su zona proximal, para poder introducir el suero fisiológico en él. Se dispuso de otro conector de las mismas características en la zona terminal del microconducto para dar salida al suero fisiológico con las NPMs que no hubieran conseguido migrar al gel [\(figura 13\)](#).

Para poder depositar el gel de agarosa se creó un [depósito](#) de 18 mm de largo, 9.8 mm de ancho y 18 mm de profundidad en PMMA [\(figura 12\)](#). Este depósito se insertó sobre el microcanal para que las NPMs pudieran desplazarse sobre este y migrar al gel.

El hidrogel se fabricó utilizando la temperatura como método de reticulación. En general, la agarosa gelifica a una temperatura inferior a los 40° C, mientras que su temperatura de fusión es de aproximadamente 80° C [\[73\]](#). Para su preparación se utilizó un tampón TBE (Tris, borato y EDTA (ácido etilendiaminatetraacético)). Las dimensiones de este hidrogel fueron de 18 mm de ancho y 15 mm de alto. En estas dimensiones fue por donde avanzaron las NPMs. La profundidad del hidrogel fue de 9.8 mm. Esta dimensión tuvo como finalidad dar volumen al hidrogel y no se tuvo en consideración para los cálculos.



[Figura 14](#). *Lab on chip* constituido por una lámina de PMMA con un microcanal, una toma de entrada del fluido y las NPMs, una toma de salida del fluido, una capa de hidrogel y un imán permanente.

La lámina de PMMA se situó en la parte inferior. En los extremos del microcanal de esta lámina se situaron las tomas de entrada y salida. Sobre esta lámina se situó la capa de hidrogel. Por último, se situó el imán permanente por encima del hidrogel y en su parte posterior, para poder ubicar el objetivo del microscopio

[Ir a discusión](#)

4.6.3 Evaluación.

La evaluación consistió en la entrada de suero fisiológico con NPMs por el primer conector para poder detectar posibles fugas en el *lab on a chip*. Se detectaron pequeñas fugas en la base de los conectores que fueron eliminadas con soldadura fría (cianoacrilato). Se realizó una nueva inyección de suero observándose la desaparición de las fugas ([figura 14](#)).

4.6.4 Puesta en funcionamiento.

Este proceso es el que proporciona los resultados para poder ser discutidos. Para ello, se posicionó la cámara en horizontal frente al *lab on a chip*, realizándose un primer registro del movimiento de las NPMs. Posteriormente, se situó el microscopio en posición horizontal. El objetivo se dispuso confrontado con la zona anterior del *lab on a chip*. Para poder situar este objetivo en esta zona se habilitó un espacio ([figura 13](#)). Se introdujo el suero fisiológico con las NPMs en el primer conector. Por ello, se pudo observar tanto el microcanal como el MMOR, y poder registrar el movimiento de estas NPMs.

5. SEGUNDO BLOQUE. Estudio teórico y simulación de la dinámica del complejo CNK-NPM.

5.1 Materiales y métodos.

5.1.1 Células NK.

Las células NK, un tipo de glóbulo blanco, tienen forma esférica y su núcleo es redondeado o levemente hendido. Sobre este núcleo se sitúa el citoplasma formando un halo alrededor del mismo [57].

Estas células son linfocitos granulares grandes [20] del sistema inmune innato. Consiguen eliminar células infectadas o transformadas sin inmunización específica de forma directa [76].

Son un tipo de células del sistema inmunitario innato funcionando como primera línea de defensa. Comprenden entre el 15 al 29 % de los linfocitos sanguíneos circulantes. Se encuentran en el plasma sanguíneo, en el bazo, el hígado, ganglios linfáticos y médula ósea roja (figura 7). En su fenotipo aparece la proteína CD56 que pueden reconocer la parte Fc (fragment crystallizable región) de los anticuerpos [76] y carecen del receptor asociado de linfocitos T (CD56+ CD3-). Existen 2 subtipos de células NK atendiendo a la densidad de expresión de la proteína CD56: NK dim y NK bright. Las primeras se identifican por la expresión del receptor de la fracción constante de las inmunoglobulinas (CD16) y la pequeña expresión de CD56. Las segundas tienen una gran expresión de CD56 no existiendo tanto CD16 como Miller immunoglobulin-like receptors (KIR). Ambos subtipos de células NK adquieren funciones diferentes. De este modo, las células NK dim son las que intervienen en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Para ello, utilizan el receptor CD16. Producen la respuesta inmune innata inmediata sobre células tumorales o infectadas. Las células NK bright muestran propiedades inmunorreguladoras por la generación de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y factor de necrosis tumoral alfa, entre otras. Ostentan mayor capacidad de proliferación. Aproximadamente, en individuos sanos, el 90% de las células NK de sangre periférica y del bazo son NK dim, mientras que y la mayor parte de las células NK bright se concentran en los ganglios linfáticos. En pacientes con cáncer, existe un mayor porcentaje de células NK bright en sangre periférica [77].

Por ello, no poseen las moléculas de membrana que caracterizan a las células T y B. Estas células atacan a una gran variedad de microbios infecciosos y algunas células tumorales de surgimiento espontáneo. Eliminan cualquier célula del organismo que contenga en su membrana proteínas anómalas extrañas. Esto se produce por dos vías diferentes. En la primera, la célula NK al adherirse a la célula extraña libera gránulos cargados de la proteína perforina. Esta proteína se inserta en la membrana plasmática de la célula a eliminar generando perforaciones en la misma. Debido a esto, el líquido extracelular entra en la célula y la destruye en un proceso denominado citólisis (la célula se hincha y explota). En la segunda, cuando la célula NK se une a la célula a eliminar, segrega unos gránulos que se encuentran cargados con la proteína granzima. Esta actúa como una enzima proteolítica digestiva que provoca la apoptosis o autodestrucción celular [57].

Otra manera de activar las células NK es por la acción de mediadores solubles, normalmente citocinas.

La citotoxicidad de estas células se produce sin restricción del antígeno leucocitario humano (ALH), una característica importante para la inmunoterapia contra el cáncer, aunque, hay que tener en cuenta que, las células NK obtienen la función citotóxica con posterioridad a encontrar y reconocer moléculas auto-HLA en un proceso definido como “licenciamiento” o educación de células NK. Las diferentes funciones de las células NK se encuentra gobernadas por un equilibrio entre las señales recibidas de receptores inhibitorios y receptores de activación que reconocen los ligandos de estas células. Por ello, estos receptores requieren mecanismos para que no se produzcan activaciones involuntarias contra tejidos normales. A estos mecanismos se les define como “tolerance to self” [78][79].

Las células NK provienen de los progenitores hematopoyéticos CD34 + multipotente de la médula ósea. La maduración de estas células se produce tanto en la médula ósea como en los órganos linfoides. Estas células, aunque la diferenciación de las células progenitoras se viera afectada, pueden permanecer en la sangre periférica. Esto significa que puede existir un mantenimiento homeostático en la sangre de alrededor de 2 semanas. Este tipo de células se duplican cada 13.5 días [79].

El diámetro de los glóbulos blancos es de 10 μm , con una susceptibilidad magnética de entre $\chi_{\text{GB}} = - 9.2 \cdot 10^{-6}$ a $\chi_{\text{GB}} = - 9.9 \cdot 10^{-6}$ (el signo negativo informa sobre el diamagnetismo de las mismas) y una densidad de 1070 kg m^{-3} [45].

5.1.2 **Fluido.**

El **fluido** a simular fue sangre con densidad de $\rho = 1050 \text{ Kg/m}^3$ [80]. La viscosidad de la sangre depende de diferentes parámetros que se tuvieron en cuenta, siendo estos: un microcanal de diámetro 100 μm , un hematocrito del 40 % y una viscosidad del plasma de $\eta = 0.00150 \text{ N s/m}^2$. La viscosidad, para estos parámetros, tomó el valor de $\eta = 0.00383 \text{ N s/m}^2$ [55][80]. La susceptibilidad magnética χ_f tomó el valor de 0 y la permeabilidad magnética la del vacío $\mu_f \approx \mu_0$.

5.1.3 **MMOR**

El microambiente de la médula ósea roja se dividió, para efectuar los cálculos, en dos tipos de compartimentos. El primero, por donde circulaba el **fluido**, entre los diferentes componentes que conformaban el microambiente (figura 10), con **propiedades** anteriormente descritas.

El segundo, la matriz extracelular (figura 11), con componentes que conformaban el microambiente, con propiedades como la porosidad, densidad y permeabilidad, de 99.6 %, $\rho = 950 \text{ Kg/m}^3$ [81] y $5.1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2$, respectivamente [43][55][58] [40][82][21.].

5.1.4 **Introducción de las NPMs dentro de las células.**

Existen diferentes métodos para introducir las NPMs en el citoplasma de células. Para que se produzca este consumo por parte de la célula se han de tener en cuenta diversos factores.

Los factores a tener en cuenta fueron las propiedades de la célula, las propiedades de las NPMs y el procedimiento que conduce a esta inyección de NPMs.

En un trabajo realizado por Nicole Pamme y Claire Wilhelm las NPMs entraron por endocitosis, sin influencia externa, en macrófagos y células cancerosas del ovario humano. El consumo de NPMs se encontró influenciado por la forma (esférica), el tiempo de incubación (entre 1 y 6 h.) y el tamaño de las células [29].

Con la utilización de un imán externo estático se produjeron varias mejoras. E. P. Furlani et al (2012) [12] redujeron el tiempo del consumo celular de NPMs a 10 min. Consiguieron una elevada tasa de transfección (figura 1) para dosis bajas de NPMs. Su método puede ser utilizado para células no permisivas a la entrada de NPMs.

Un método para la introducción de NPMs en células NK lo utilizaron Eue-Soon Jan et al. (2012) (figura 15) creando un campo de gradiente aplicado durante 30 min. El porcentaje de NPMs en el interior de la células NK con una concentración inicial de las mismas de 5 y 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ fue del 41 % y 93.2 % respectivamente. A las 72 h estos porcentajes disminuyeron hasta los 3 % y 22 % debido a la proliferación de las células o a la exocitosis de las NPMs [31].

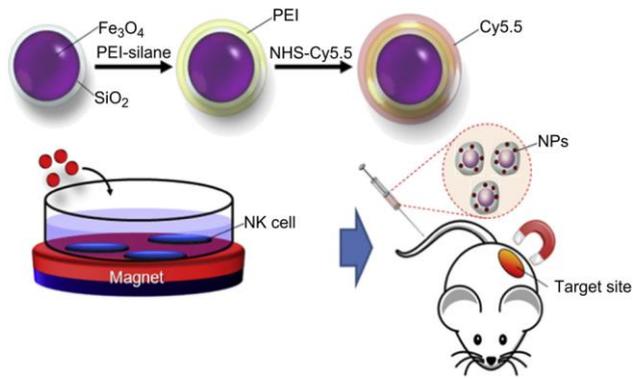


Figura 15. Endocitosis de NPMs en células NK. El primer paso es la preparación de las NPMs recubriéndolas con PET-silano y tintes fluorescentes. Seguidamente, se incuban con células NK. Imagen obtenida de The manipulation of natural killer cells to target tumor sites using magnetic nanoparticles Jang, Eue-Soon; Shin, June-Ho; Ren, Gang; et al.(2012).

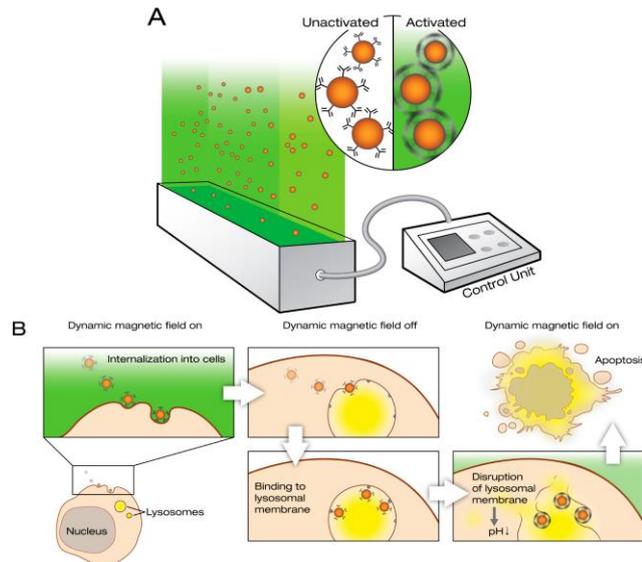


Figura 16 .Rotación de control DMF de nanopartículas magnéticas. (A) Representación esquemática del generador DMF. El dispositivo gobierna la rotación y el movimiento de nanopartículas magnéticas (SPION) con un campo de baja frecuencia (10 40 Hz). A diferencia de los generadores de campos magnéticos alternos conocidos, el generador DMF hace que las nanopartículas giren alrededor de su propio eje. (B) Principio de funcionamiento del generador DMF: inducción remota de apoptosis. Cuando las nanopartículas dirigidas (LAMP1-SPIONs) entran en contacto con las membranas celulares, su internalización puede mejorarse mediante la activación de la rotación lenta de las nanopartículas. Esto provoca un movimiento de rotación (rodar) de las nanopartículas a través de la membrana celular que, finalmente, se internalizan. Una vez internalizadas, las LAMP1-SPION entran en los lisosomas y se unen a la membrana lisosomal. Cuando la DMF se activa en este punto, las nanopartículas comienzan a rotar y las fuerzas de cizallamiento resultante provocan lesiones en la membrana lisosomal. Esto, a su vez, produce la fuga del contenido lisosómico hacia el citoplasma, lo que genera una disminución de su pH y, posteriormente, la apoptosis. Imagen obtenida de Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation. Enming Zhang et al. (2014).

Mahendran Subramanian et al. (2017) utilizaron una matriz magnética, de polos alternantes, oscilante, con frecuencia de oscilación de 3 Hz, desplazamiento 2 mm y gradiente de campo magnético de entre 100-200 T/m aplicado durante 30 min para la introducción de NPMs en distintos tipos de células. Estas NPMs tenían carga positiva en su superficie. La proporción de NPMs introducidas en el interior de las células variaba con el tipo de células. En concreto, para células SH-SY5Y el porcentaje de transfección (figura 1) fue de 82.33% \pm 3.88% llegando al 48 % a las 48 horas [33].

Con un generador de campo magnético dinámico (DMC) se creó un gradiente de campo magnético para hacer rotar a las NPMs consiguiendo superar tanto la barrera de la membrana plasmática como la de los endosomas. Este trabajo lo realizaron Enming Zhang et al. (2014) (figura 16) consiguiendo introducir en estos endosomas hasta un 13.3% \pm 2.3% de las NPMs después de 20 min. y a 20 Hz de aplicación del DMC. Este consistía en una matriz de sistemas de

bobinas multifase que se movían acercándose y alejándose unas de las otras [32].

5.2 Estudio de la trayectoria del complejo CNK-NPM bajo un campo magnético.

El movimiento de células NK, en cuyo interior se alojaron NPMs (complejo CNK-NPM), en un fluido influenciadas por un campo magnético externo se encontraba afectado por diferentes fuerzas. Entre estas fuerzas se incluían las fuerzas magnéticas y fluídicas, fuerza de la gravedad, fuerzas de flotabilidad (buoyancy), dinámica browniana, y fuerzas de elevación (si se toma la célula NK como circular) [45].

De entre ellas, las que más influencia produjeron sobre el complejo CNK-NPM en su movimiento, tomando como referencia el tamaño de las células, de 10 µm de diámetro, su velocidad y el diámetro del microcanal fueron las fuerzas magnéticas, fluídicas, gravitacionales y de flotabilidad [45][83].

5.2.1 Ecuación del movimiento

Para poder determinar la trayectoria del complejo CNK-NPM se utilizó el mismo procedimiento que en el primer bloque. Por ello, se aplicó la segunda ley de Newton, como se expresa a continuación.

$$m_{cel} \cdot \frac{\partial v_{cel}}{\partial t} = \mathbf{F}_m + \mathbf{F}_f + \mathbf{F}_{g,b} \quad (ec.25)$$

Donde, m_{cel} y v_{cel} son la masa y la velocidad del complejo CNK-NPM y \mathbf{F}_m , \mathbf{F}_f , y $\mathbf{F}_{g,b}$ son las fuerzas magnética, fluídica y gravitacional-flotabilidad, respectivamente.

La masa de la célula NK se calculó utilizando su densidad y volumen. Esta masa fue de $5.6 \cdot 10^{-13}$ kg.

Las células NK son diamagnéticas por lo que se les generó una fuerza magnética de repulsión en contra del campo magnético. En este trabajo, se despreció esta fuerza porque, aunque el volumen de las células era del orden de 3 veces superior al de las NPMs, su susceptibilidad magnética fue del orden de 6 veces inferior [83]. En conjunto la fuerza magnética sobre las NPMs fue del orden de 3 veces superior a la fuerza magnética sobre las células.

El movimiento del complejo CNK-NPM en el fluido, al igual que en la NPM, fue del tipo transporte dominado por la deriva. Este movimiento es debido a su tamaño como puede desprenderse del criterio de Gerber et al. (1983) [46]

5.2.2 Fuerza magnética

La fuerza magnética en el complejo CNK-NPM (figura 5) [49] se definió utilizando el método del momento dipolar "efectivo" $\mathbf{m}_{c,eff}$ que se producía en la célula debido a las NPMs alojadas en su interior [50][29][84]. Con ello, se determinó el número de NPMs alojadas en el interior de la célula.

Dos estudios aportaron la cantidad máxima de NPMs que podían alojarse en el interior de diferentes células. Ambos, analizaron, desde dos perspectivas diferentes, la máxima cantidad de NPMs en macrófagos, llegando a la misma conclusión.

El máximo momento dipolar efectivo para una célula con NPMs en su interior, con un periodo de incubación de una hora y un diámetro 9 ± 1 µm, fue de $4 \cdot 10^{-13}$ A m². La máxima distribución de NPMs, en el interior de un monocito, un tipo de glóbulo blanco fue de 2 pg (picogramos) [84] que aportó un momento dipolar efectivo de $1.45 \cdot 10^{-13}$ A m², muy similar al anterior.

El diámetro de una NPM fue de 40 nm. Para calcular su momento dipolar "efectivo", $m_{p,eff}$, en saturación se realizó el producto de la magnetización de saturación de la NPM, $M_{sp} = 4.78 \cdot 10^5$ A/m y el volumen de la misma. La saturación se conseguía para campos magnéticos de 0.3 T o superiores [29].

$$V_{NPM} = \frac{4}{3} \pi R^3 \quad (ec.26)$$

$$V_{\text{NPM}} = \frac{4}{3}\pi(20 \cdot 10^{-9})^3 = 3.3510^{-23} \text{m}^3$$

$$\mathbf{m}_{p,\text{eff}} = M_{\text{sp}} V_{\text{NPM}} \quad (\text{ec.27})$$

$$\mathbf{m}_{p,\text{eff}} = 4.78 \cdot 10^5 \cdot 3.35 \cdot 10^{-23} = 1.610^{-17} \text{A m}^2$$

El momento dipolar efectivo para una célula NK cargada con NPMs, $\mathbf{m}_{c,\text{eff}}$, se definió de $4 \cdot 10^{-13} \text{Am}^2$. Conociendo este $\mathbf{m}_{c,\text{eff}}$ y el $\mathbf{m}_{p,\text{eff}}$ de la NPM, se pudo determinar el número de NPMs que se debían introducir por célula.

$$N_{\text{NPMs}}^{\circ} = \frac{4 \cdot 10^{-13}}{1.16 \cdot 10^{-17}} = 34.863$$

La fuerza magnética sobre el complejo CNK-NPM quedó definida como

$$\mathbf{F}_m = \mu_f (\mathbf{m}_{c,\text{eff}} \cdot \nabla) \mathbf{H}_a \quad (\text{ec.28})$$

donde μ_f es la permeabilidad magnética del fluido por el que fluye el complejo CNK-NPM, $\mathbf{m}_{c,\text{eff}}$ es el momento dipolar "efectivo" del complejo CNK-NPM, y \mathbf{H}_a es la intensidad del campo magnético externo generado en el conjunto de NPMs. Se debe contemplar que la $\mathbf{m}_{c,\text{eff}}$ quedó definida por el conjunto de $\mathbf{m}_{p,\text{eff}}$ y que estas dependían de \mathbf{H}_a .

Los cálculos para la $\mathbf{m}_{p,\text{eff}}$ quedaron definidos en el bloque 1.

Para determinar la susceptibilidad magnética del complejo CNK-NPM χ_{cel} , se partió de su $\mathbf{m}_{c,\text{eff}}$ y su volumen. Utilizando la expresión $M_{\text{cel}} = \frac{\mathbf{m}_{c,\text{eff}}}{V_{\text{cel}}} = \frac{4 \cdot 10^{-13}}{\left(\frac{4}{3}\pi (5 \cdot 10^{-6})^3\right)} = 763.9 \text{ A/m}$, donde V_{cel} es el volumen de la célula NK, se calculó la magnetización de este complejo. Seguidamente, se evaluó la χ_{cel} con la expresión $\chi_{\text{cel}} = \frac{M_{\text{cel}}}{H_a} = \frac{763.9}{1.07 \cdot 10^6}$ generando un valor de $7.11 \cdot 10^{-4}$.

En este segundo bloque, no es de aplicación el modelo utilizado en el bloque 1, debido a que $\chi_c \ll 1$ utilizándose, en este caso, la χ_{cel} para realizar los cálculos.

El imán permanente que fue utilizado tenía una magnetización de saturación de $M_s = 1.35/(4 \cdot \pi \cdot 10^{-7}) = 10.7 \cdot 10^5 \text{ A/m}$ ($B_r = 1.35 \text{ T}$).

La expresión de la fuerza magnética quedó definida como

$$\mathbf{F}_m(x, y) = F_{mx}(x, y)\hat{\mathbf{x}} + F_{my}(x, y)\hat{\mathbf{y}} \quad (\text{ec.29})$$

donde

$$\begin{aligned} F_{mx}(x, y) = & \mu_0 V_{\text{cel}} f(H_a) \frac{M_s}{2\pi} \left(\frac{M_s}{4\pi} \left(\ln \left(\frac{(x+w)^2 + (y-h)^2}{(x+w)^2 + (y+h)^2} \right) - \right. \right. \\ & \ln \left(\frac{(x-w)^2 + (y-h)^2}{(x-w)^2 + (y+h)^2} \right) \left(\frac{x+w}{(x+w)^2 + (y-h)^2} - \frac{x+w}{(x+w)^2 + (y+h)^2} - \frac{x-w}{(x-w)^2 + (y-h)^2} + \frac{x-w}{(x-w)^2 + (y+h)^2} \right) + \\ & \left. \left(\frac{M_s}{2\pi} \left(\tan^{-1} \left(\frac{2h(x+w)}{(x+w)^2 + y^2 - h^2} \right) - \tan^{-1} \left(\frac{2h(x-w)}{(x-w)^2 + y^2 - h^2} \right) \right) \left(\frac{y-h}{(x+w)^2 + (y-h)^2} - \frac{y-h}{(x-w)^2 + (y-h)^2} - \right. \right. \right. \\ & \left. \left. \frac{y+h}{(x+w)^2 + (y+h)^2} + \frac{y+h}{(x-w)^2 + (y+h)^2} \right) \right) \end{aligned} \quad (\text{ec.30})$$

$$\begin{aligned} F_{my}(x, y) = & \mu_0 V_{\text{cel}} f(H_a) \frac{M_s}{\pi} \left(\frac{M_s}{4\pi} \left(\ln \left(\frac{(x+w)^2 + (y-h)^2}{(x+w)^2 + (y+h)^2} \right) - \right. \right. \\ & \left. \left. \ln \left(\frac{(x-w)^2 + (y-h)^2}{(x-w)^2 + (y+h)^2} \right) \right) \left(\frac{h(y^2 - (x+w)^2 - h^2)}{((x+w)^2 + y^2 - h^2)^2 + 4h^2(x+w)^2} - \frac{h(y^2 - (x-w)^2 - h^2)}{((x-w)^2 + y^2 - h^2)^2 + 4h^2(x-w)^2} \right) + \right. \end{aligned}$$

$$\left(\frac{M_s}{2\pi} \left(\tan^{-1} \left(\frac{2h(x+w)}{(x+w)^2+y^2-h^2} \right) - \tan^{-1} \left(\frac{2h(x-w)}{(x-w)^2+y^2-h^2} \right) \right) \right) \left(\frac{2hy(x-w)}{((x-w)^2+y^2-h^2)^2+4h^2(x-w)^2} - \frac{2hy(x+w)}{((x+w)^2+y^2-h^2)^2+4h^2(x+w)^2} \right) \quad (\text{ec.31})$$

5.2.3 Fuerza fluidica.

La aproximación de Stokes para la fuerza sobre una partícula esférica se utilizó para poder obtener la fuerza fluidica (figura 5) sobre el complejo CNK-NPM. En el primer bloque quedó reflejado las condiciones que se debían cumplir para su utilización.

$$\mathbf{F}_f = -6\pi\eta R_{cel}(\mathbf{v}_{cel} - \mathbf{v}_f) \quad (\text{ec.32})$$

donde \mathbf{v}_{cel} y R_{cel} eran la velocidad y el radio de la célula, respectivamente, y η la viscosidad de la sangre [83].

Atendiendo al efecto Fahraeus-Linquist (figura 17), el flujo de sangre se toma como newtoniano cuando esta circula por un microcanal con diámetros de entre 10 a 100 μm . Este hecho se produce porque la sangre aparenta una disminución en su viscosidad y en la cantidad de células que circulan debido a que se dirigen hacia el eje medio del microcanal [47][55].

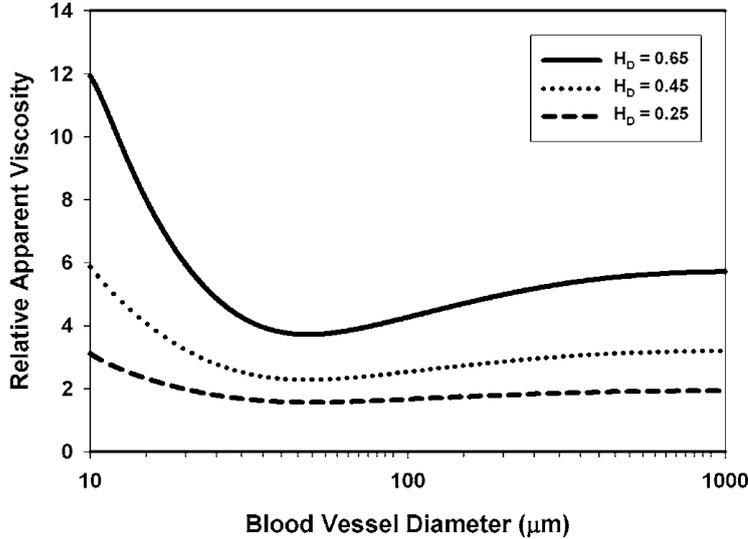


Figura 17 . Efecto Fahraeus-Linquist. Viscosidad aparente relativa en función del diámetro del vaso sanguíneo y del hematocrito. Imagen obtenida de Analytical model of magnetic nanoparticle transport and capture in the microvasculature. E. P. Furlani and K. C. Ng.

En este trabajo, para un microcanal y una célula de 100 μm y 10 μm de diámetro, respectivamente, este efecto se encontraba en el límite del ámbito de aplicación. Por este motivo, se tomó la viscosidad constante y las células uniformemente distribuidas, atribuyéndose al flujo como newtoniano.

Para calcular la ecuación anterior, hacía falta obtener el campo de velocidades de la sangre, $\mathbf{v}_f(t)$. También, era preciso definir las condiciones iniciales de la posición y de la velocidad de la célula para poder determinar su trayectoria.

La velocidad de la sangre se determinó aplicando las mismas condiciones que en el primer bloque. Para poder definir si el flujo era laminar o turbulento se analizó el número de Reynolds, R_e , en el microcanal.

$$R_e = \frac{v_f \cdot D \cdot \rho}{\eta} \quad (\text{ec.33})$$

Donde v_f es la velocidad de la sangre 0.0001 m/s [53], D es la longitud característica (el diámetro hidráulico) de 100 μm , ρ es la densidad de la sangre y η su viscosidad.

El límite entre el flujo en régimen laminar y turbulento se encuentra aproximadamente en torno al valor de 2300 [54][55]. En el caso que nos ocupaba

$$R_e = \frac{0.0001 \cdot 100 \cdot 10^{-6} \cdot 1.050 \cdot 10^3}{3.83 \cdot 10^{-3}} \quad (\text{ec.34})$$

Por lo que, al estar el valor de 2.74 [55] muy por debajo de 2300, el flujo fue del tipo laminar. El fluido fluyo de la misma forma que en el primer bloque y la fuerza fluidica sobre la célula se comportó de manera análoga.

La velocidad del fluido siguió la ley de Poiseuille. Al ser las variaciones temporales de la velocidad del fluido muy lentas, el fluido tomó en cada momento la distribución de Poiseuille correspondiente a esa velocidad media.

$$v_{f,x}(y) = 2\bar{v}_f \left[1 - \frac{y^2}{R_v^2} \right] \quad (\text{ec.35})$$

Donde R_v es el radio del microcanal y \bar{v}_f es la velocidad media en el canal (promediada en la sección del canal). Para obtener la componente de la fuerza en el eje Y, se sustituyó la velocidad de la célula en la (ec.32), mientras que para poder determinarla en el eje X se sustituyó la (ec.35) en la (ec.32) [47].

$$F_{fy} = -6\pi\eta R_{cel} v_{y,cel} \quad (\text{ec.36})$$

$$F_{fx} = -6\pi\eta R_{cel} \left\{ v_{x,cel} - 2\bar{v}_f \left[1 - \frac{y^2}{R_v^2} \right] \right\} \quad (\text{ec.37})$$

donde V_x y V_y eran las dos componentes de la velocidad de la célula.

5.2.4 Fuerza gravitatoria y de flotabilidad (buoyancy).

Las fuerzas gravitatoria y de flotabilidad (figura 5) influyen en el movimiento cuando el diámetro de la partícula se acerca a los 10 μm . Este concepto es válido cuando el valor de las fuerzas implicadas está en torno a los 0.1 pN. En este tipo de trabajos, este valor de la fuerza es el que predomina [45].

En este trabajo se tomó las fuerzas gravitatoria y de flotabilidad trabajando conjuntamente. La expresión que relacionaba estas dos fuerzas se expresó como:

$$\mathbf{F}_{g,b} = -V_{cel}(\rho_{cel} - \rho_f)\mathbf{g} \quad (\text{ec.38})$$

donde $\mathbf{F}_{g,b}$ es la fuerza gravitacional-flotabilidad, y V_{cel} , ρ_{cel} , ρ_f y \mathbf{g} son el volumen de la célula NK, su densidad, la densidad del fluido, y la aceleración debida a la gravedad, respectivamente.

Esta fuerza solo tiene componente vertical. En las ecuaciones siguientes se introdujo en la ecuación que representaba al eje Y. Se expresó de la siguiente manera:

$$F_{(g,b)y} = -V_{cel}(\rho_{cel} - \rho_f)g \quad (\text{ec.39})$$

5.2.5 Determinación de la trayectoria del complejo CNK-NPM.

Para realizar la evaluación de la (ec.25) y poder calcular la trayectoria del complejo CNK-NPM, se descompuso esta en las dos dimensiones del espacio donde se iba a analizar esta trayectoria.

$$m_{cel} \cdot \frac{\partial v_{y,cel}}{\partial t} = F_{my}(x, y) - 6\pi\eta R_{cel} v_{y,cel} - V_{cel}(\rho_{cel} - \rho_f)g \quad (\text{ec.40})$$

$$m_{cel} \cdot \frac{\partial v_{x,cel}}{\partial t} = F_{mx}(x, y) - 6\pi\eta R_{cel} \left\{ v_{x,cel} - 2\bar{v}_f \left[1 - \frac{y^2}{R_v^2} \right] \right\} \quad (\text{ec.41})$$

$$v_{x,cel} = \frac{dx}{dt} \quad v_{y,cel} = \frac{dz}{dt} \quad (\text{ec.42})$$

Las ecuaciones anteriormente expuestas conformaban un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs, que se podrían resolver si se conocían los valores iniciales del movimiento $x(0)$, $y(0)$, $v_{x,cel}(0)$ y $v_{y,cel}(0)$.

5.3 Migración del complejo CNK-NPM al MMOR.

5.3.1 Paso de las células a través del endotelio capilar.

Los sinusoides (figura 7) de la médula ósea roja son capilares grandes, del orden de 100 μm y tortuosos. Están constituidos por una única capa de células endoteliales con fenestraciones grandes. Entre estas células existen hendiduras intercelulares muy grandes que dejan paso a las células sanguíneas. Los sinusoides se encuentran recubiertos de una membrana basal incompleta o ausente [57].

Las células NK, por el proceso definido como migración, ruedan y se fijan a las células endoteliales (figura 7). Posteriormente se introducen en la médula ósea roja por las hendiduras existentes entre dichas células. Para ello, en las células epiteliales se encuentran las selectinas, que frenan y hacen rotar a las células NK y en estas se sitúan las integrinas que la adhieren al epitelio [57][85].

Por este motivo, las células, al traspasar el endotelio capilar, comienzan de nuevo su movimiento, a través del MMOR, siendo su velocidad inicial nula.

5.3.2 Ecuación del movimiento

El complejo CNK-NPM se mueve en este microambiente a través de los diferentes componentes que lo conformaban .

La composición de este MMOR quedó explicada en el primer bloque de este trabajo.

La ecuación del movimiento aplicada al complejo CNK-NPM tuvo la misma expresión que la utilizada en el vaso sinusoide. El campo magnético que produjo el movimiento del complejo CNK-NPM en el MMOR fue de la misma forma que en el vaso anteriormente citado. La fuerza gravitacional-flotabilidad sobre el complejo CNK-NPM en este microambiente tomó el mismo valor que en el sinusoide. Por tanto, son aplicables los mismos conceptos físicos.

5.3.3 Fuerza fluidica.

El concepto fluidífico en el MMOR varió con respecto a los sinusoides de mayor tamaño. La variación en el MMOR se produjo por ser un medio poroso. El movimiento del fluido quedó definido por la ley de Darcy. Esta ley aparece debido a la porosidad (o tortuosidad) del microambiente. El microambiente está constituido por diferentes elementos definidos en el primer bloque. La Ley de Darcy aportó la velocidad del fluido en un medio poroso [55][61].

La fuerza fluidica quedó definida por la aproximación de Stokes. La velocidad del fluido se determinó utilizando la ecuación de Darcy. Esta aproximación siguió siendo válida al ser la misma célula y la velocidad del fluido inferior que en el sinusoide. Este decrecimiento en la velocidad fue debido a la tortuosidad y amplitud del microambiente.

$$\mathbf{F}_f = -6\pi\eta R_{cel}(\mathbf{v}_{cel} - \mathbf{v}_f) \quad (\text{ec.43})$$

donde \mathbf{v}_f es la velocidad del fluido y η su viscosidad.

La velocidad del fluido se determinó, con el mismo sistema de coordenadas que para los sinusoides. El flujo fue laminar puesto que el diámetro en el MMOR tenía una amplitud mucho mayor que en el sinusoide. Este flujo siguió la dirección paralela al eje Y.

5.3.3.1 Ecuación de Darcy.

El modelo de Darcy fue el más adecuado a utilizar. Esta elección quedó definida en el primer bloque. Esta ecuación se expresa como:

$$\nabla P = \frac{\mu}{k} \mathbf{v}_f \quad (\text{ec.44})$$

donde k es la permeabilidad del MMOR.

El fluido, al igual que en el primer bloque, fue estacionario con velocidad en el MMOR igual a 0.

La fuerza en el complejo CNK-NPM debida al fluido se expresó utilizando la aproximación de Stokes. La fuerza de arrastre se definió como:

$$F_{fy} = -6\pi\eta R_{cel}(v_{cel,y}) \quad (\text{ec.45})$$

$$F_{fx} = -6\pi\eta R_{cel}(v_{cel,x}) \quad (\text{ec.46})$$

5.3.4 Determinación de la trayectoria del complejo CNK-NPM.

Para calcular la trayectoria del complejo CNK-NPM, se descompuso la ecuación del movimiento en las dos dimensiones del espacio.

$$m_{cel} \cdot \frac{\partial v_{cel}}{\partial t} = F_m + F_f + F_{g,b}$$

$$m_{cel} \cdot \frac{\partial v_{cel,y}}{\partial t} = F_{my}(x, y) - 6\pi\eta R_{cel}(v_{cel,y}) - V_{cel}(\rho_{cel} - \rho_f)g \quad (\text{ec.47})$$

$$m_{cel} \cdot \frac{\partial v_{cel,x}}{\partial t} = F_{mx}(x, y) - 6\pi\eta R_{cel}(v_{cel,x})$$

(ec.48)

$$v_{cel,x} = \frac{dx}{dt}; v_{cel,y} = \frac{dz}{dt} \quad (\text{ec.49})$$

Estas ecuaciones conformaban un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs. Estas ecuaciones podían ser resueltas si se conocían los valores iniciales del movimiento $x(0)$, $y(0)$, $v_x(0)$ y $v_y(0)$.

5.4 Simulación de las trayectorias de los complejos CNK-NPM en el MMOR.

Se realizó la simulación de las trayectorias de los complejos CNK-NPM en el seno de un fluido (sangre) y su posterior migración al MMOR, influenciadas por un campo magnético externo. Para ello, se utilizaron las mismas interfases que en el primer bloque a excepción del análisis de las trayectorias de los complejos CNK-NPM en los dos compartimentos. Este análisis se realizó de manera independiente. Esto se debió a la migración de los complejos CNK-NPM. Estos complejos CNK-NPM se adhirieron a la pared del senoide, quedando inmóviles. La simulación en el MMOR, comenzó con una nueva velocidad inicial de los complejos CNK-NPM igual a cero.

La manera de proceder en la simulación fue análoga al primer bloque. En este caso se simuló sangre como fluido. Los conceptos físicos y las geometrías permanecieron invariables con respecto a la simulación del primer bloque. En cambio, las propiedades que se utilizaron para realizar esta simulación fueron las de cada uno de los elementos que constituían los diferentes tejidos (sanguíneo, epitelial y conectivo).

Se realizaron dos simulaciones. La primera, describió las trayectorias de los complejos CNK-NPM a través del senoide. La segunda, aportó las trayectorias de los complejos CNK-NPM en el MMOR.

La posición inicial de los complejos CNK-NPM en la segunda simulación coincidió con la posición final de los complejos CNK-NPM de la primera.

El cálculo de estas trayectorias se realizó de manera análoga al primer bloque.

A continuación, se describen los materiales que formaban parte de cada geometría generada. Para simular el fluido en el senoide se utilizó sangre. Las propiedades a utilizar fueron la densidad, la viscosidad, la susceptibilidad magnética $\chi_f = 0$ y la permeabilidad magnética del vacío $\mu_f \approx \mu_0$.

Para efectuar los cálculos del MMOR se dividió este en dos tipos de compartimentos. El

primero, por donde circulaba el fluido. El segundo, la matriz extracelular con propiedades como la porosidad, densidad y permeabilidad. El imán permanente y las nanopartículas magnéticas que se utilizaron fueron los mismos que en el primer bloque.

6. RESULTADOS.

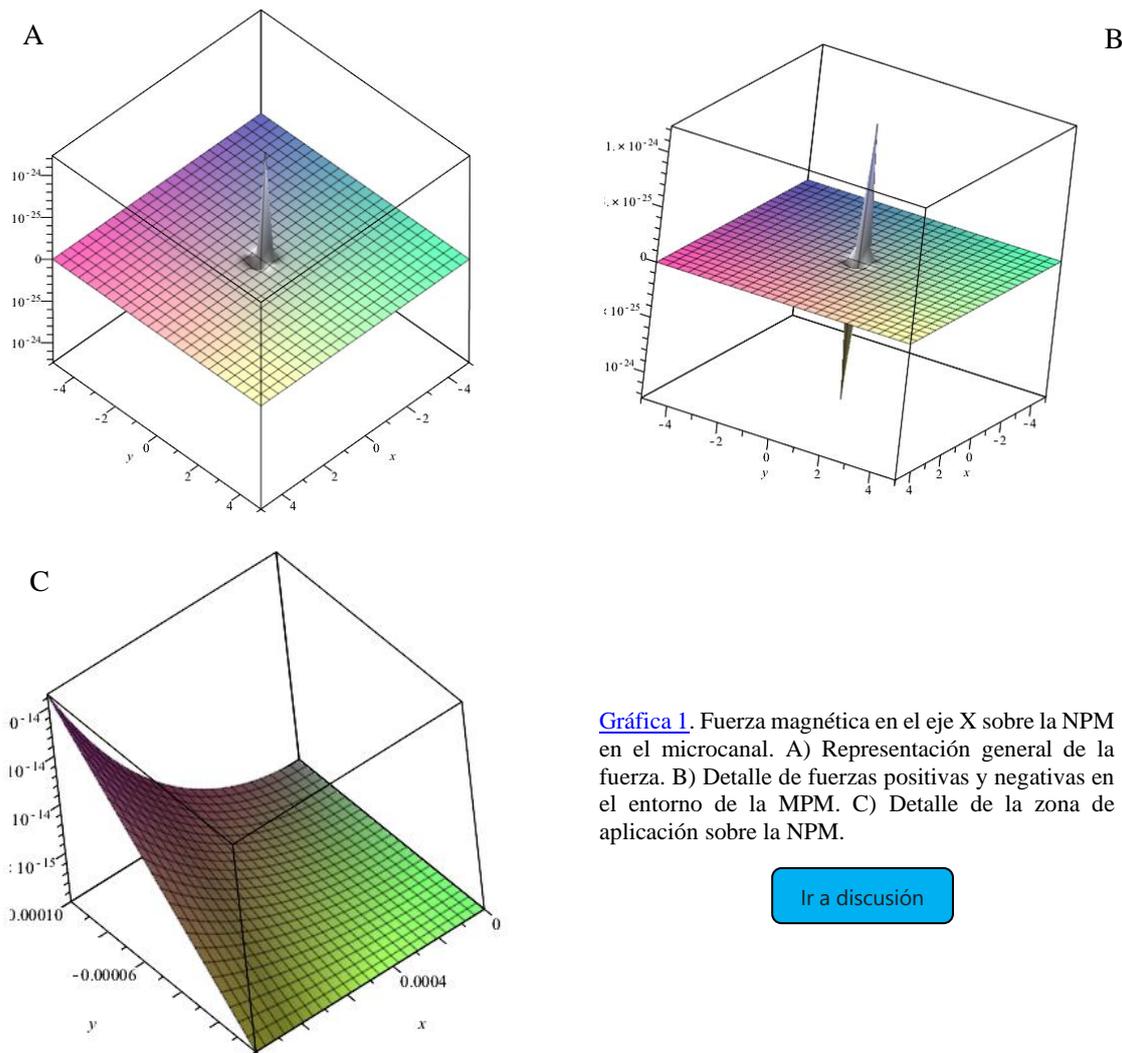
En este trabajo, se realizó el diseño, construcción y evaluación de un *lab on a chip* haciendo uso de cálculos analíticos y simulados, para poder cuantificar su validez. Posteriormente, se efectuó un análisis y obtención de datos, simuladamente, del movimiento del complejo CNK-NPM para la futura fabricación de un *lab on a chip* utilizando este complejo.

6.1 Estudio físico de la trayectoria de la NPM en el microcanal.

El primer paso, para poder determinar la trayectoria de la NPM, fue calcular analíticamente las diferentes fuerzas que actuaban sobre ella en el microcanal (figura 8). Estas fuerzas correspondían a fuerzas magnéticas y fluídicas. Las primeras se generaban debido a un campo magnético externo producido por un imán permanente con calidad N45 (neodimio), rectangular con propiedades como la magnetización de saturación M_s y la densidad de campo magnético B_r . Las segundas, aparecían al circular la NPM por suerro fisiológico con propiedades como la viscosidad η , densidad ρ_f , la susceptibilidad magnética χ_f y la permeabilidad magnética μ_f .

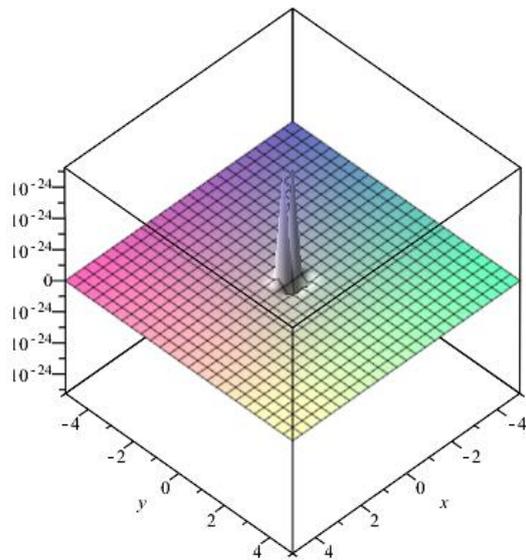
6.1.1 Cálculo de la fuerza magnética.

La fuerza magnética se calculó utilizando la (ec. 3) para una magnetización de la NPM M_p en saturación M_{sp} . Esta fuerza se descompuso en los ejes X (ec. 5) e Y (ec.6) para poder realizar los cálculos. En las gráficas 1 y 2, puede apreciarse el valor de las fuerzas magnéticas en el eje x e y, respectivamente.

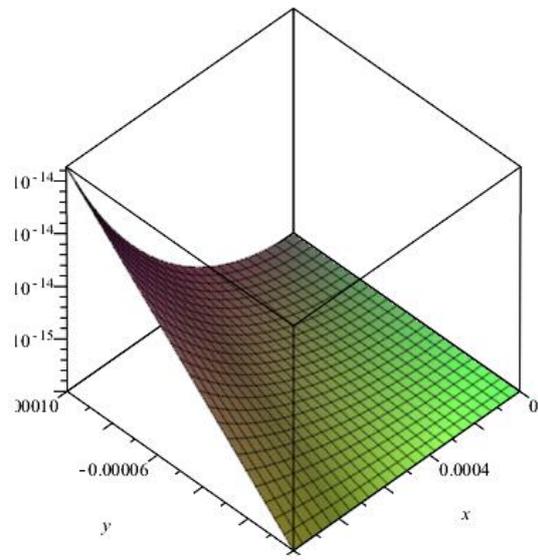


Gráfica 1. Fuerza magnética en el eje X sobre la NPM en el microcanal. A) Representación general de la fuerza. B) Detalle de fuerzas positivas y negativas en el entorno de la MPM. C) Detalle de la zona de aplicación sobre la NPM.

[Ir a discusión](#)



A



B

Gráfica 2. Fuerza magnética en el eje Y sobre la NPM en el microcanal. A) Representación general de la fuerza. B) Detalle de la zona de aplicación sobre la NPM.

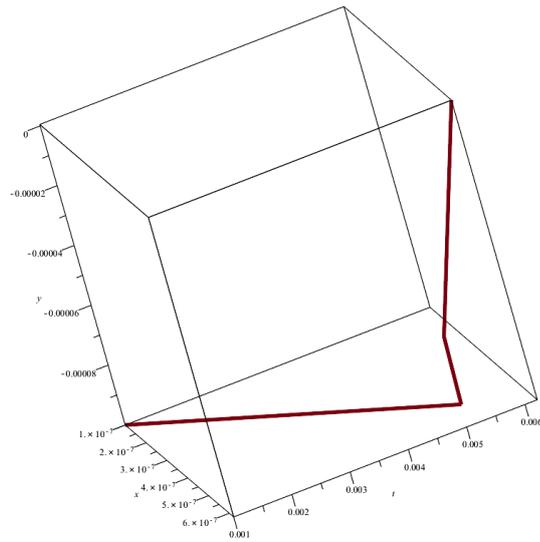
6.1.2 Cálculo de la fuerza fluidica.

La fuerza fluidica se calculó utilizando la aproximación de Stokes ([ec. 7](#)). El fluido se tomó como estacionario y en régimen laminar. Para determinar esta fuerza hizo falta calcular la velocidad del fluido. La componente de esta velocidad en el eje Y fue nula. La componente en el eje X se definió con la ([ec.10](#)). Para poder realizar los cálculos de esta fuerza, se descompusieron las velocidades en sus ejes correspondiente aportando las ecuaciones ([ec.11](#)) y ([ec. 12](#)).

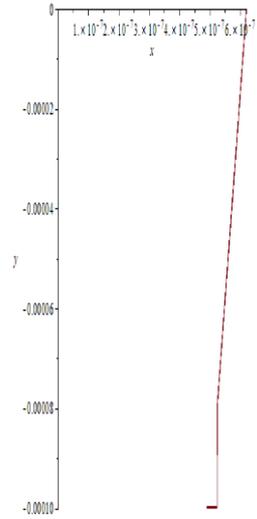
6.1.3 Cálculo de la trayectoria de la NPM.

Para determinar la trayectoria de la NPM se introdujeron las ecuaciones precedentes en las ecuaciones del movimiento ([ec. 13](#)) ([ec. 14](#)). Estas ecuaciones, junto a la ([ec. 15](#)) constituían un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs. Para poder calcular estas EDOs se definieron los valores iniciales del movimiento. Estos valores iniciales fueron $x(0)=0$, $y(0)=-100 \cdot 10^{-6}$ m, $v_x(0)= 10^{-4}$ m/s y $v_y(0)=0$. El programa Maple generó el resultado de estas EDOs obteniéndose la [gráfica 3](#) de la trayectoria de la NPM. Los resultados cuando la NPM alcanza la pared del microcanal son los siguientes:

$$t = 6.20 \cdot 10^{-3} \text{ s}, v_x(t) = 2.00 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}, v_y(t) = 2.22 \cdot 10^5 \text{ m/s}, x(t) = 6.20 \cdot 10^{-7} \text{ m}, y(t) = 6.98 \cdot 10^{-8} \text{ m}.$$



A



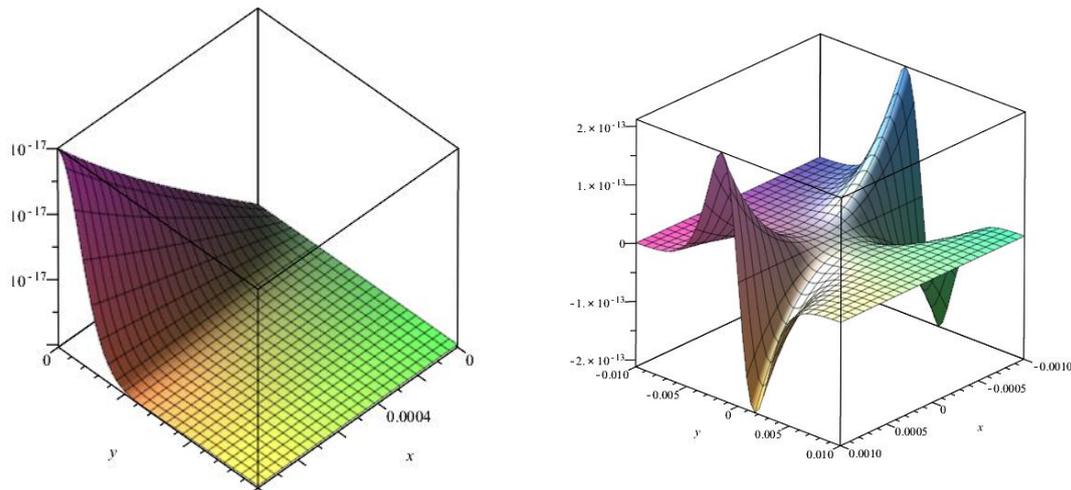
B

[Ir a discusión](#)

Gráfica 3. Representación de la trayectoria de la NPM en el microcanal. A) Trayectoria 3D donde se aprecia la evolución de la posición de la NPM en el tiempo. B) Representación esquemática de la trayectoria de la NPM en los ejes X e Y.

6.2 Migración de la NPM al MMOR.

El segundo paso, para poder determinar la trayectoria de la [NPM](#), fue calcular analíticamente las fuerzas que actuaban sobre ella en el MMOR ([figura 8](#)). En el MMOR, las ecuaciones para la fuerza magnética permanecieron invariantes. Sin embargo, debido a la diferente disposición espacial de la NPM con respecto a la sección anterior, las componentes de la fuerza magnética tomaron diferentes valores como pudo apreciarse en la [gráfica 4](#).



Gráfica 4. Fuerza magnética en los ejes X e Y sobre la NPM en el MMOR. A) Detalle de la zona de aplicación sobre la NPM en el eje X. B) Detalle de la zona de aplicación sobre la NPM en el eje Y.

Las ecuaciones para la fuerza fluidica difirieron de las del apartado anterior. Esta fuerza aparecía al circular la NPM por [gel de agarosa](#) con propiedades como la permeabilidad k , porosidad %, la viscosidad η , la susceptibilidad magnética χ_f y la permeabilidad magnética μ_f . Al variar estas ecuaciones, se realizó un nuevo cálculo, tomando como valores iniciales del

movimiento de la NPM los valores finales obtenidos de su movimiento en el microcanal.

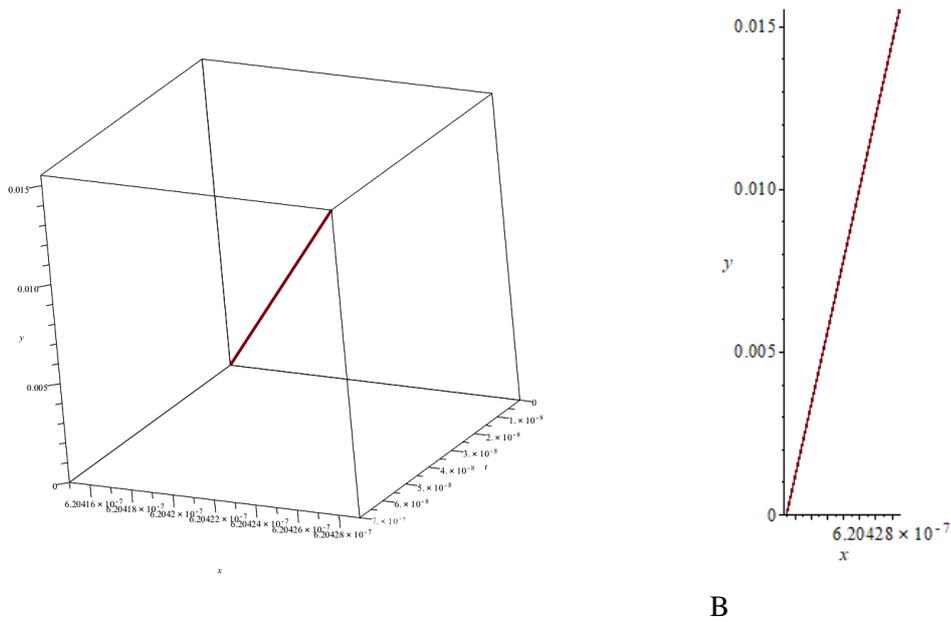
6.2.1 Cálculo de la fuerza fluídica.

La fuerza fluídica se calculó utilizando la aproximación de Stokes ([ec. 16](#)). La velocidad del fluido se determinó utilizando la ecuación de Darcy ([ec. 17](#)). Esta ecuación aportó que la velocidad del fluido en el MMOR tomara el valor de 0. Al ser la velocidad del fluido 0 la expresión de la fuerza fluídica quedó definida por las ecuaciones ([ec. 19](#)) y ([ec. 20](#)).

6.2.2 Cálculo de la trayectoria de la NPM.

La trayectoria de la NPM se calculó utilizando las ecuaciones ([ec. 21](#)), ([ec. 22](#)) y ([ec. 23](#)). Estas ecuaciones, formaban un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs. Para poder resolver estas EDOs se definieron los valores iniciales del movimiento. Estos valores iniciales fueron $x(0)=6.20 \cdot 10^{-7}$ m, $y(0)=0$, $v_x(0)= 2 \cdot 10^{-4}$ m/s y $v_y(0)=2.22 \cdot 10^5$ m/s. El programa Maple genero el resultado de estas EDOs obteniéndose la [gráfica 5](#) de la trayectoria de la NPM. Los resultados cuando la NPM alcanza la zona superior del MMOR son los siguientes:

$$t = 6.75 \cdot 10^{-8} \text{ s, } v_x(t)=2.97 \cdot 10^{-2} \text{ m/s, } v_y(t)=3.30 \cdot 10^7 \text{ m/s, } x(t)= 6.20 \cdot 10^{-7} \text{ m, } y(t)=1.50 \cdot 10^{-2} \text{ m.}$$



Gráfica 5. Representación de la trayectoria de la NPM en el MMOR. A) Trayectoria 3D donde se aprecia la evolución de la posición de la NPM en el tiempo. B) Representación esquemática de la trayectoria de la NPM en los ejes X e Y.

6.3 Simulación de las trayectorias de las NPMs.

Para poder obtener las trayectorias de las NPMs de manera simulada se utilizó el programa COMSOL Multiphysics®. Este programa simulaba el movimiento de NPMs por un fluido en un microcanal y la posterior salida de estas NPMs al MMOR influenciadas por un campo magnético externo. Para ello, se definió un [modelo](#) que englobaba las dimensiones, las físicas y los estudios a realizar. Se definieron las [geometrías](#), los [materiales](#), los [parámetros globales](#), [las físicas \(interfaces\)](#) y [los estudios](#).

La densidad del campo magnético resultante debido al imán permanente se mostró en la [figura 18](#). Se apreció como la densidad de campo es alta en el contorno del imán e iba decayendo al

aumentar la distancia al mismo. Esta densidad dependió del tamaño y disposición del imán. En este trabajo se maximizó la disposición para poder disminuir el tamaño del imán.

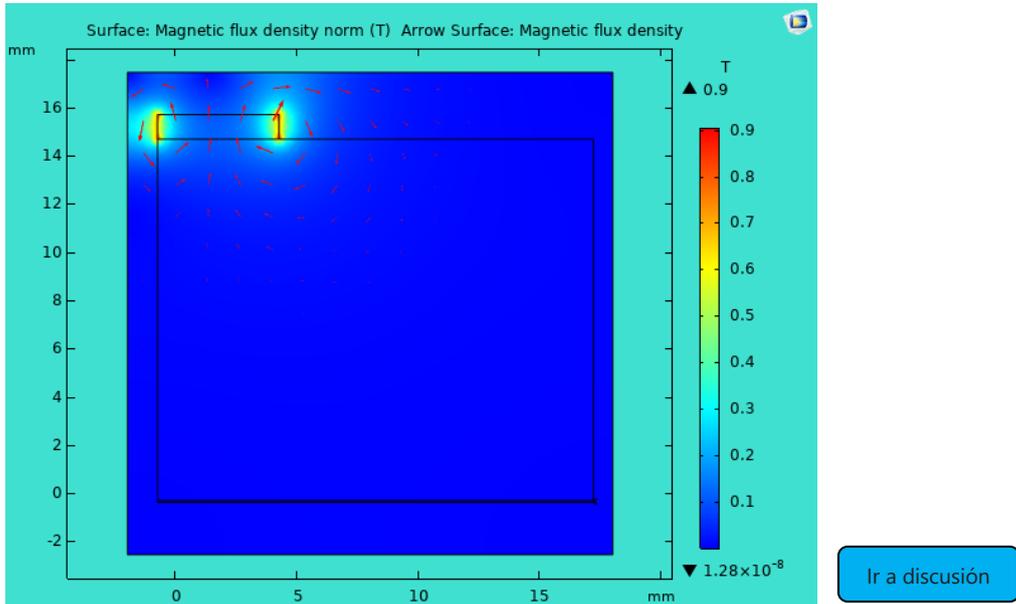


Figura 18. Densidad de flujo magnético generada por el imán permanente sobre las NPMs en el microcanal y el MMOR. Los valores sobre/bajo la columna de medida de la densidad reflejan sus valores máximo y mínimo. Imagen obtenida con el programa COMSOL Multiphysics®

La determinación de las trayectorias de las NPMs quedó definida en la siguiente simulación. Se observó como al comenzar esta la velocidad de las NPMs era relativamente baja comenzando a aumentar conforme se acercaban al imán, como era de esperar. Este hecho se debió tanto a la cercanía de las NPMs al imán como al aumento en el gradiente de campo magnético debido al aumento en la velocidad de las NPMs. Esta simulación se representó en la [figura 19](#).

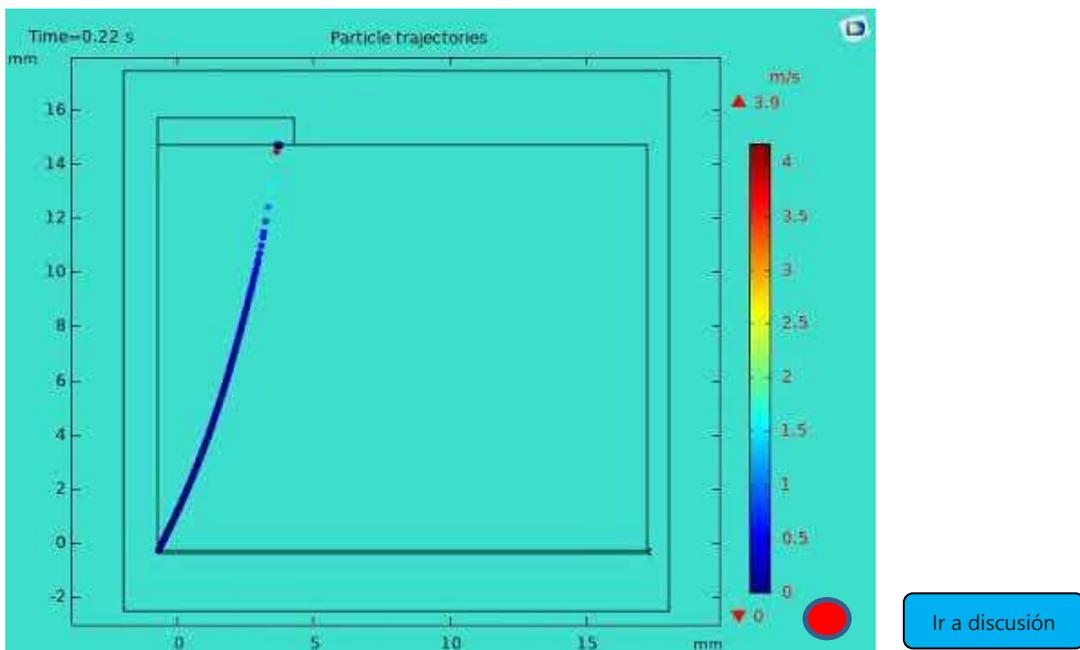


Figura 19. Simulación de la trayectoria de las NPMs en el microcanal y el MMOR.

6.4 Fabricación de una plataforma microfluídica, lab on a chip.

Para poder reproducir experimentalmente las trayectorias de las NPMs en el interior del microcanal y del MMOR influenciadas por un campo magnético externo se realizó el diseño, construcción, evaluación y puesta en funcionamiento de un *lab on a chip*.

6.4.1 Diseño.

En el diseño se analizaron las propiedades, parámetros y características de las NPMs, del imán permanente, del microcanal, del depósito que contenía al MMOR, del fluido que circulaba por el microcanal y el material que constituiría el MMOR.

Se optó por las NPMs definidas en la [sección 4.1.1](#). Esta elección se debió a que [el tiempo de saturación](#) fuera lo más pequeño posible y que fueran lo [más pequeñas posible](#).

El imán permanente se definió en la [sección 4.1.4](#). La clase de imán y sus dimensiones se obtuvieron de la experiencia previa con este tipo de [experimentos](#).

Las dimensiones del microcanal venían impuestas por el tamaño del senoide a reproducir. Para fabricar el microcanal se utilizó PMMA. La descripción de este microconducto se describió en la [sección 4.1.5](#).

El depósito que albergaba al MMOR se fabricó del mismo material que el microcanal. Las dimensiones estaba condicionadas por el tamaño de la médula ósea roja infantil. Su descripción se encuentra definida en la [sección 4.1.5](#).

El fluido que fluía por el microcanal fue [suero fisiológico](#) por sus propiedades análogas al plasma sanguíneo. Las características de este fluido se definieron en la [sección 4.1.2](#).

Para el MMOR se utilizó gel de agarosa por tener características análogas a la [matriz extracelular](#). Las propiedades de este gel se definieron en la [sección 4.1.3](#).

6.4.2 Construcción.

La fabricación del lab on a chip se realizó en diferentes etapas.

En la primera, la [construcción del microcanal](#) se realizó con el proceso indicado en la sección 4.6.2.

Para la [inyección](#) del suero fisiológico con las NPMs se utilizó un jeringuilla sobre un conector como quedo especificado en la sección 4.6.2.

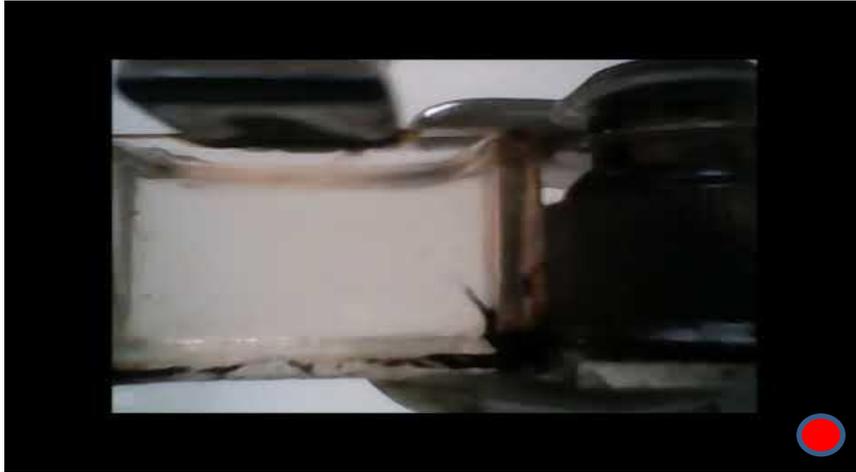
Se utilizó un [depósito](#) para poder introducir el gel de agarosa en su interior. Las características de este depósito se describieron en la misma sección citada anteriormente.

6.4.3 Evaluación.

Para el correcto funcionamiento del *lab on a chip* se realizó la evaluación del mismo. Se encontraron diferentes fugas en la base de los conectores de entrada. Se corrigieron utilizando soldadura fría.

6.4.4 Puesta en funcionamiento.

La puesta en funcionamiento del *lab on a chip* tenía como función la obtención de datos para su posterior discusión. El resultado final pudo apreciarse en el siguiente registro.



[Ir a discusión](#)

Imagen 1. Instantánea de las trayectorias de las NPMs en el la bon a chip.

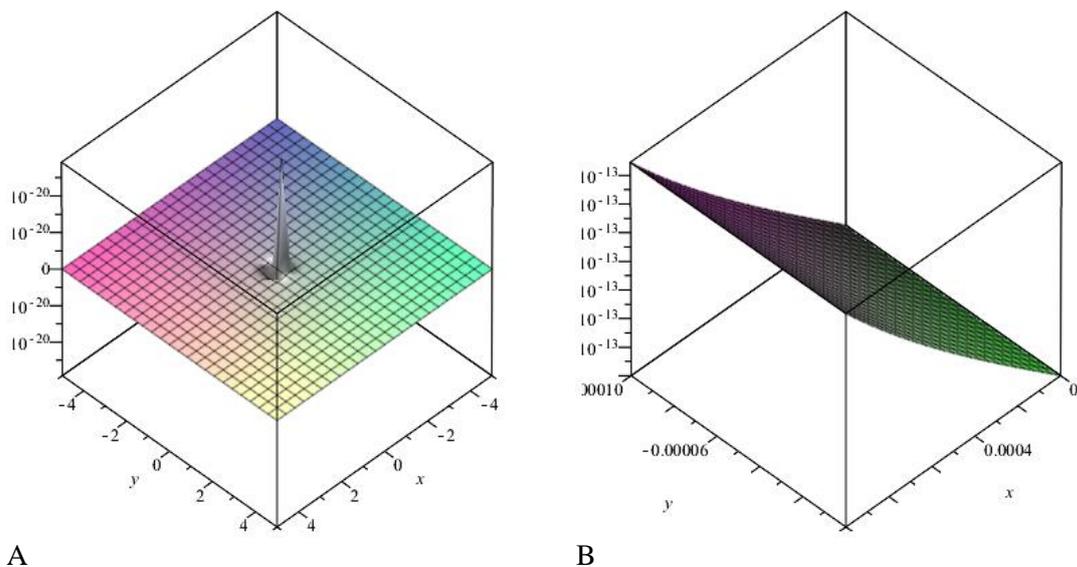
6.5 [Estudio de la trayectoria del complejo CNK-NPM en el microcanal.](#)

Para poder determinar la trayectoria del complejo CNK-NPM fue necesario definir la inclusión de las NPMs en el interior de [células NK](#). Para ello, se analizaron diferentes [métodos](#) para poder introducir las NPMs dentro de esta célula. Seguidamente se determinó el [momento dipolar efectivo y el número máximo de NPMs](#) que podían introducirse en la célula.

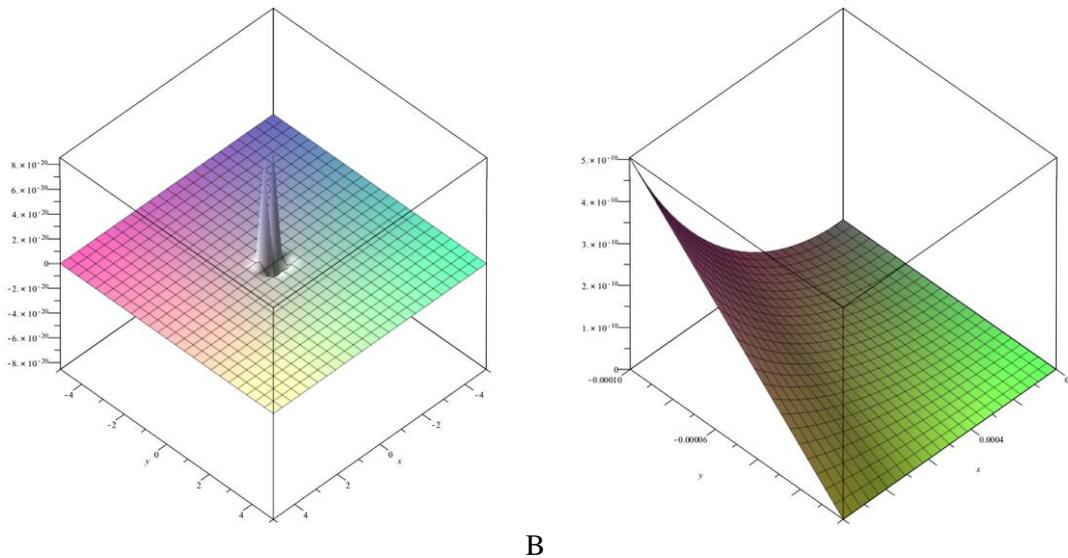
Las fuerzas que aparecieron en el complejo CNK-NPM fueron análogas a las aplicadas a la NPM en la sección 4.2.1. Además, por el tamaño de la célula NK, se aplicaron las fuerzas gravitacional y de flotabilidad. Se utilizó el mismo imán permanente que en la sección 4.2.1. La fuerza fluidica apareció al circular el complejo CNK-NPM por la [sangre](#) con propiedades como la viscosidad η , densidad ρ_f , la susceptibilidad magnética χ_f y la permeabilidad magnética μ_f .

6.5.1 [Cálculo de la fuerza magnética.](#)

La fuerza magnética se calculó utilizando la [\(ec. 28\)](#) para el momento dipolar efectivo del complejo CNK-NPM $\mathbf{m}_{c,eff}$. Esta fuerza se descompuso en los ejes X [\(ec. 30\)](#) e Y [\(ec.31\)](#) para poder realizar los cálculos. . En las [gráficas 6 y 7](#), pudo apreciarse el valor de las fuerzas magnéticas en el eje X e Y, respectivamente.



Gráfica 6. Fuerza magnética en el eje X sobre el complejo CNK-NPM en el microcanal. A) Representación general de la fuerza. B) Detalle de la zona de aplicación sobre el complejo CNK-NPM.



Gráfica 7. Fuerza magnética en el eje Y sobre el complejo CNK-NPM en el microcanal. A) Representación general de la fuerza. B) Detalle de la zona de aplicación sobre el complejo CNK-NPM.

6.5.2 Cálculo de la fuerza fluidica.

La fuerza fluidica se determinó utilizando la aproximación de Stokes ([ec. 32](#)). Las condiciones que se debían cumplir para la aplicación de esta aproximación se describieron en la sección 4.2.4. El flujo de sangre se tomó como Newtoniano atendiendo al efecto [Fahraeus-Linquist](#). Para calcular esta fuerza hizo falta determinar la velocidad del fluido. La componente de esta velocidad en el eje Y fue nula. La componente en el eje X se definió con la ([ec. 35](#)). Para poder realizar los cálculos de esta fuerza, se descompusieron las velocidades en sus ejes correspondientes aportando las ecuaciones ([ec. 36](#)) y ([ec. 37](#)).

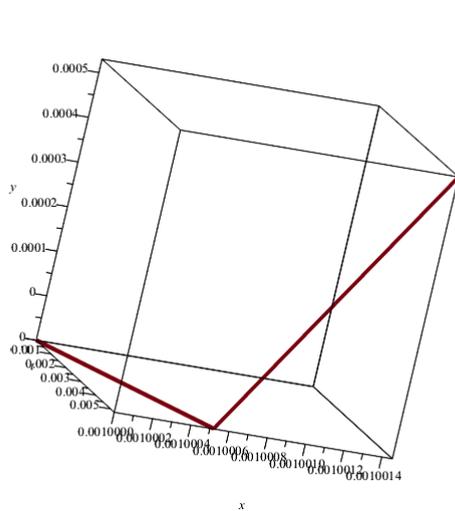
6.5.3 Fuerza gravitatoria y de flotabilidad (buoyancy).

Estas fuerzas se aplicaron al tener el complejo CNK-NPM un diámetro cercano a los 10 μm . En este trabajo se tomaron las fuerzas gravitatoria y de flotabilidad trabajando conjuntamente. La expresión que se utilizó para la definición conjunta de estas fuerzas se expresó en la ([ec. 38](#)).

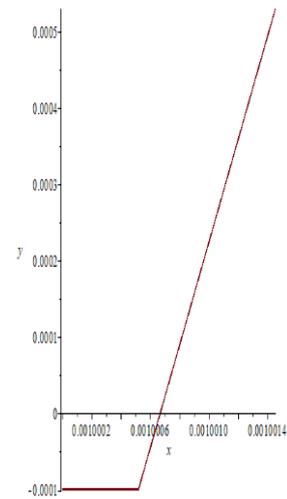
6.5.4 Cálculo de la trayectoria del complejo CNK-NPM.

La trayectoria del complejo CNK-NPM se calculó introduciendo las ecuaciones anteriores en las ecuaciones del movimiento ([ec. 40](#)) ([ec. 41](#)). Estas ecuaciones, conjuntamente con la ([ec. 42](#)) constituían un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs. Para poder calcular estas EDOs se definieron los valores iniciales del movimiento. Estos valores iniciales fueron $x(0)=0$, $y(0)=-100 \cdot 10^{-6} \text{ m}$, $v_x(0)=10^{-4} \text{ m/s}$ y $v_y(0)=0$. El programa Maple generó el resultado de estas EDOs obteniéndose la [gráfica 8](#) de la trayectoria del complejo CNK-NPM. Los resultados cuando el complejo CNK-NPM alcanzó la pared del microcanal son los siguientes:

$$t=5.00 \cdot 10^{-3} \text{ s}, v_x(t)=3.82 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}, v_y(t)=2.52 \cdot 10^0 \text{ m/s}, x(t)=1.00 \cdot 10^{-3} \text{ m}, y(t)=-1.00 \cdot 10^{-4} \text{ m}.$$



A



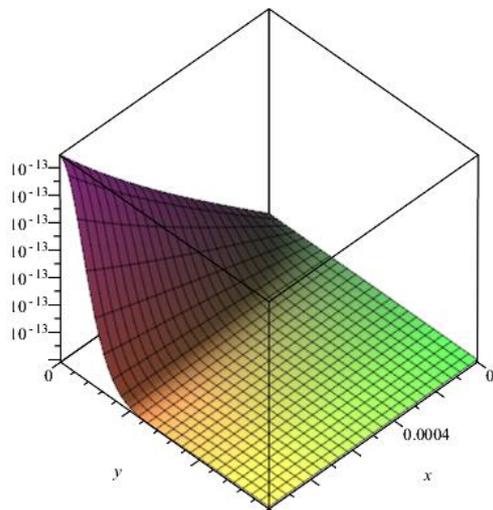
B

[Ir a discusión](#)

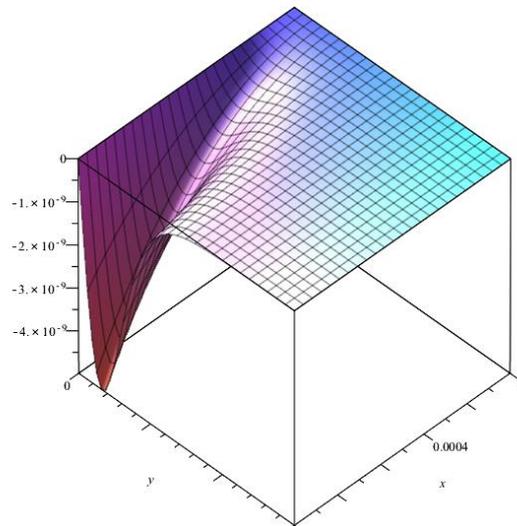
Gráfica 8. Representación de la trayectoria del complejo CNK-NPM en el microcanal. A) Trayectoria 3D donde se aprecia la evolución de la posición del complejo CNK-NPM en el tiempo. B) Representación esquemática de la trayectoria del complejo CNK-NPM en los ejes x e y.

6.6 Migración del complejo CNK-NPM al MMOR.

En el cálculo de la trayectoria del complejo CNK-NPM en el MMOR se utilizaron diferentes fuerzas. Las fuerzas magnética, gravitacional y de flotabilidad fueron análogas a las aplicadas en el microcanal. Sin embargo, debido a la diferente disposición en el espacio del complejo CNK-NPM con respecto a la sección anterior, las componentes de la fuerza magnética tomaron diferentes valores como puede apreciarse en la [gráfica 9](#).



A



B

Gráfica 9. Fuerza magnética en los ejes X e Y sobre el complejo CNK-NPM en el MMOR. A) Detalle de la zona de aplicación sobre el complejo CNK-NPM en el eje X B) Detalle de la zona de aplicación sobre el complejo CNK-NPM en el eje Y.

En cambio, en la fuerza fluidica aparecieron variaciones con respecto a la aparecida en el microcanal. Esta fuerza aparecía al circular el complejo CNK-NPM por el [MMOR](#) con propiedades como la permeabilidad k , porosidad %, la viscosidad η , la susceptibilidad magnética χ_f y la permeabilidad magnética μ_f . Debido a la migración del complejo CNK-NPM, al traspasar este el endotelio capilar, comenzó de nuevo su movimiento, a través del MMOR, siendo su

velocidad inicial nula y la posición inicial, la final producida en el microcanal.

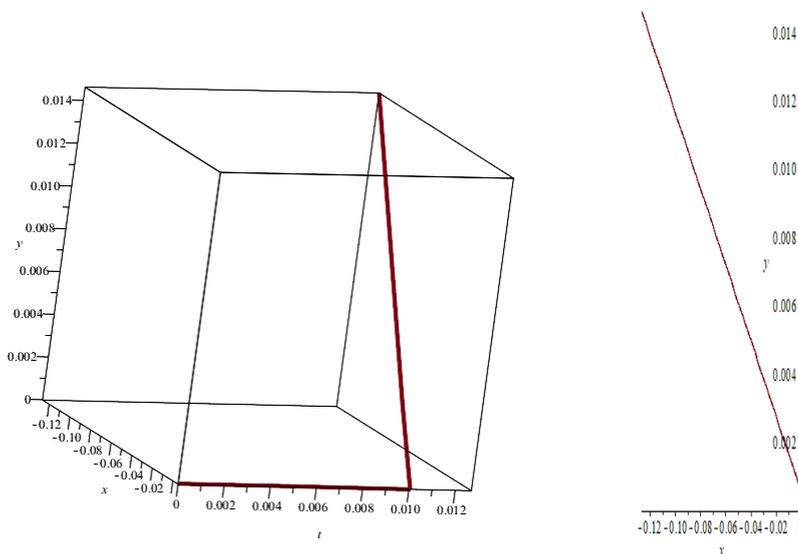
6.6.1 Cálculo de la fuerza fluidica.

La fuerza fluidica se determinó usando la aproximación de Stokes (ec. 43). La velocidad del fluido se calculó utilizando la ecuación de Darcy (ec. 44). Esta ecuación aportó que la velocidad del fluido en el MMOR tomara el valor de 0. Al ser esta velocidad 0 la expresión de la fuerza fluidica quedó definida por las ecuaciones (ec. 45) y (ec. 46).

6.6.2 Cálculo de la trayectoria del complejo CNK-NPM.

La trayectoria del complejo CNK-NPM se calculó utilizando las ecuaciones (ec. 47), (ec. 48) y (ec. 23). Estas ecuaciones, formaban un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden, EDOs. Para poder resolver estas EDOs se definieron los valores iniciales del movimiento. Estos valores iniciales fueron $x(0)=1.00 \cdot 10^{-3}$ m, $y(0)=0$, $v_x(0)=0$ y $v_y(0)=0$, debido a que el complejo CNK-NPM comienza de nuevo el movimiento en el MMOR. El programa Maple generó el resultado de estas EDOs obteniéndose la [gráfica 10](#) de la trayectoria del complejo CNK-NPM. Los resultados cuando el complejo CNK-NPM alcanza la zona superior del MMOR son los siguientes:

$$t=1.00 \cdot 10^{-2} \text{ s}, v_x(t)=4.66 \cdot 10^4 \text{ m/s}, v_y(t)=2.81 \cdot 10^3 \text{ m/s}, x(t)=-0.13 \text{ m}, y(t)=1.50 \cdot 10^{-2} \text{ m}.$$



A

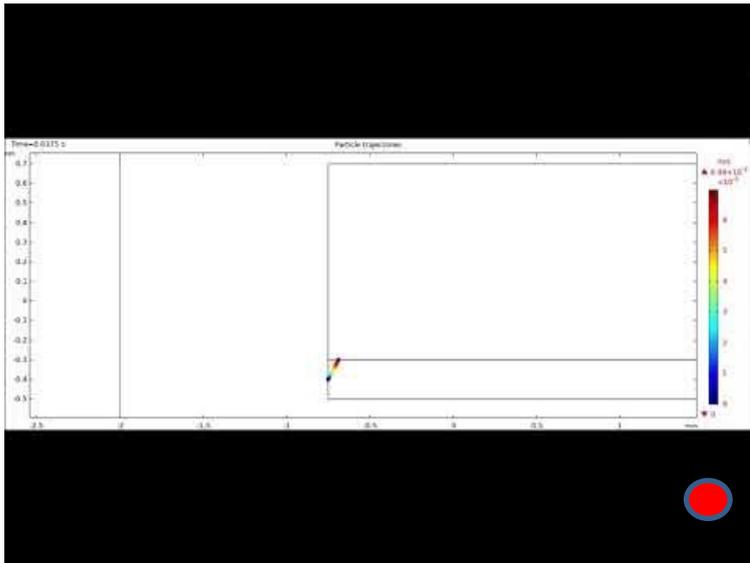
B

Gráfica 10. Representación de la trayectoria del complejo CNK-NPM en el MMOR. A) Trayectoria 3D donde se aprecia la evolución de la posición del complejo CNK-NPM en el tiempo. B) Representación esquemática de la trayectoria del complejo CNK-NPM en los ejes X e Y.

6.7 Simulación de las trayectorias de los complejos CNK-NPMs.

En la obtención de las trayectorias de los complejos CNK-NPMs de manera simulada se utilizó el programa COMSOL Multiphysics® de manera análoga a la sección 4.5. La simulación se realizó de forma independiente en el microcanal y en el MMOR. Los conceptos físicos y las geometrías se mantuvieron invariables con respecto a la simulación del primer bloque. En cambio, los tejidos que se utilizaron para realizar esta simulación fueron la [sangre](#) en el microcanal y el tejido conectivo formado por suero sanguíneo, células del microambiente y matriz extracelular en el [MMOR](#).

La densidad de campo magnético generada debido al imán permanente mostró las mismas características que en la sección 7.3. En esta simulación también se maximizó la disposición del imán para poder disminuir su tamaño. La simulación de las trayectorias de los complejos CNK-NPMs en el microcanal se realizó en la [figura 20](#) y en el MMOR en la [figura 21](#).



[Ir a discusión](#)

Figura 20. Simulación de las trayectorias de los complejos CNK-NPMs en el microcanal.

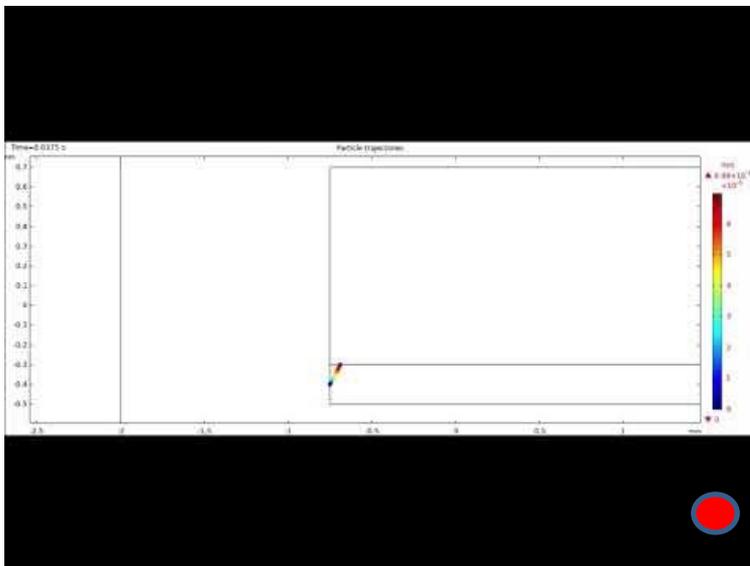


Figura 21. Simulación de las trayectorias de los complejos CNK-NPMs en el MMOR.

7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

En este trabajo se ha realizado el diseño, fabricación, evaluación de un [lab on chip](#) capaz de simular, lo más real posible, las condiciones fisiológicas y anatómicas de la médula ósea roja pediátrica para así combatir las leucemias linfoblásticas y mieloblásticas. Para su diseño se ha tenido en cuenta solo los aspectos anatómicos de la médula ósea roja pediátrica pues este diseño es independiente de los cálculos analíticos y de la simulación en la que entran los conceptos físicos derivados de las condiciones fisiológicas.

Estas leucemias pueden ser tratadas con los complejos CNK-NPMs. Para que estos complejos lleguen a las células cancerosas eficientemente y en un tiempo reducido, es imprescindible conducirlos con un imán externo.

Este imán produce sobre estos complejos una fuerza magnética. Al comenzar a circular estos por un fluido en los que se encuentran inmersos se crea sobre ellos una fuerza fluídica y además, por su densidad, una fuerza gravitacional y de flotabilidad. Al ser la fuerza magnética superior a las demás, se genera un movimiento en este complejo hacia el imán. Debido a esto, el complejo realiza una trayectoria hacia el este.

Por ello, la estructura y funcionamiento de este lab on a chip es una buena aproximación a la anatomía y fisiología de la médula ósea roja pediátrica y puede ser utilizado para el complejo CNK-NPM u otras células en la investigación de esta enfermedad.

Para poder reproducir lo anterior, se han utilizado NPMs que circulan por un [microcanal y posteriormente migran al MMOR](#) influenciadas por un campo magnético generado por un imán. Estas NPMs circulan por suero fisiológico en el microcanal y por gel de agarosa en el MMOR.

Para poder optimizar las trayectorias de las NPMs se han realizado diferentes cálculos y simulaciones variando un parámetro y manteniendo invariables los restantes. Esto se ha realizado para cada uno de los parámetros que se podían modificar. Estos parámetros son las dimensiones y disposición del imán y el tamaño de las NPMs. Los parámetros que quedan invariantes son las dimensiones del microcanal y del MMOR, el suero fisiológico, el gel de agarosa y la velocidad del flujo.

En los resultados aportados por [los campos](#) y [fuerzas magnéticas](#) se observa que la disposición del imán es crucial para que las NPMs lleguen a su objetivo. Este imán produce fuerzas de atracción o repulsión en las NPMs, como puede apreciarse en la [gráfica 1 B](#), según como se sitúe con respecto a ellas. Esto se debe a que el campo magnético del imán toma valores positivos o negativos según la posición en la que se determine su valor. Este hecho produce que las NPMs puedan ir hacia el imán o se alejen de él. En este trabajo se ha optimizado la posición del imán analizando las fuerzas magnéticas en los ejes “X” e “Y”, situando el imán de tal forma que las fuerzas magnéticas sobre las NPMs sean siempre de atracción en los dos ejes.

Un aspecto a considerar respecto a la fuerza magnética sobre el complejo CNK-NPM es que la célula NK es diamagnética. Su permeabilidad magnética relativa es inferior a la unidad. Este hecho produce que estas células repelan el campo magnético y se genere una fuerza sobre ellas en dirección opuesta al imán. Esto significa que se alejan de un imán cuando el campo magnético de este las influencia. Para contrarrestar este efecto, se introducen NPMs en las células hasta conseguir transformar estas células en paramagnéticas y poder cambiar su trayectoria y que estas se acerquen hacia el imán.

Respecto a la una mecánica de fluidos, se ha elegido la ecuación de Darcy para poder abordar, con un número limitado de parámetros, el análisis del fluido en el MMOR y entender su dinámica. Esta ecuación es una buena aproximación para abordar la dinámica de fluidos en medios porosos.

En trabajos futuros se utilizarán las ecuaciones de Brinkman para poder valorar si las variaciones entre los resultados analíticos y experimentales son apreciables.

Con respecto a las trayectorias, tanto en los cálculos analíticos como en los simulados y experimentales estas trayectorias son similares aunque no iguales.

Estas variaciones en un orden de magnitud entre los cálculos analíticos que reflejan un tiempo en milisegundos cuando la NPM alcanza la zona superior del microcanal y los simulados y los generados por la experimentación que reflejan un tiempo de centésimas de segundo es debido a diferentes aspectos. Los posibles motivos de estas variaciones pueden atribuirse a diferentes aspectos:

En la experimentación, [el movimiento de las NPMs](#) es real con parámetros como la velocidad inicial del fluido y de las NPMs, la fricción en el microcanal y en el MMOR entre otros. Aparecen bastantes más variables que no se han tenido en cuenta en los [cálculos analíticos](#) y en [la simulación](#). En estos cálculos los datos introducidos son ideales. Estos cálculos solo están afectados por estos datos.

Además, el programa de simulación y el de vídeo no muestran milésimas de segundo.

Otro problema puede ser que he utilizado ecuaciones que simplifican el cálculo o que haya algún error en la [fabricación del lab on a chip](#). En futuros trabajos se buscará un simulador y un programa de vídeo más precisos para ver si el error está ahí. Además, se utilizarán ecuaciones que se adjunten más específicamente a la dinámica del fluido y si persiste el error puede provenir del proceso de fabricación del *lab on a chip*.

Una vez detectadas las variaciones anteriores se aplicarán al cálculo analítico y a la simulación de los complejos CNK-NPMs. Con ello, se podrán analizar con fiabilidad el movimiento de estos complejos para determinar sus trayectorias.

En este trabajo, los datos obtenidos en el cálculo [analítico](#) y [simulado](#) en el segundo bloque son análogos a los del primer bloque con un orden de magnitud superior por lo que están en línea con lo que esperaba que se produjera. Una vez corregidas las variaciones anteriores habrá que realizar una experimentación con células NK cargadas en el lab on a chip en un trabajo futuro.

8. CONCLUSIONES DEL TRABAJO

En la investigación de la terapia de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica in vitro con células NK cargadas con nanopartículas magnéticas no existen *lab on a chip* personalizados para este fin. El *lab on a chip* obtenido en este trabajo podría servir como una herramienta eficaz para el tratamiento y diagnóstico de estas enfermedades.

Los cálculos analíticos y simulados en el segundo bloque aportan las trayectorias simuladas de los complejos CNK-NPMs. Estas simulaciones tienen como función el poder contrastarlas con las trayectorias que se obtengan en los complejos CNK-NPMs, en el *lab on a chip* obtenido en este trabajo, en futuras investigaciones.

Un aspecto a tener en cuenta es el tamaño, calidad y disposición del imán para que el movimiento de las NPMs tenga éxito y al diámetro de las NPMs para llegar a un equilibrio entre el tiempo que discurre para que las NPMs alcancen la zona superior del MMOR y el diámetro de estas para poder superar la barrera del endotelio vascular .

9. TRABAJOS FUTUROS.

El segundo bloque tenía como objetivo el análisis y la obtención de datos, de manera simulada, del movimiento de los complejos CNK-NPM. Este objetivo tenía como finalidad poder realizar futuras experimentaciones, utilizando un *lab on a chip*, que reprodujera las condiciones simuladas. Estas experimentaciones se prepararían para su aprobación por parte del Grupo de Investigación Traslacional en Cáncer Infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Paz (idiPAZ) (Madrid).

10. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] [up](#). Inaba, Hiroto; Greaves, Mel; Mullighan, Charles G. Acute lymphoblastic leukaemia. LANCET Volumen: 381 Número: 9881 Páginas: 1943-1955 Fecha de publicación: JUN 1 2013. [DOI: 10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- [2] [up](#). Kakaje, A., Alhalabi, M.M., Ghareeb, A. et al. Rates and trends of childhood acute lymphoblastic leukaemia: an epidemiology study. Sci Rep 10, 6756 (2020). <https://www.nature.com/articles/s41598-020-63528-0#citeas>
- [3] [up](#). A. Pérez Martínez, A. Alonso Ojembarrena, M. Ramírez Orellana, J. García Castro, M. González-Vicent, T. Contra Gómez, L. Madero López y M.A. Díaz Pérez. Veinte años de experiencia en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. Servicio de Hematología-Oncología y Trasplante Hematopoyético. Hospital Niño Jesús. Madrid. España.
- [4] [up up1](#). Pérez Martínez A. et al.. Receptor antigénico quimérico NKG2D para el tratamiento de pacientes pediátricos con leucemia aguda y leucemia mielomonocítica juvenil: validación a escala clínica y primer estudio de seguridad en pacientes: (GAbY cells: CART-CD45RA-NKG2D+).
- [5] [up](#). Portale, Federica; Cricri, Giulia; Bresolin, Silvia; et al.. ActivinA: a new leukemia-promoting factor conferring migratory advantage to B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemic cells. HAEMATOLOGICA Volumen: 104 Número: 3 Páginas: 533-545 Fecha de publicación: MAR 2019. [DOI: 10.3324/haematol.2018.188664](https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188664)
- [6] [up up1](#). Pui, Ching-Hon; Evans, William E.. A 50 Year journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. SEMINARS IN HEMATOLOGY. Volumen: 50 Número: 3 Páginas: 185-196 Fecha de publicación: JUL 2013.
- [7] [up](#). Dobosz, Paula; Dzieciatkowski, Tomasz. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY Volumen: 10 Número de artículo: 2965 Fecha de publicación: DEC 17 2019. [DOI: 10.3389/fimmu.2019.02965](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02965)
- [8] [up](#). Nita L. Seibel. Acute Lymphoblastic Leukemia: An Historical Perspective. Hematology Am Soc Hematol Educ Program (2008) 2008 (1): 365. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.365>
- [9] [up](#). Rosenberg, Steven A.; Restifo, Nicholas P.; Yang, James C.; et al.. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. NATURE REVIEWS CANCER Volumen: 8 Número: 4 Páginas: 299-308 Fecha de publicación: APR 2008 [DOI: 10.1038/nrc2355](https://doi.org/10.1038/nrc2355)
- [10] [up](#). Peer, Dan; Karp, Jeffrey M.; Hong, SeungPyo; et al.. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. NATURE NANOTECHNOLOGY Volumen: 2 Número: 12 Páginas: 751-760 Fecha de publicación: DEC 2007. [DOI: 10.1038/nnano.2007.387](https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387)
- [11] [up](#). Yan, Sen; Zhao, Peng; Yu, Tingting; et al.. Current applications and future prospects of nanotechnology in cancer immunotherapy. CANCER BIOLOGY & MEDICINE Volumen: 16 Número: 3 Páginas: 486-497 Fecha de publicación: AUG 2019. [DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0493](https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0493)
- [12] [up up1 up2](#). Furlani Edward P, Xiaozheng Xue. A Model for Predicting Field-Directed Particle Transport in the Magnetofection Process February 2012. Pharmaceutical Research 29(5):1366-79. [DOI: 10.1007/s11095-012-0681-0](https://doi.org/10.1007/s11095-012-0681-0)
- [13]. [up](#) Krukemeyer MG, Krenn V, Huebner F, Wagner W, Resch R. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. J Nanomed Nanotechnol 6: 336. (2015) [DOI:10.4172/2157-7439.1000336](https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000336)

- [14]. [up](#) Nguyen T. K. Thanh. Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications. CRC Press. Taylor & Francis Group.
- [15]. [up](#) Mody, Vicky V.; Singh, Ajay; Wesley, Bevins. Basics of magnetic nanoparticles for their application in the field of magnetic fluid hyperthermia. EUROPEAN JOURNAL OF NANOMEDICINE Volumen: 5 Número: 1 Páginas: 11-21 Fecha de publicación: JUN 2013. [DOI: 10.1515/ejnm-2012-0008](#)
- [16]. [up](#) Samer Bayda, Muhammad Adeel, Tiziano Tuccinardi, Marco Cordani, Flavio Rizzolio. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. Molecules. 2020 Jan; 25(1): 112. [DOI:10.3390/molecules25010112](#)
- [17]. [up](#) Leslie LaConte, Nitin, Gang Bao. Magnetic nanoparticle probes. Volume 8, Issue 5, Supplement 1, May 2005, Pages 32-38. [DOI:10.1016/S1369-7021\(05\)00893-X](#)
- [18]. [up](#) Singamaneni, Srikanth; Bliznyuk, Valery N.; Binek, Christian; et al.. Magnetic nanoparticles: recent advances in synthesis, self-assembly and applications. JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY Volumen: 21 Número: 42 Páginas: 16819-16845 Fecha de publicación: 2011 . [doi: 10.1039/c1jm11845e](#)
- [19]. [up](#) Freitas, P. P.; Cardoso, F. A.; Martins, V. C.; et al.. Spintronic platforms for biomedical applications. LAB ON A CHIP Volumen: 12 Número: 3 Páginas: 546-557 Fecha de publicación: 2012 . [doi: 10.1039/c1lc20791a](#)
- [20]. [up](#) Xie, Wensheng; Guo, Zhenhu; Gao, Fei; et al.. Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. THERANOSTICS Volumen: 8 Número: 12 Páginas: 3284-3307 Fecha de publicación: 2018. [doi: 10.7150/thno.25220](#)
- [21]. [up](#) Li, Tianyang; Yang, Chunsheng; Wei, Zhiping; et al.. Recent Advances of Magnetic Nanomaterials in the Field of Oncology ONCOTARGETS AND THERAPY Volumen: 13 Páginas: 4825-4832 Fecha de publicación: 2020 . [doi: 10.2147/OTT.S243256](#)
- [22]. [up](#) Pankhurst, QA; Connolly, J; Jones, SK; et al.. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. JOURNAL OF PHYSICS D-APPLIED PHYSICS Volumen: 36 Número: 13 Páginas: R167-R181 Número de artículo: PII S0022-3727(03)40035-1 Fecha de publicación: JUL 7 2003. [DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/201](#)
- [23] [up](#) [up1](#) [up2](#) Furlani E. P. Analysis of particle transport in a magnetophoretic microsystem. Journal of Applied Physics 99, 024912 (2006) [DOI:10.1063/1.2164531](#)
- [24]. [up](#) Giustini, Andrew J.; Petryk, Alicia A.; Cassim, Shiraz M.; et al..Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment. NANO LIFE Volumen: 1 Número: 1-2 Páginas: 17-32 Fecha de publicación: MAR-JUN 2010. [doi: 10.1142/S1793984410000067](#)
- [25]. [up](#) [up1](#) Plank, Christian; Zelphati, Olivier; Mykhaylyk, Olga. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS Volumen: 63 Número: 14-15 Páginas: 1300-1331 Fecha de publicación: NOV 2011. [doi: 10.1016/j.addr.2011.08.002](#)
- [26]. [up](#) Carvalho, Ana Maria; Cordeiro, Rosemeyre A.; Faneca, Henrique. Silica- Based Gene Delivery Systems: From Design to Therapeutic Applications. PHARMACEUTICS. Volumen: 12 Número: 7 Número de artículo: 649 Fecha de publicación: JUL 2020. [doi: 10.3390/pharmaceutics12070649](#)
- [27]. [up](#) Yan, Sen; Zhao, Peng; Yu, Tingting; et al.. Current applications and future prospects of nanotechnology in cancer immunotherapy. CANCER BIOLOGY & MEDICINE. Volumen: 16 Número: 3 Páginas: 486-497 Fecha de publicación: AUG 2019. [doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0493](#)

- [28]. [up](#) Young Do Jung . Microfabricated continuous flow separation and manipulation systems for human whole blood. Georgia Institute of Technology. May 2010. <http://hdl.handle.net/1853/34003>
- [29] [up](#) [up1](#) [up2](#) [up3](#) [up4](#). Pamme, Nicole; Wilhelm, Claire. Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. LAB ON A CHIP Volumen: 6 Número: 8 Páginas: 974-980 Fecha de publicación: 2006. DOI: [10.1039/b604542a](https://doi.org/10.1039/b604542a)
- [30] [up](#) [up1](#) [up2](#) [up3](#). Furlani E. P. and K. C. Ng. Nanoscale magnetic biotransport with application to magnetofection. Phys. Rev. E 77, 061914 .17 June 2008 DOI: [10.1103/PhysRevE.77.061914](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.77.061914)
- [31] [up](#) [up1](#). Jang, Eue-Soon; Shin, June-Ho; Ren, Gang; et al. The manipulation of natural killer cells to target tumor sites using magnetic nanoparticles. BIOMATERIALS Volumen: 33 Número: 22 Páginas: 5584-5592 Fecha de publicación: AUG 2012. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2012.04.041](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.041)
- [32] [up](#) [up1](#). Zhang, Enming; Kircher, Moritz F.; Koch, Martin; et al.. Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation. ACS NANO. Volumen:8 Número: 4 Páginas: 3192-3201 Fecha de publicación: APR 2014. DOI: [10.1021/nm406302j](https://doi.org/10.1021/nm406302j)
- [33] [up](#) [up1](#). Subramanian, Mahendran; Tyler, Aimee-Jayne; Luther, Eva Maria; et al.. Oscillating Magnet ArrayBased Nanomagnetic Gene Transfection: A Valuable Tool for Molecular Neurobiology Studies.NANOMATERIALS Volumen: 7 Número: 2 Número de artículo : 28 Fecha de publicación: FEB 2017. DOI: [10.3390/nano7020028](https://doi.org/10.3390/nano7020028)
- [34]. [up](#) Yun, Hoyoung; Kim, Kisoo; Lee, Won Gu. Cell manipulation in microfluidics. BIOFABRICATION Volumen: 5 Número: 2 Número de artículo: 022001 Fecha de publicación: JUN 2013. doi: [10.1088/1758-5082/5/2/022001](https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/2/022001)
- [35]. [up](#) Tan, Hsih Yin; Loke, Weng Keong; Nguyen, Nam-Trung. A reliable method for bonding polydimethylsiloxane (PDMS) to polymethylmethacrylate (PMMA)and its application in micropumps. SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL Volumen: 151 Número: 1 Páginas: 133-139 Fecha de publicación: NOV 26 2010. doi: [10.1016/j.snb.2010.09.035](https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.09.035)
- [36]. [up](#) Zhang, Wenhua; Lin, Shuichao; Wang, Chunming; et al.. PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics LAB ON A CHIP Volumen: 9 Número: 21 Páginas: 3088-3094 Fecha de publicación: 2009 . doi: [10.1039/b907254c](https://doi.org/10.1039/b907254c)
- [37]. [up](#) Hejazian, Majid; Li, Weihua; Nam-Trung Nguyen. Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation. LAB ON A CHIP Volumen: 15 Número: 4 Páginas: 959-970 Fecha de publicación: 2015 . doi: [10.1039/c4lc01422g](https://doi.org/10.1039/c4lc01422g)
- [38]. [up](#) Marturano-Kruik, Alessandro; Nava, Michele Maria; Yeager, Keith; et al.. Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA Volumen: 115 Número: 6 Páginas: 1256-1261 Fecha de publicación: FEB 6 2018. doi: [10.1073/pnas.1714282115](https://doi.org/10.1073/pnas.1714282115)
- [39] [up](#) [up1](#). Xue, Xiaozheng; Furlani, Edward P. Template-assisted nano-patterning of magnetic core-shell particles in gradient fields. PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS. 16 - 26, pp. 13306 - 13317. ROYAL SOC CHEMISTRY, 01/01/2014. DOI: [10.1039/c4cp01563k](https://doi.org/10.1039/c4cp01563k)
- [40] [up](#) [up1](#). Paul Ducheyne, Kevin Healy Dietmar W. Hutmacher David W. Grainger C. James Comprehensive Biomaterials.. Elsevier 2011. [Página web](#).
- [41] [up](#). David R. Lide. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 86th Edition. Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 16, 5585 . DOI: [10.1021/ja059868l](https://doi.org/10.1021/ja059868l)
- [42] [up](#) [up1](#). K Mukundakrishnan, P S Ayyaswamy, Fluid Mechanics: Transport and Diffusion Analyses as Applied in Biomaterials Studies .Comprehensive biomaterials bookElsevier 2011 páginas 133,153

- [43] [up](#) [up1](#) [up2](#). Peter A. Galie, Robert L. Spilker, and Jan P. Stegemann. A Linear, Biphasic Model Incorporating a Brinkman Term to Describe the Mechanics of Cell-Seeded Collagen Hydrogels. *Ann Biomed Eng.* 2011 November ; 39(11): 2767–2779. DOI:[10.1007/s10439-011-0371-9](https://doi.org/10.1007/s10439-011-0371-9).
- [44] [up](#). Schlesinger,AE; Poznanski,AK; Pudlowski,RM;et al. Distal femoral epiphysis-normal normal standards for thickness and application to bone dysplasias. *RADIOLOGY*. Volumen: 159 Número: 2 Páginas: 515-519 Fecha de publicación: MAY 1986. DOI: [10.1148/radiology.159.2.3961186](https://doi.org/10.1148/radiology.159.2.3961186)
- [45] [up](#) [up1](#) [up2](#) [up3](#) [up4](#). Hejazian, Majid; Li, Weihua; Nam-Trung Nguyen. Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation. *LAB ON A CHIP*. Volumen: 15. Número: 4 Páginas: 959-970 Fecha de publicación: 2015. DOI: [10.1039/c4lc01422g](https://doi.org/10.1039/c4lc01422g)
- [46] [up](#) [up2](#). M. Takayasu, R. Gerber, andF . J. Friedlaender. Magnetic separation of ubmicron particles. *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS*, vol. mag-19, no. 5, september 1983. DOI: [10.1109/TMAG.1983.1062681](https://doi.org/10.1109/TMAG.1983.1062681)
- [47] [up](#) [up1](#) [up2](#) [up3](#) [up5](#) [up6](#). Furlani E. P. and K. C. Ng. Analytical model of magnetic nanoparticle transport and capture in the microvasculature. *Phys. Rev. E* 73, 061919 – Published 27 June 2006. DOI: [10.1103/PhysRevE.73.061919](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.73.061919)
- [48] [up](#). Dobson, J; Rinaldi, C. Nanomagnetic Actuation in Biomedicine: Basic Principles and Applications. Páginas: 1-255 Fecha de publicación: 2018Editorial: CRC PRESS-TAYLOR & FRANCIS GROUP, 6000 broken sound parkway nw, ste 300, boca raton, fl 33487-2742 USA DOI: [10.1201/9781315356525](https://doi.org/10.1201/9781315356525)
- [49] [up](#) [up1](#) [up2](#). Julius Adams Stratton. *ELECTROMAGNETIC THEORY*. IEEE PRESS. 2007
- [50] [up](#) [up1](#). Jones, T. P. *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK,1995.www.cambridge.org/9780521431965
- [51] [up](#). Takayasu, M., Gerber, R., and Friedlaender F. J. Magnetic separation of submicron particles. *IEEE transactions on magnetics*, vol. mag-19, no. 5, september 1983. DOI: [10.1109/TMAG.1983.1062681](https://doi.org/10.1109/TMAG.1983.1062681)
- [52] [up](#). Kopp, HG; Avecilla, ST; Hooper, AT; et al. The bone marrow vascular niche: Home of HSC differentiation and mobilization. *PHYSIOLOGY* Volumen: 20 Páginas: 349-356 Fecha de publicación: OCT 2005. DOI: [10.1152/physiol.00025.2005](https://doi.org/10.1152/physiol.00025.2005)
- [53] [up](#) [up1](#). Vidal-Meza Melissa P., Zhou Ran, Barua Sutapa , Wang Cheng, and Park Joontaek Simulation of Interstitial Nanoparticle Flow for Development of Tumor- on-a-Chip Device.2016 COMSOL Conference in Boston. [Página web](#)
- [54] [up](#) [up1](#). Furlani, E.P. Analysis of particle transport in a magnetophoretic microsystem. *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS* Volumen: 99 Número: 2 Número de artículo: 024912 Enero 15 2006. DOI:[10.1063/1.2164531](https://doi.org/10.1063/1.2164531)
- [55] [up](#) [up1](#) [up2](#) [up3](#) [up4](#) [up5](#) [up6](#) [up7](#). Rubenstein, David A., Yin, Wei and Frame, Mary D. *Biofluid mechanics. An introduction to fluid mechanics, macrocirculation, and microcirculation*. Second edition. 2015Elsevier.
- [56] [up](#) [up1](#). Robert A. Freitas Jr. *NANOMEDICINE*, volume iia: iocompatibility landes bioscience. Austin, Texas, U.S.A. 2003
- [57] [up](#) [up1](#) [up2](#) [up3](#) [up4](#). Tortora Gerard J., Errickson Bryan. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11ª EDICIÓN. Editorial médica panamericana
- [58] [up](#) [up1](#). Murray Moo-Young, Michael Butler, Colin Webb, Antonio Moreira, Bernard Grodzinski, Z F Cui, Spiros Agathos. *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition. Pergamon.2011
- [59] [up](#) .Krause, Daniela S.; Scadden, David T. A hostel for the hostile: the bone marrow

niche in hematologic neoplasms. HAEMATOLOGICA Volumen: 100 Número: 11 Páginas: 1376-1387 Fecha de publicación: NOV 2015. [DOI: 10.3324/haematol.2014.113852](https://doi.org/10.3324/haematol.2014.113852)

[60] [up](#). Megías, Manuel; Molis, Pilar; Pombal, Manuel A. Atlas de Histología Animal y Vegetal. Departamento de Biología funcional y ciencias de la salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. versión: julio 2017

[61] [up](#) [up1](#). Khaled, ARA; Vafai, K. The role of porous media in modeling flow and heat transfer in biological tissues. International journal of heat and mass transfer Volumen : 46 Número: 26 Páginas: 4989-5003. DEC 2003.

[DOI: 10.1016/S0017-9310\(03\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S0017-9310(03)00301-6)

[62] [up](#) [up1](#). Jain, RK. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. Annual review annual review of biomedical engineering. Volumen: 1 Páginas: 241-263 Fecha de publicación: 1999

[DOI: 10.1146/annurev.bioeng.1.1.241](https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.1.1.241)

[63] [up](#). Garraud, Alexandra; Velez, Camilo; Shah, Yash; et al. Investigation of the Capture of Magnetic Particles From High-Viscosity Fluids Using Permanent Magnets. IEEE transactions on biomedical engineering Volumen: 63 Número:2 Páginas: 372-378 FEB 2016.

[DOI: 10.1109/tbme.2015.2458783](https://doi.org/10.1109/tbme.2015.2458783)

[64] [up](#) [up1](#) [up2](#). COMSOL multiphysics, “CFD module user’s guide,” *comsol tutorials*.

[Dirección web](#).

[65] [up](#). Jain, A., Graveline, A., Waterhouse, A. *et al.* A shear gradient-activated microfluidic device for automated monitoring of whole blood haemostasis and platelet function. *Nat Commun* 7, 10176 (2016) [DOI:10.1038/ncomms10176](https://doi.org/10.1038/ncomms10176)

[66] [up](#). Vidal-Meza, M.P.; Zhou, R.; Barua, S.; Wang, C.; Park, J. Simulation of interstitial nanoparticle flow for development of tumor-on-a-chip device. In Proceedings of the 2016 COMSOL Conference, Boston, MA, USA, 5–7 October 2016.

[DOI.org/10.1053/j.seminhematol.2013.06.007](https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.06.007)

[67] [up](#) [up1](#). Koesdjojo, Myra T.; Tennico, Yolanda H.; Reincho, Vincent T. Fabrication of a microfluidic system for capillary electrophoresis using a two-stage embossing technique and solvent and solvent welding on poly(methyl methacrylate) with water as a sacrificial layer.

ANALYTICAL CHEMISTRY Volumen: 80 Número: 7 Páginas: 2311-2318 Fecha de publicación: APR 1 2008 [DOI: 10.1021/ac7021647](https://doi.org/10.1021/ac7021647)

[68] [up](#). Akbari, Ehsan; Spsychalski, Griffin B.; Rangharajan, Kaushik K.; et al. Flow dynamics control endothelial permeability in a microfluidic vessel bifurcation model. LAB ON A CHIP Volumen: 18 Número: 7 Páginas: 1084-1093 Fecha de publicación: APR 7 2018

[DOI: 10.1039/c8lc00130h](https://doi.org/10.1039/c8lc00130h)

[69] [up](#). Zhang, Wenhua; Lin, Shuichao; Wang, Chunming; et al. PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics. LAB ON A CHIP Volumen: 9 Número: 21 Páginas: 3088-3094 Fecha de publicación: 2009 [DOI: 10.1039/b907254c](https://doi.org/10.1039/b907254c)

[70] [up](#). Nam Cao Hoai Le; Gubala, Vladimir; Clancy, Eoin; et al. Ultrathin and smooth Ultrathin and smooth poly(methyl methacrylate)(PMMA) films for label-free biomolecule detection with total internal reflection ellipsometry (TIRE). BIOSENSORS & BIOELECTRONICS.

Volumen: 36 Número: 1 Páginas: 250-256 Fecha de publicación: JUN-JUL 2012 [DOI: 10.1016/j.bios.2012.04.032](https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.04.032)

[71] [up](#). Liang, Chao; Liu, Yuanchang; Liu, Chong; et al. One-step selective-wettability modification of PMMA microfluidic devices by using controllable gradient UV irradiation (CG UI) SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL Volumen: 273 Páginas: 1508-1518 Fecha de publicación: NOV 10 2018 [DOI: 10.1016/j.snb.2018.07.034](https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.034)

[72] [up](#). Sebastian, Bernhard; Dittrich, Petra S. Microfluidics to Mimic Blood Flow in Health Disease. ANNUAL REVIEW OF FLUID MECHANICS, VOL. 50 Colección:

Annual Review of Fluid Mechanics Volumen: 50 Páginas: 483-504 Fecha de publicación: 2018 [DOI: 10.1146/annurev-fluid-010816-060246](https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-010816-060246)

[73] [up](#). Zhang, Xuanqi; Li, Lingjun; Luo, Chunxiong. Gel integration for microfluidic Applications. LAB ON A CHIP Volumen: 16 Número: 10 Páginas: 1757-1776 Fecha de publicación: 2016 [DOI: 10.1039/c6lc00247a](https://doi.org/10.1039/c6lc00247a)

[74] [up](#). McCain, Megan L.; Agarwal, Ashutosh; Nesmith, Haley W.; et al. Micromolded gelatin hydrogels for extended culture of engineered cardiac tissues. BIOMATERIALS Volumen: 35 Número: 21 Páginas: 5462-5471 Fecha de publicación: JUL 2014 [DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.052](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.052)

[75] [up](#). Smith, Lucas; Cho, Sangkyun; Discher, Dennis E. Mechanosensing of matrix by stem cells: From matrix heterogeneity, contractility, and the nucleus in pore-migration, cardiogenesis and muscle stem cells in vivo. SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY Volumen: 71 Número especial: SI Páginas: 84-98 Fecha de publicación: NOV 2017 [DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.05.025](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.025)

[76] [up](#). Pérez-Martínez, Antonio; Fernández, Lucía; Ángel Díaz, Miguel. The therapeutic potential of natural killer cells to target medulloblastoma. EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY Volumen: 16 Número: 6 Páginas: 573-576 Fecha de publicación: JUN 2016. [DOI: 10.1080/14737140.2016.1184978](https://doi.org/10.1080/14737140.2016.1184978)

[77] [up](#) [up1](#). Corral Sánchez, María Dolores; Fernández Casanova, Lucía; Pérez-Martínez, Antonio. Beyond CAR-T cells: Natural killer cells immunotherapy. MEDICINA CLINICA Volumen: 154 Número: 4 Páginas: 134-141 Fecha de publicación: FEB 28 2020 [DOI: 10.1016/j.medcli.2019.08.008](https://doi.org/10.1016/j.medcli.2019.08.008)

[78] [up](#). Rezvani, Katayoun; Rouce, Rayne; Liu, Enli; et al.. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. MOLECULAR THERAPY Volumen: 25 Número: 8 Páginas: 1769-1781 Fecha de publicación: AUG 2 2017. [DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.06.012](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.012)

[79] [up](#). Shimasaki, Noriko; Jain, Amit; Campana, Dario. NK cells for cancer immunotherapy. NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY . March 2020 [DOI: 10.1038/s41573-019-0052-1](https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1)

[80] [up](#). Johnston, BM; Johnston, PR; Corney, S; et al.. Non-Newtonian blood flow in human right coronary arteries: steady state simulations. JOURNAL OF BIOMECHANICS. Volumen: 37 Número: 5 Páginas: 709-720 Fecha de publicación: MAY 2004. [DOI: 10.1016/j.jbiomech.2003.09.016](https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2003.09.016)

[81] [up](#). Metzger, Thomas A.; Vaughan, Ted J.; McNamara, Laoise M.; et al.. Altered architecture and cell populations affect bone marrow mechanobiology in the osteoporotic human femur. BIOMECHANICS AND MODELING IN MECHANOBIOLOGY. Volumen: 16 Número: 3 Páginas: 841-850 Fecha de publicación: JUN 2017 [DOI: 10.1007/s10237-016-0856-4](https://doi.org/10.1007/s10237-016-0856-4)

[82] [up](#). Zhang, Xuanqi; Li, Lingjun; Luo, Chunxiong. Gel integration for microfluidic applications. LAB ON A CHIP Volumen: 16 Número: 10 Páginas: 1757-1776 Fecha de publicación: 2016. [DOI: 10.1039/c6lc00247a](https://doi.org/10.1039/c6lc00247a)

[83] [up](#) [up1](#) [up2](#). Brian D Plouffe, Shashi K Murthy and Laura H Lewis. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. 2015 IOP Publishing Ltd. [DOI 10.1088/0034-4885/78/1/016601](https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/1/016601)

[84] [up](#) [up1](#). Robert, Damien; Pamme, Nicole; Conjeaud, Helene; et al.. Cell sorting by endocytotic capacity in a microfluidic magnetophoresis device. LAB ON A CHIP. Volumen: 11 Número: 11 Páginas: 1902-1910 Fecha de publicación: 2011 [DOI: 10.1039/c0lc00656d](https://doi.org/10.1039/c0lc00656d)

[85] [up](#). Frederick W. Alt, Tasuku Honjo, Andreas Radbruch, Michael. Molecular Biology of B

Cells. Second edition. Elsevier 2015. [web](#).

[86]. [up](#) Price, Paige M.; Mahmoud, Waleed E.; Al-Ghamdi, Ahmed A.; et al.. Magnetic Drug Delivery: Where the Field Is Going. FRONTIERS IN CHEMISTRY. Volumen: 6 Número de artículo: 619 Fecha de publicación: DEC 11 2018. [doi: 10.3389/fchem.2018.00619](https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00619)

11. WEBGRAFÍA.

- [1.]. [up](#) National Cancer Institute. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®)–Health Professional Version. Recuperado (20/07/2019) de: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>
- [2.]. [up](#) NANO.gov (2016). NanoTube. The National Nanotechnology Initiative. Magnetolectric Nanoparticles (MENs) to Treat Cancer. Recuperado (20/07/2019) de: <https://www.youtube.com/watch?v=e5gkWh1ywKM>
- [3.]. [up](#) Alessandro Marturano-Kruik, Michele Maria Nava, Keith Yeager, Alan Chramiec, Luke Hao, Samuel Robinson, Edward Guo, Manuela Teresa Raimondi, Gordana Vunjak-Novakovic. (2018). PNAS. Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization. Recuperado (06/08/2019) de: <https://www.pnas.org/content/suppl/2018/01/18/1714282115.DCSupplemental>
- [4.]. [up](#) NanoComposix (2020). Magnetite Nanoparticles. Recuperado (15/08/2019) de: <https://nanocomposix.com/pages/magnetite-nanoparticles#target>
- [5.]. [up](#) Supermagnete. Cálculo de la densidad de flujo magnético. Recuperado (07/09/2019) de: <https://www.supermagnete.es/faq/Como-se-calcula-la-densidad-de-flujo>
- [6.]. [up](#) Megías M, Molist P, Pombal MA. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. Tipos celulares .Recuperado (08/09/2019) de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/endotelial.php>
- [7.]. [up](#) Khanacademy (2020). Three types of capillaries. Recuperado (10/09/2019) de: <https://www.khanacademy.org/science/health-and-medicine/circulatory-system/blood-vessels/v/three-types-of-capillaries>
- [8.]. [up](#) Lorenzo Crumbie, Dimitrios Mytilinaios (2020). Bone marrow histology. Kenhub. Recuperado (13/09/2019) de: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/histology-of-bone-marrow>
- [9.]. [up](#) National Institute of health (2001). Hematopoietic Stem Cells. Recuperado (20/09/2019) de: <https://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter5.htm>
- [10.]. [up](#) Pathpedia. Bone marrow. Recuperado (20/09/2019) de: https://www.pathpedia.com/education/eatlas/histology/bone_marrow/Images.aspx?1
- [11.]. [up](#) Hans-Georg Kopp, Scott T. Avezilla, Andrea T. Hooper, Shahin Rafii. (2005). The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. Recuperado (02/11/2019) de: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00025.2005>
- [12.]. [up](#) Clinicalgate (2015). Normal bone marrow histology. Recuperado (05/11/2019) de: <https://clinicalgate.com/normal-bone-marrow-histology/>
- [13.]. [up](#) Cesare Tozzo (2018). Modeling Ferromagnetic Materials in COMSOL Multiphysics®. Recuperado (10/01/2020) de: <https://www.comsol.com/blogs/modeling-ferromagnetic-materials-in-comsol-multiphysics/>
- [14.]. [up](#) Fanny Griesmer (2014). Comsol. Red Blood Cell Separation from a Flow Channel. Recuperado (10/01/2020) de: <https://www.comsol.com/blogs/red-blood-cell-separation-flow-channel/>
- [15.]. [up](#) Walter Frei (2019). Comsol. "Building a Magnetohydrodynamic Multiphysics Model in COMSOL®". Recuperado (20/01/2020) de: <https://www.comsol.com/blogs/building-a-magnetohydrodynamic-multiphysics-model-in-comsol/>

- [16.] [up](#) J. Park, M. P. Vidal-Meza, R. Zhou, S. Barua , C. Wan (2016). Simulation of Interstitial Nanoparticle Flow for Development of Tumor-On-A-Chip Device. Comsol. Missouri University of Science & Technology, Rolla, MO, USA. Recuperado (25/01/2020) de: <https://www.comsol.com/paper/simulation-of-interstitial-nanoparticle-flow-for-development-of-tumor-on-a-chip--36712>
- [17.]. [up](#) CIDAR (2019). Engineering Continuous-Flow Microfluidics. Recuperado (20/02/2020) de: <https://3duf.org/>
- [18.]. [up](#) Elveflow (2017). Materials for microfluidic device fabrication: a review. Recuperado (26/02/2020) de: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/materials-for-microfluidic-chips-fabrication-a-review-2017/>
- [19.]. [up](#) BostonU HW Project: MARS (Microfluidic Applications for Research in Synbio) (2017). Recuperado (10/03/2020) de: http://2017.igem.org/Team:BostonU_HW
- [20.]. [up](#) Dartmouth (2020). Geisel School of Medicine. Department of Medical Education. Recuperado (13/04/2020) de: <http://www.dartmouth.edu/~anatomy/CTO/homepage/Lab%201/Lab1%20Virtual/Lab1Histo.html?>
- [21.]. [up](#) IT'IS FUNDATION (2020). Tissue properties. Recuperado (04/05/2020) de: <https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/>