

# Informe final publicable de proyecto

## Microscopio dentro de incubador de células: desarrollo de un sistema compacto de enfoque automatizado para monitoreo prolongado en tiempo real con aplicación a nuevos ensayos de migración y proliferación en carcinoma oral

Código de proyecto ANII: FMV\_1\_2019\_1\_156126

06/09/2022

**ALONSO SIRI, Julia Rosa** (Responsable Técnico - Científico)

**SILVA MIRABALLES, Alejandro Emanuel** (Investigador)

**AROCENA SUTZ, German Miguel** (Co-Responsable Técnico-Científico)

**BOLOGNA MOLINA, Ronell Eduardo** (Investigador)

**D'AIUTO, Natali** (Investigador)

**FERNÁNDEZ CASORATTI, Ariel** (Investigador)

**FERRARI DAMIANO, José Antonio** (Investigador)

**LAGUNO JAIME, Juan Manuel** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE INGENIERÍA (Institución Proponente) \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

## Resumen del proyecto

El monitoreo de células a tiempo real y por largos períodos de tiempo es un proceso muy costoso que requiere frecuentemente un microscopio con jaula de control, por ejemplo.

El objetivo central del proyecto era la creación de una alternativa de bajo costo a este proceso mediante el desarrollo de un microscopio compacto que cupiera dentro de un incubador de células, cuyas piezas de montaje se fabricaran utilizando impresión 3D, cuya óptica incorporase una lente de foco ajustable eléctricamente para realizar un enfoque en Z no mecánico y con una platina móvil en el plano XY y que permitiera la evaluación de diferentes condiciones experimentales dentro del incubador.

A través de este proyecto mediante un equipo interdisciplinario, se logró desarrollar una herramienta para microscopía innovadora, capaz de realizar registros celulares prolongados, así como también se desarrollaron metodologías de cultivo celular que permitirán en un futuro próximo la aplicación de este microscopio al estudio de comportamientos fundamentales en células tumorales.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Físicas / Óptica, Acústica / Microscopía**

**Palabras clave: Microscopía Multifocal / Carcinoma / Imagenología Médica y Biológica /**

## Introducción

La capacidad de monitorear células en tiempo real por largos períodos de tiempo es una herramienta clave con muy diversas aplicaciones (L. Collins et al., 2019). El monitoreo de células en tiempo real es un proceso muy costoso, que suele requerir de un microscopio equipado y dedicado únicamente para este fin.

Una alternativa es el uso de microscopios compactos, carentes de objetivos oculares, que quepan en un incubador de células y que sean controlados a través de una computadora desde el exterior (microscopios dentro de incubador). Existen microscopios comerciales de este tipo, cuyos usos incluyen el estudio de la proliferación de células tumorales (Karthikeyan et al., 2018), el screening de fármacos (Stewart et al., 2015) y el diagnóstico clínico (Muldur et al., 2018). Más aún, numerosas patentes en la industria farmacéutica y biotecnológica presentan resultados obtenidos mediante estos microscopios (ver por ejemplo (Larsson et al.; Lehtiö et al.)), demostrando la importancia de esta herramienta en aplicaciones de desarrollo tecnológico. No obstante, su costo puede superar las decenas de miles de dólares (Keshamouni), volviéndose una barrera para su uso por distintos actores productivos, particularmente en el medio nacional.

Con el objetivo de alcanzar alternativas de bajo costo, comienzan a aparecer en la literatura especializada enfoques novedosos a este problema donde se combinan la óptica y la electrónica con algoritmos de reconstrucción de imágenes, como por ejemplo (Kim et al., 2016), donde múltiples microscopios pticográficos de Fourier (FPM) capturan una serie de imágenes de baja resolución de la muestra bajo distintos ángulos de iluminación para luego mejorar la resolución a través de algoritmos iterativos. Otro ejemplo es (Jin et al., 2015), donde diversas estrategias de postprocesamiento tales como compressive sensing son implementadas para mejorar la calidad de las imágenes.

Por otra parte, los microscopios dentro de incubador comerciales poseen enfoque mecánico y control de foco motorizado, lo que aumenta su complejidad y costo, pero carecen de sistemas de autofocus que contrarresten la deriva de foco típica en registros prolongados (Shen et al., 2006). Una alternativa al enfoque mecánico tradicional es el uso de lentes de foco ajustable eléctricamente (ETL), que permiten hacer foco en ausencia de partes mecánicas. Las ETL cambian su curvatura en función de una corriente eléctrica y al incorporarse en el camino óptico de un microscopio permiten ajustar el foco sin desplazar el objetivo, haciendo un enfoque completamente óptico que puede ser automatizado en forma sencilla y que además da la posibilidad de realizar barridos axiales muy precisos y veloces (Blum et al.). Las ETL tienen un costo muy bajo en comparación con otros componentes de un microscopio (Leuenberger and Voigt), por lo que sus aplicaciones en microscopía óptica están siendo estudiadas intensamente (Jabbour et al., 2014; Nakai et al., 2015),

incluyendo por nuestro grupo de investigación (Alonso et al., 2019). En particular, hemos desarrollado un microscopio de fluorescencia basado en una ETL para realizar reconstrucciones ópticas de objetos biológicos de gran espesor, y lo hemos usado para analizar la estructura tridimensional de esferoides multicelulares tumorales (Alonso et al., 2019), aplicando además algoritmos ya desarrollados por nuestro grupo para procesar imágenes obtenidas mediante ETL (Alonso et al., 2015, 2016).

Por ende, este proyecto busca extender las aplicaciones de las ETL al diseño de un microscopio dentro de incubador capaz de controlar el foco, realizar escaneos axiales y contrarrestar la deriva de foco, todo ello mediante un mecanismo automatizado carente de partes mecánicas basado en las propiedades de las ETL. Para adaptar los componentes básicos del microscopio y del sistema de control al ambiente del incubador, y para que sea posible visualizar distintos tipos de contenedores de células, se requerirá el diseño y la construcción de varias piezas específicas. Para producir estas piezas a bajo costo y de forma precisa y reproducible, proponemos usar tecnologías de impresión 3D, cada vez más utilizadas en el área de la microscopía (Sharkey et al., 2016). También proponemos usar esta tecnología para implementar una platina móvil en el plano XY, de modo de evaluar múltiples condiciones en simultáneo, realizando los así llamados ensayos multiplex. Este proyecto propone el diseño innovador de un microscopio personalizado que, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se encuentra entre las tecnologías disponibles tanto en nuestro país como en el exterior.

Por otra parte, el monitoreo en tiempo real de células en cultivo por períodos prolongados requiere frecuentemente de cámaras de cultivo adaptadas específicamente al tipo de experimento a realizar. Si bien existen numerosas alternativas comerciales para disponer de cámaras de cultivo especializadas, las ya mencionadas tecnologías de impresión 3D han dado la posibilidad de diseñar con cada vez mayor flexibilidad y bajo costo dispositivos de cultivo celular adaptados de manera precisa a una gran variedad de requerimientos experimentales (Wardyn et al., 2015; Zhong et al., 2018). En particular, se han producido por impresión 3D micro-moldes que permiten generar cámaras de cultivo con múltiples micro-pocillos mediante el uso de polímeros biocompatibles, de forma de poder realizar de forma sencilla y costo reducido ensayos multiplex (Alessandri et al., 2017), usados por ejemplo para visualizar el crecimiento y la migración de agregados tumorales multicelulares (Casey et al., 2017). Recientemente, hemos desarrollado una cámara de cultivo sencilla que permite cultivar células tumorales en condiciones similares a las alteraciones del microambiente tumoral temprano (Arocena et al., 2019), y también sería muy interesante poder adaptar este ensayo a un formato de micro-pocillos multiplex. Por ende, proponemos en resumen usar tecnologías de impresión 3D y polímeros biocompatibles para generar cámaras de cultivo que, en conjunto con el microscopio dentro de incubador propuesto, permitan monitorear por tiempos prolongados la proliferación, migración e interacción con el microambiente de células tumorales, así como determinar de qué forma influyen diversos agentes quimioterapéuticos en dichos procesos. En particular, proponemos trabajar con líneas celulares de carcinoma oral humano, que es un tipo de cáncer agresivo y de alta prevalencia en Uruguay (Barrios et al., 2014), por lo que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas en esta enfermedad es un área de investigación de gran relevancia para la salud en nuestro país.

### **Metodología/diseño del estudio**

1) Diseño y montaje de un microscopio compacto con ETL incorporada capaz de ser usado dentro de un incubador de células.

Una primera etapa de este proyecto consiste en el diseño y montaje del dispositivo óptico a usar. Proponemos basarnos en un dispositivo óptico de contraste de fases, que es una de las técnicas de microscopía óptica a la vez más sencillas y más establecidas para visualizar células (Webb, 2015). La incorporación de una ETL a un dispositivo óptico de contraste de fases ya ha sido descrita (Zuo et al., 2013), y por otra parte es muy similar a su incorporación al microscopio de fluorescencia que hemos construido previamente (Alonso et al., 2019), por lo que no esperamos encontrar mayores dificultades en este proceso. Como fuente de iluminación, usaremos LED, al igual que en nuestro trabajo anterior, que por otra parte es muy ventajosa para realizar registros prolongados de células vivas, ya que su fototoxicidad es mínima (Cole, 2014).

2) Puesta a punto del sistema de control de la ETL para realizar enfoque remoto y escaneos axiales automatizados

Al igual que en nuestro trabajo previo, estableceremos el rango de distancias focales necesario para hacer foco y realizar amplios escaneos axiales, y ajustaremos de manera correspondiente las intensidades de corriente en el dispositivo controlador de la ETL (Alonso et al., 2019), en lo que constituye el paso clave para poner a punto dicho sistema de control (Nakai et al., 2015). A su vez, determinaremos la magnificación asociada a cada distancia focal, fundamental para el posterior registro y procesamiento de las imágenes multifoco a adquirir mediante targets de calibración (USAF 1951, spoke target) y plataformas micrométricas de uso común en nuestro laboratorio. De este modo, tendremos un sistema de control capaz de usar la ETL para hacer foco y realizar escaneos axiales de forma remota y sin partes mecánicas. El último paso en esta etapa será programar -por medio de lenguajes como Python o C++ - el dispositivo controlador de la ETL para realizar escaneos axiales definidos y

periódicos, de modo de poder realizar registros prolongados en el tiempo sin perder nunca el plano de foco y, en el caso de ensayos 3D, registrando varios planos focales de interés.

3) Diseño y construcción de un estativo de microscopio adaptado al uso dentro de incubador y de una platina motorizada usando impresión 3D y placas de microcontroladores open source  
El diseño y construcción de las piezas de soporte que constituyan el estativo del microscopio se hará mediante impresión 3D, una técnica sumamente versátil, reproducible y de bajo costo que además ya ha sido utilizada para generar piezas de soporte en prototipos de microscopios dentro de incubador (Jin et al., 2015). Por otra parte, la impresión 3D se ha usado en combinación con placas de microcontroladores open source de amplio uso (Arduino) para construir platinas motorizadas fácilmente reproducibles (Schneiderei et al., 2017). Basándonos en estos trabajos previos, construiremos una platina motorizada sencilla, y le añadiremos marcadores fiduciales, de modo de tener un registro preciso entre imágenes de una misma muestra a distintos tiempos, compensando errores introducidos por la eventual deriva en el plano XY de la platina (Lee et al., 2012).

4) Desarrollo de ensayos celulares multiplex mediante el uso de cámaras de cultivo creadas por impresión 3D en combinación con polímeros biocompatibles

Como ya mencionamos, una forma muy versátil de crear cámaras de cultivo es la combinación de moldes generados por impresión 3D, que se usan para crear pocillos en la superficie de un polímero biocompatible tal como la agarosa, inicialmente en estado líquido y que luego al gelificar adquirirá la forma marcada por el molde, generando pocillos del tamaño y distribución marcados por el molde. Luego, dichos pocillos pueden ser recubiertos de una capa de poli-lisina o colágeno de tipo I, de modo de generar una superficie que permita la adhesión celular y el crecimiento en monocapa. De esta forma, podremos generar cámaras de cultivo con tamaños y distribuciones de micropocillos variables. En particular, esto nos permitirá crear micro-pocillos donde podremos seguir la adhesión y proliferación en monocapa de una única célula inicial hasta formar una colonia, Esto nos permitirá estudiar la capacidad formadora de colonias de células tumorales, así como la dinámica de formación de dichas colonias, y cómo la capacidad y la dinámica de formación de colonias se ve alterada por el tratamiento con fármacos usados en quimioterapia. Usaremos líneas celulares de carcinoma oral tales como las líneas Scc-4, Scc-9 y Scc-15 (Park et al., 2016), y fármacos antiproliferativos tales como cisplatino, 5-fluorouracilo o docetaxel, ampliamente usados en el tratamiento del carcinoma oral (Hartner, 2018). Alternativamente, colocaremos en cada micropocillo células embebidas en una matriz extracelular biológica y observaremos cómo migran tridimensionalmente gracias a la capacidad de barrido axial de la ETL del microscopio, implementando así ensayos de migración 3D similares a otros ya descritos (Vinci et al., 2015). En este tipo de ensayo, estudiaremos cómo la capacidad de migración tridimensional se ve alterada por fármacos con efecto antimetastático, tales como el inhibidor de Rho-quinasas Fasudil (De Sales Costa Moreira Carboni et al., 2015). Finalmente, buscaremos adaptar el método que hemos desarrollado recientemente para cultivar células progresivamente alejadas de una fuente de oxígeno, y que resulta en un microambiente progresivamente hipóxico y acidificado similar al microambiente tumoral in vivo (Arocena et al., 2019) a un formato multiplex utilizando cámaras de micro-pocillos similares a las descritas más arriba, de modo de hacer un monitoreo prolongado de la respuesta celular a un microambiente alterado en varios micro-pocillos en paralelo.

## Resultados, análisis y discusión

Consideramos que este proyecto ha generado un desarrollo tecnológico innovador, mediante la aplicación de la ETL a la creación del microscopio dentro de incubador. A su vez también ha permitido generar registros celulares prolongados que esperamos contribuyan a comprender mejor la dinámica de proliferación y migración 3D en células de carcinoma oral, así como el impacto de agentes quimioterapéuticos en dichas dinámicas, y también en la caracterización de la dinámica de la respuesta celular a un microambiente progresivamente hipóxico. Pensamos que hemos contribuido a la generación de capacidades en el ámbito de la tecnología de cultivo celular, con aplicación a aquellos ámbitos donde el cultivo celular es una herramienta clave.

En términos de formación de RRHH, el proyecto contribuyó de manera considerable al desarrollo de una tesis de doctorado en Ingeniería Física en marcha y una tesis de maestría Biología Celular y Molecular en marcha de integrantes del proyecto.

Publicación en Proceedings de Conferencias Internacionales Arbitradas:

Imaging and Applied Optics Congress 2022:

"Field-of-view extension and XY-drift correction in microscopy for large samples" Autores: Alejandro Silva, Miguel Arocena, Julia Alonso.

Frontiers in Optics + Laser Science Conference 2021:

"3D-Printed Autofocus Custom-Built Microscope for Extended Field-of-View Imaging of Large Biological Samples", Autores: Alejandro Silva, Julia Alonso.

Observación: Ambos preprint están depositados en el repositorio Colibrí, con embargo por 12 meses.

Esperamos continuar trabajando en conjunto en estas líneas de investigación y llegar a publicar en revistas arbitradas internacionales en un futuro próximo.

Así mismo, no en lo inmediato, pero pensamos que en un futuro no muy lejano podríamos acercarnos a transferir un prototipo para su uso por potenciales beneficiarios.

## Conclusiones y recomendaciones

El desarrollo de este proyecto ha generado un desarrollo tecnológico innovador, mediante la aplicación de la ETL a la creación del microscopio dentro de incubador. A su vez también ha permitido generar registros celulares prolongados que esperamos contribuyan a comprender mejor la dinámica de proliferación y migración 3D en células de carcinoma oral, así como el impacto de agentes quimioterapéuticos en dichas dinámicas, y también en la caracterización de la dinámica de la respuesta celular a un microambiente progresivamente hipóxico. Pensamos que hemos contribuido a la generación de capacidades en el ámbito de la tecnología de cultivo celular, con aplicación a aquellos ámbitos donde el cultivo celular es una herramienta clave.

En términos de formación de RRHH, el proyecto contribuyó de manera considerable al desarrollo de una tesis de doctorado en Ingeniería Física en marcha y una tesis de maestría Biología Celular y Molecular en marcha de integrantes del proyecto.

Publicación en Proceedings de Conferencias Internacionales Arbitradas:

Imaging and Applied Optics Congress 2022:

"Field-of-view extension and XY-drift correction in microscopy for large samples" Autores: Alejandro Silva, Miguel Arocena, Julia Alonso.

Frontiers in Optics + Laser Science Conference 2021:

"3D-Printed Autofocus Custom-Built Microscope for Extended Field-of-View Imaging of Large Biological Samples", Autores:

Alejandro Silva, Julia Alonso.

Observación: Ambos preprint están depositados en el repositorio Colibrí, con embargo por 12 meses.

Esperamos continuar trabajando en conjunto en estas líneas de investigación y llegar a publicar en revistas arbitradas internacionales en un futuro próximo.

Así mismo, no en lo inmediato, pero pensamos que en un futuro no muy lejano podríamos acercarnos a transferir un prototipo para su uso por potenciales beneficiarios.

## Referencias bibliográficas

- Alessandri, K., L. Andrique, M. Feyeux, A. Bikfalvi, P. Nassoy, and G. Recher. 2017. All-in-one 3D printed microscopy chamber for multidimensional imaging, the UniverSlide. *Sci. Rep.* 7:1–10. doi:10.1038/srep42378.
- Alonso, J.R., A. Fernández, G.A. Ayubi, and J.A. Ferrari. 2015. All-in-focus image reconstruction under severe defocus. *Opt. Lett.* 40:1671. doi:10.1364/OL.40.001671.
- Alonso, J.R., A. Fernández, and J.A. Ferrari. 2016. Reconstruction of perspective shifts and refocusing of a three-dimensional scene from a multi-focus image stack. *Appl. Opt.* 55:2380. doi:10.1364/AO.55.002380.
- Alonso, J.R., A. Silva, and M. Arocena. 2019. 3D visualization in multifocus fluorescence microscopy. In *Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display 2019*. J.-Y. Son, B. Javidi, and O. Matoba, editors. SPIE. 25.
- Alonso Siri, J.R. CVuY.
- Arocena, M., M. Landeira, A. Di Paolo, A. Silva, J. Sotelo;Silveira, A. Fernández, and J. Alonso. 2019. Using a variant of coverslip hypoxia to visualize tumor cell alterations at increasing distances from an oxygen source. *J. Cell. Physiol.* jcp.28507. doi:10.1002/jcp.28507.
- Artymovich, K., and D.M. Appledorn. 2015. *A Multiplexed Method for Kinetic Measurements of Apoptosis and Proliferation Using Live-Content Imaging*. Humana Press, New York, NY. 35–42.
- Barrios, E., M. Garau, R. Alonso, and C. Musetti. 2014. *IV ATLAS DE INCIDENCIA DEL CANCER EN EL URUGUAY: Periodo 2007-2011*. 108 pp.
- Blum, M., M. Büeler, ... C.G.-O.D. and, and U. 2011. Compact optical design solutions using focus tunable lenses. [spiedigitallibrary.org](http://spiedigitallibrary.org).
- Casey, J., X. Yue, T.D. Nguyen, A. Acun, V.R. Zellmer, S. Zhang, and P. Zorlutuna. 2017. 3D hydrogel-based microwell arrays as a tumor microenvironment model to study breast cancer growth. *Biomed. Mater.* 12:025009. doi:10.1088/1748-605X/aa5d5c.
- Cole, R. 2014. Live-cell imaging. *Cell Adh. Migr.* 8:452–9. doi:10.4161/cam.28348.
- Hartner, L. 2018. Chemotherapy for Oral Cancer. *Dent. Clin. North Am.* 62:87–97. doi:10.1016/j.cden.2017.08.006.
- Jabbour, J.M., B.H. Malik, C. Olsovsky, R. Cuenca, S. Cheng, J.A. Jo, Y.-S.L. Cheng, J.M. Wright, and K.C. Maitland. 2014. Optical axial scanning in confocal microscopy using an electrically tunable lens. *Biomed. Opt. Express.* 5:645. doi:10.1364/BOE.5.000645.
- Jin, D., D. Wong, J. Li, Z. Luo, Y. Guo, B. Liu, Q. Wu, C.-M. Ho, and P. Fei. 2015. Compact Wireless Microscope for In-Situ Time Course Study of Large Scale Cell Dynamics within an Incubator. *Sci. Rep.* 5:18483. doi:10.1038/srep18483.
- Karthikeyan, C., H. Amawi, A.G. Viana, L. Sanglard, N. Hussein, M. Saddler, C.R. Ashby, N.S.H.N. Moorthy, P. Trivedi, and A.K. Tiwari. 2018. IH-Pyrazolo[3,4-b]quinolin-3-amine derivatives inhibit growth of colon cancer cells via apoptosis and sub G1 cell cycle arrest. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 28:2244–2249. doi:10.1016/j.bmcl.2018.05.045.
- Keshamouni, V. Incucyte: A Live-Cell Imaging System that fits into Standard CO2-Incubator.
- Kim, J., B.M. Henley, C.H. Kim, H.A. Lester, and C. Yang. 2016. Incubator embedded cell culture imaging system (EmSight) based on Fourier ptychographic microscopy. *Biomed. Opt. Express.* 7:3097–110. doi:10.1364/BOE.7.003097.
- L. Collins, J., B. van Knippenberg, K. Ding, and A. V. Kofman. 2019. Time-Lapse Microscopy. In *Cell Culture*. IntechOpen.
- Larsson, R., P. Nygren, ... J.G.-U.P.A. 13, and undefined 2012. *Tumour Treatment Agents and Method*. [freepatentsonline.com](http://freepatentsonline.com).
- Lee, S.H., M. Baday, M. Tjioe, P.D. Simonson, R. Zhang, E. Cai, and P.R. Selvin. 2012. Using fixed fiduciary markers for stage drift correction. *Opt. Express.* 20:12177. doi:10.1364/OE.20.012177.
- Lehtiö, L., H. Venkannagari, ... B.L.-U.P.A. 16, and U. 2019. Compounds for use in the treatment of cancer. Google Patents.
- Leuenberger, D., and F. Voigt. Focus-Tunable Lenses Enable 3-D Microscopy | Features | Apr 2015 | BioPhotonics.
- Lin, Y.C., J.F. Lin, T.F. Tsai, H.E. Chen, K.Y. Chou, S.C. Yang, Y.M. Tang, and T.I.S. Hwang. 2017. Acridine orange exhibits

photodamage in human bladder cancer cells under blue light exposure. *Sci. Rep.* 7:1–11. doi:10.1038/s41598-017-13904-0.

Muldur, S., A.L. Marand, F. Ellett, and D. Irimia. 2018. Measuring spontaneous neutrophil motility signatures from a drop of blood using microfluidics. 147. 1st ed. Elsevier Inc. 93–107 pp.

Nakai, Y., M. Ozeki, T. Hiraiwa, R. Tanimoto, A. Funahashi, N. Hiroi, A. Taniguchi, S. Nonaka, V. Boilot, R. Shrestha, J. Clark, N. Tamura, V.M. Draviam, and H. Oku. 2015. High-speed microscopy with an electrically tunable lens to image the dynamics of in vivo molecular complexes. *Rev. Sci. Instrum.* 86:013707. doi:10.1063/1.4905330.

Park, S., W.-J. Jang, and C.-H. Jeong. 2016. Nano-biomechanical Validation of Epithelial–Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Biol. Pharm. Bull.* 39:1488–1495. doi:10.1248/bpb.b16-00266.

De Sales Costa Moreira Carboni, S., N.A.R. Lima, N.M. Pinheiro, B.M. Tavares-Murta, and V.O. Crema. 2015. HA-1077 inhibits cell migration/invasion of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer. Drugs.* 26:923–930. doi:10.1097/CAD.0000000000000267.

Schneiderreit, D., L. Kraus, J.C. Meier, O. Friedrich, and D.F. Gilbert. 2017. Step-by-step guide to building an inexpensive 3D printed motorized positioning stage for automated high-content screening microscopy. *Biosens. Bioelectron.* 92:472–481. doi:10.1016/j.bios.2016.10.078.

Sharkey, J.P., D.C.W. Foo, A. Kabla, J.J. Baumberg, and R.W. Bowman. 2016. A one-piece 3D printed flexure translation stage for open-source microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 87:025104. doi:10.1063/1.4941068.

Shen, F., L. Hodgson, and K. Hahn. 2006. Digital Autofocus Methods for Automated Microscopy. *Methods Enzymol.* 414:620–632. doi:10.1016/S0076-6879(06)14032-X.

Stewart, H., C. Bartlett, D. Ross-Thriepland, J. Shaw, S. Griffin, and M. Harris. 2015. A novel method for the measurement of hepatitis C virus infectious titres using the IncuCyte ZOOM and its application to antiviral screening. *J. Virol. Methods.* doi:10.1016/j.jviromet.2015.03.009.

Vinci, M., C. Box, and S.A. Eccles. 2015. Three-Dimensional (3D) Tumor Spheroid Invasion Assay. *J. Vis. Exp.* e52686. doi:10.3791/52686.

Wardyn, J.D., C. Sanderson, L.E. Swan, and M. Stagi. 2015. Low cost production of 3D-printed devices and electrostimulation chambers for the culture of primary neurons. *J. Neurosci. Methods.* 251:17–23. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.05.001.

Webb, K.F. 2015. Condenser-free contrast methods for transmitted-light microscopy. *J. Microsc.* 257:8–22. doi:10.1111/jmi.12181.

Zhong, J., Y. Zhang, J. Chen, R. Huang, Y. Yang, H. Chen, Y. Huang, W. Tan, and Z. Tan. 2018. In Vitro Study of Colon Cancer Cell Migration Using E-Jet 3D Printed Cell Culture Platforms. *Macromol. Biosci.* 18:1–15. doi:10.1002/mabi.201800205.

Zuo, C., Q. Chen, W. Qu, and A. Asundi. 2013. High-speed transport-of-intensity phase microscopy with an electrically tunable lens. *Opt. Express.* 21:24060. doi:10.1364/OE.21.024060.

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)