



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO DE PLATAFORMA CON
MICROFLUJO PARA CULTIVO CELULAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
FÍSICO

PRESENTA:
EDGAR ADÁN JIMÉNEZ DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx.

NOVIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.Datos del alumno	1.Datos del alumno
Apellido paterno	Jiménez
Apellido materno	Díaz
Nombre(s)	Edgar Adán
Teléfono	(01 595) 9512 174
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Carrera	Física
Número de cuenta	307070616
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Mathieu Christian Anne
Apellido paterno	Hautefeuille
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	Lucía
Apellido paterno	Medina
Apellido materno	Gómez
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Dr.
Nombre(s)	Naser
Apellido paterno	Qureshi
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dra.
Nombre(s)	Tatiana
Apellido paterno	Fiordelisio
Apellido materno	Coll
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Dr.
Nombre(s)	Genaro
Apellido paterno	Vázquez
Apellido materno	Victorio
7.Datos del trabajo escrito.	7.Datos del trabajo escrito.
Título	Desarrollo de plataforma con microflujo para cultivo celular
Número de páginas	88 p
Año	2016

*A mis padres,
sólo ellos saben su
esfuerzo para este logro...*

Índice general

I	Antecedentes	1
1.	Introducción y justificación del trabajo	2
1.1.	¿Por qué una plataforma?	4
1.1.1.	Microambiente celular	4
1.1.2.	Cultivo Celular	5
1.2.	Andamios celulares	6
1.2.1.	Requerimientos de un andamio	7
1.3.	Plataformas Microfluídicas	9
1.4.	Plataformas de cultivo celular	11
1.5.	Estado del arte	11
2.	Microfluídica	16
2.1.	La física de la microfluídica	17
2.1.1.	Número de Reynolds	17
2.1.2.	Longitud característica	19
2.1.3.	Flujo Laminar	20
2.1.4.	Difusión	20
2.1.5.	Caída de presión	21
2.1.6.	Capilaridad	22
3.	Métodos de fabricación de chips microfluídicos	25
3.1.	Elaboración de plataformas con microflujo	25
3.2.	Fabricación del micromolde	27
3.2.1.	Fotolitografía	27
3.2.2.	Polimerización por doble fotón	28
3.2.3.	Shrinky Dinks	29
3.2.4.	Ablación láser	31

3.2.5. Otras técnicas de fabricación	32
3.3. Fabricación del canal	33
3.3.1. Litografía suave	34
3.3.2. PDMS	36
3.3.3. Preparación del molde para réplica	36
3.4. Ensamblaje	37
3.4.1. Tratamiento por plasma	37
3.4.2. Curado parcial	38
3.4.3. Otras técnicas	39
3.5. Dimensiones	39
II Resultados	41
4. Protocolo de fabricación de chips microfluídicos	42
4.1. Elaboración de plataformas con microflujo	42
4.2. Molde	43
4.2.1. Fotolitografía	43
4.2.2. Polimerización por doble fotón	44
4.2.3. Grabado láser (Ablación láser)	45
4.2.4. Shrinky Dinks	47
4.3. Réplica	49
4.3.1. Doble réplica	52
4.4. Ensamblaje	56
4.4.1. Ensamble con doble estructura	56
4.4.2. Pruebas de hermeticidad	57
5. Validación: Plataforma de cultivo para hígado	60
5.1. Arquitectura del hígado	60
5.2. En el LaNSBioDyT	62
5.2.1. Diseño y fabricación	62
5.3. Sembrado	64
5.4. Evaluación de los chips: cultivo celular	65
6. Conclusiones y trabajo a futuro	72

Desarrollo de plataforma con microflujo para cultivo celular

por

Edgar Adán Jiménez Díaz

Resumen

En esta tesis se presenta una introducción a los métodos de fabricación de plataformas microfluídicas especializadas en cultivo celular. Así como un protocolo para su fabricación en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la facultad de Ciencias de la UNAM. En este protocolo se muestra a detalle las consideraciones que se deben tener al realizar una de estas plataformas y de manera importante que estas se realicen con herramientas disponibles en el laboratorio. Herramientas básicas y accesibles para cualquier otro laboratorio.

También se presentan tres chips microfluídicos para cultivo de células hepáticas como validación del protocolo. Estos chips fueron realizados con tres métodos distintos de fabricación, de entre los que resalta la técnica de ablación láser desarrolla en este mismo laboratorio, método alternativo y de bajo costo en el desarrollo de andamios celulares. Por otro lado, sobre sale la propuesta de combinar estas técnicas de fabricación con Shrinky Dinks, lo que permite hacer la plataforma de cultivo más flexible a las necesidades de las investigaciones que requieran de un chip.

Como resultado se obtiene la aprobación del método de fabricación así como la propuesta de algunas mejoras a los diseños.

Este proyecto se desarrolla, y surge en el marco del convenio de colaboración entre la Facultad de Ciencias y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, y en colaboración con el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Parte I
Antecedentes

Capítulo 1

Introducción y justificación del trabajo

Cada año, en México miles de pacientes son diagnosticados con alguna insuficiencia orgánica [1]. Cuando un órgano falla o presenta lesiones severas que le impiden realizar sus funciones adecuadamente, la solución más efectiva, y en muchas ocasiones la única, es el trasplante. El trasplante es el intercambio parcial o completo de un tejido u órgano entre un donador y un receptor, que incluso puede ser el mismo individuo. Sin embargo el mayor de los problemas con los trasplantes de órganos es la escasez de donadores. además de la frecuente incompatibilidad entre el donador y el receptor, así como el rechazo natural del organismo dificultando aún más el éxito del trasplante. Es por ello que nuevas alternativas se han desarrollado con la aplicación de principios y métodos de ingeniería y biología, conjugados en una nueva rama de la ciencia denominada ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos tiene por objetivo el estudio y comprensión de la relación existente entre la estructura y la función de los tejidos, tanto sanos como patológicos, para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan, mejoren o sustituyan temporalmente la función órgano-tisular [2].

Langer y Vacanti, a principios de la década de los noventa, fueron los primeros en fomentar el concepto de que las células pueden ser cultivadas en matrices artificiales, denominados *andamios celulares*, para sustentar la formación de algún nuevo tejido funcional que podría ser utilizado para reparar los órganos dañados, e incluso como una alternativa para evaluar los efectos y/o beneficios de fármacos u otras drogas, al igual que para el estudio y análisis de las funciones e interacciones básicas del tejido con sus componentes y estímulos externos [3]. Convencidos de que los tejidos, y finalmente los

órganos, pueden ser fabricados para ser usados en pacientes con necesidad de algún nuevo tejido.

Por naturaleza todo órgano en sus distintos niveles consta de un sistema microfluídico fundamental, como lo es la vascularización, entre otras estructuras microfluídicas particulares, factores indispensables para el correcto desarrollo y sobrevivencia de todo organismo. Elementos que deben ser considerados en dichos andamios celulares y de donde surge la necesidad de contar con un método establecido para la fabricación de plataformas microfluídicas, objetivo principal de esta tesis.

La ingeniería de tejidos se basa en diversas áreas de investigación, como biología celular y molecular, ingeniería de materiales, electrónica, medicina, física, diseño, entre otras. Lo que convierte a esta disciplina emergente en una rama multi y transdisciplinaria, con una amplia visión biotecnológica y cuyo enfoque transdisciplinario le otorga una oportunidad concreta para el desarrollo artificial de tejidos. El Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, fue creado como respuesta para impulsar el desarrollo de esta área a nivel nacional. Con su creación se ha puesto a disposición de la comunidad, herramientas y métodos para el desarrollo de nuevas plataformas-andamios celulares que imitan en lo posible la naturaleza.

Por otro lado, entre los órganos que se trasplantan con mayor frecuencia se encuentran la córnea, el riñón, los pulmones, el hígado y el corazón. El hígado sobresale por su complejidad para imitarse, funcional y estructuralmente, y por su importancia para el organismo.

El hígado es el órgano más grande dentro del cuerpo, sus funciones son fundamentales para la vida. Es responsable del almacenamiento de glucógeno, desintoxica el organismo eliminando de la sangre sustancias xenobióticas y nocivas para el individuo, controla el metabolismo, regula la síntesis y transporte del colesterol, metaboliza la urea, secreta bilis además de una extensa gama de proteínas plasmáticas como la albúmina, entre otras funciones. Es decir, el hígado es un importante regulador de procesos fisiológicos vitales. Y enfermedades hepáticas como fibrosis, cirrosis, hepatitis y carcinomas resultan ser un problema serio de salud, cuyas consecuencias llegan incluso a la muerte. La tasa de mortalidad de pacientes con falla hepática excede el 30 % [4]. Por tal motivo, grandes esfuerzos en los últimos años se han realizado para entender y atender los padecimientos hepáticos generando modelos *in vitro*. Sin embargo con los protocolos habituales no es posible mantener las funciones metabólicas del hepatocito más allá de dos horas [5]. Pero con nuevos dispositivos desarrollados se ha logrado mantener sus funciones hasta semanas

[5].

Estas circunstancias en torno al hígado nos han exhortado, en el LaNSBioDyT, a colaborar en el desarrollo de una plataforma de cultivo celular que procura la biometización. Y en la que sea posible estudiar los efectos del microflujo y otros factores, como la rigidez, en el cultivo *in vitro* de hepatocitos. De esta manera, se proporciona una nueva herramienta a los especialistas en biología y ciencias de la salud para el estudio del hígado, deseando generar conocimiento, y que puede ser extrapolable a otros sistemas biológicos.

1.1. ¿Por qué una plataforma?

En múltiples aplicaciones biomédicas es necesario la manipulación de células fuera del organismo. Aplicaciones que van desde investigación básica, pruebas de fármacos, terapias celulares hasta ingeniería de tejidos. Procedimientos comúnmente realizadas en cajas Petri y/o pozos de cultivo, donde los contratiempos más recurrentes son la transdiferenciación de las células, falsos positivos o falsos negativos en pruebas de fármacos por ejemplo, e incluso rechazo inmune. Estas son respuestas provocadas principalmente porque las células han sido expuestas a un ambiente distinto a su microambiente de origen, forzandolas a adaptarse a estas nuevas condiciones que modifican sus funciones y características. Y aunque pueden ser analizadas y se les pueden realizar un sin fin de pruebas, dejaron de ser las células que se deseaban estudiar en un inicio, manifestando respuestas distintas a las esperadas.

Para investigar cómo se modifica el comportamiento celular, distintas plataformas se están desarrollando por distintos grupos a nivel mundial [6]. Estas plataformas buscan imitar el microambiente celular y evitar la transdiferenciación.

1.1.1. Microambiente celular

Desde la publicación en 1912 de la primera técnica de aislamiento y crecimiento de células *in vitro* [7], se han desarrollado un sinnúmero de métodos distintos con el mismo fin: preservar las células fuera de su ambiente natural. Sin embargo, el microambiente en el que se encuentran inmersas las células *in vivo* es complejo y difícil de imitar con las técnicas tradicionales de cultivo; en las que se emplean sustratos de material sintético.

Definimos al microambiente como al conjunto de condiciones físicas, químicas y biológicas en la vecindad de las células dentro de una distancia donde estas pueden tener un

efecto sobre o ser percibidas por las células. El microambiente proporciona a las células una arquitectura física, estimulación mecánica por parte de fluidos y sólidos, señales adhesivas, factores de crecimiento, nutrientes e interacciones célula-célula, figura 1-1 [8].

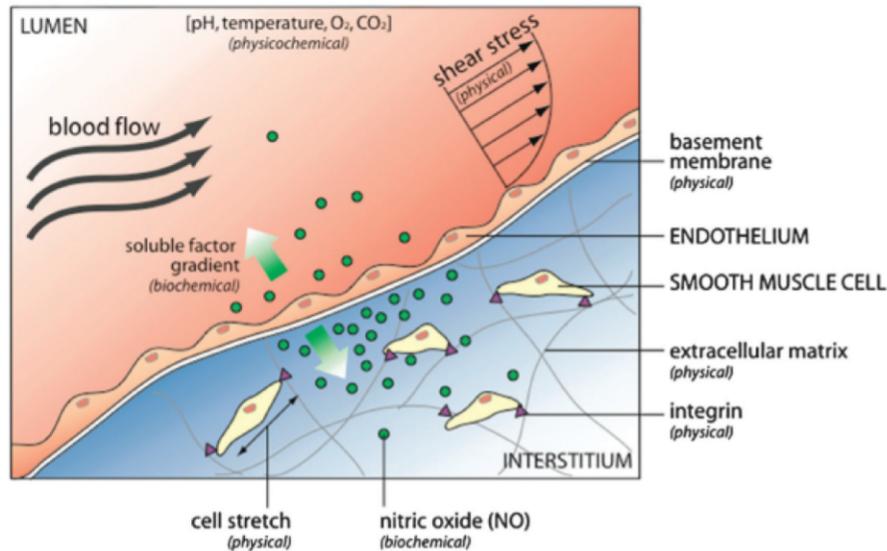


Figura 1-1: Microambiente celular, tomado de [8]

Más específicamente, este microambiente está compuesto por una mezcla de proteínas de matriz extracelular, factores protéicos, proteoglicanos, tejido mineralizado, ligandos y diversos tipos celulares adyacentes, además de poseer un pH, temperatura, concentración de oxígeno y otros gases particulares. Todos estos elementos que conforman el microambiente varían en el espacio y tiempo debido a la deformación material, al flujo, reacciones químicas, proliferación celular, diferenciación, muerte o migración, entre otras circunstancias que son constantemente percibidas por las células, las cuales, procesan la información recibida a través de señales de transducción y asimilan algún comportamiento celular determinando su destino y adaptándose a los estímulos recibidos [9] [10].

1.1.2. Cultivo Celular

El cultivo celular se ha convertido en una parte integral y de suma importancia en investigación biológica básica y aplicada. La mayor parte del conocimiento actual proviene de experimentos con células cultivadas *in vitro*. Sin embargo, con estas técnicas es imposible imitar el microambiente celular, que ya ha sido descrito su importancia para

las células. Es por ello que nuevos métodos se están desarrollando para poder solventar estas carencias, esfuerzos multi y transdisciplinarios se llevan a cabo para mejorar e innovar en la investigación biomédica [11].

In vitro el microambiente químico es suplantado por el medio de cultivo, una solución acuosa que contiene una mezcla de aminoácidos esenciales, vitaminas, sales, carbohidratos entre otros componentes entre los cuales destacan los factores de crecimiento y hormonas. Las propiedades fisicoquímicas del cultivo como el pH y la osmolaridad se miden al inicio del experimento y se espera no se modifiquen durante éste, la temperatura y niveles de CO₂ son monitoreados y controlados normalmente desde la incubadora al igual que la concentración de oxígeno.

En cuanto al entorno físico, la mayoría de los cultivos son realizados en superficies planas bidimensionales fabricadas en plásticos, en la mayoría de los casos poliestireno como las ya mencionadas cajas Petri y placas de cultivo. Para ciertas células es necesario realizar un recubrimiento de matriz extracelular, la cual promueve la adhesión, crecimiento y proliferación, factores ausentes en las cajas de cultivo.

A pesar de contar con estos elementos en muchos cultivos las células sufren una inevitable transdiferenciación, es decir, cambian de fenotipo adaptándose a su nuevo “*vitro-ambiente*”. Principalmente las células primarias (células extraídas del organismo vivo).

1.2. Andamios celulares

Para solventar las dificultades que presenta el cultivo tradicional se crearon los llamados *andamios celulares*, estructuras tridimensionales, generalmente hechas de materiales poliméricos, que imitan la compleja estructura, o al menos las características claves, de los tejidos vivos. En general podemos decir que un andamio deberá sustituir las funciones de la matriz extracelular (MEC) donde habitan las células [12].

La matriz extracelular provee soporte estructural y un entorno físico donde las células residentes en el tejido puedan adherirse, crecer, proliferar, migrar y responder a las señales. Además, da al tejido su estructura y por ende sus propiedades mecánicas, como la rigidez y elasticidad. Se ha observado, por ejemplo, que una matriz rígida favorece la fibrosis [13][14] [15]. También suministra activamente señales bioactivas a las células que contiene para la regulación de sus actividades. Pudiendo actuar como reservorio de factores de crecimiento y potenciar sus bioactividades. Por último, la MEC provee de un entorno físico degradable para permitir la neovascularización, la remodelación en res-

puesta al desarrollo y problemas fisiológicos y patológicos durante los procesos dinámicos del tejido, denominados morfogénesis, homeostasis y cicatrización, respectivamente [16].

Como se advierte, imitar en un andamio sintético el andamio natural es bastante complicado. Es por ello que tres opciones de andamio se han desarrollado [12] [17]:

Andamios naturales de matriz extracelular

Basados en la descelularización de tejidos y órganos. Considerado el andamio ideal debido a su estructura, propiedades mecánicas y bioquímicas similar a la de los tejidos *in vivo*. Sin embargo, el proceso de obtención necesita cuidados y habilidades especiales para obtenerlo íntegro. Además, su calidad depende del organismo de donde fue extraído, variando en composición y estructura de uno a otro.

Andamios de biomateriales naturales

Consisten en el uso de materiales derivados de la MEC como colágena, alginato, quitosán y matrigel. Estas sustancias tienen la ventaja de contener señales químicas necesarias para promover la morfogénesis y otras funciones celulares. Su extracción conlleva un menor tiempo y dificultad comparado con los andamios de matriz extracelular. Sin embargo, el método de obtención es corrosivo, a causa de que se utilizan detergentes y solventes para purificarla, provocando inconsistencias en su calidad y composición química. Aunado a su indefinida procedencia. Esto limita sus aplicaciones y puede complicar la interpretación de datos.

Andamios de biomateriales sintéticos

Los biomateriales sintéticos tienen la ventaja de fabricarse con procesos que permiten controlar su composición, estructuración y propiedades físicas. La desventaja es la falta de componentes bio-estructurales y agentes bioquímicos específicos de la MEC que favorecen aproximarse al biomimetismo. De manera que los biomateriales sintéticos necesitan ser funcionalizados y/o recubiertos con dominios bioactivos, como proteínas y péptidos extraídos de la MEC entre otras señales biológicas.

1.2.1. Requerimientos de un andamio

La selección del material para construir un andamio es crucial. Actualmente se puede encontrar una gran variedad de materiales y técnicas para construir un andamio, aunque

hay que tener en consideración ciertos criterios para elegir el método y material más acertado [2] [12]:

Biocompatibilidad

El primer criterio a considerar es la biocompatibilidad del material. Las células deben adherirse y realizar sus funciones, idealmente, sobre toda la superficie del andamio. Por lo que de no ser biocompatible el material se provocará necrosis celular, evitando la sobrevivencia de las células.

Para evitar la muerte celular y aumentar la adhesión con el sustrato; algunos andamios se recubren con otra sustancia, como la colágena, y de esta forma aumenta la compatibilidad y afinidad del cultivo a la superficie [2].

Biodegradabilidad

La biodegradabilidad es un componente que se torna relevante cuando se considera implantar el andamio en el organismo, ya que uno de los objetivos en ingeniería de tejidos es que con el tiempo las células injertadas en el andamio reemplacen la estructura de este, permitiendo a las células producir su propia matriz extracelular y generar un tejido funcional idéntico al encontrado *in vivo* al degradar el sintético. Con este proceso se obtiene un reemplazo completamente natural y evita el rechazo inmune del organismo. En otras aplicaciones, como investigación básica, no suele ser un problema la no degradabilidad del andamio, puesto que en general los estudios se realizan fuera de algún individuo o por un periodo corto [2].

Propiedades mecánicas

Estrictamente, el andamio deberá tener propiedades mecánicas consistentes con el sitio anatómico de donde pertenecen *in vivo* las células a cultivar, tales como rigidez, elasticidad, esfuerzos mecánicos y hemodinámicos. Sin embargo, lograr las propiedades idóneas es aún uno de los grandes retos en ingeniería de tejidos [2].

Estudios recientes sobre mecanobiología han demostrado la importancia de las propiedades mecánicas de un andamio para que las células se desarrollen adecuadamente [18] [13].

Estas investigaciones demuestran que las células son capaces de sensar la rigidez del sustrato, mostrando disfunciones morfológicas y de adhesión al ser cultivadas sobre

sustratos muy rígidos. Esta mecanosensibilidad también se ha mostrado y usado en la diferenciación de células mesenquimales, para producir distintos tipos celulares.

Otra parte importante de la mecánica celular es la presencia de un microflujo en su entorno, la hemodinámica. Este punto ha sido un punto clave en el desarrollo de andamios a la fecha [19] [20] [21]. En estas plataformas se ha observado como es que las células interactúan con fuerzas debidas al flujo o por su ausencia. Además esta interacción conlleva un cambio de fenotipo celular, asemejándose más al encontrado *in vivo* cuando se estimula con microflujos.

Arquitectura

Cada órgano conserva una estructura y organización celular característica que facilita realicen sus funciones. La arquitectura de los dispositivos usados como andamios celulares contempla esta disposición celular en el diseño de la geometría y dimensiones de los conductos y reservorios que formarán el *chip*, las cuales deben ser apropiadas para favorecer una organización correcta así como una adhesión celular favorable. A la vez de tener en cuenta elementos importantes como la vascularización del chip y componentes adicionales como el cocultivo [2].

1.3. Plataformas Microfluídicas

Los seres vivos contienen en gran parte sistemas microfluídicos por naturaleza, por ejemplo, el sistema vascular y la microvasculatura, los alveolos pulmonares, los sinusoides hepáticos, entre otras estructuras microfluídicas dinámicas, presentes en otros órganos, importantes para la homeostasis celular y que son tejidos que nos interesan particularmente [22]. Las plataformas microfluídicas son diseñadas para imitar estos tipos de microambientes fisiológicos de los seres vivos en dispositivos artificiales para su estudio [23]. Mientras que en un cultivo tradicional, el volumen del medio de cultivo, del orden de mililitros, es considerablemente mayor comparado con el volumen de las células que solo se encuentran adheridas al fondo de la caja, del orden de microlitros. En contraste, fisiológicamente la situación es inversa, existe una alta densidad de células en los tejidos que ocupa la mayor cantidad de volumen y el fluido solo circunda las células. Esta proporción de volúmenes puede ser lograda sólo con dispositivos microfluídicos [24].

La microfluídica ofrece diversas ventajas en comparación con los sistemas de análisis macroscópicos. La principal es tener las proporciones fisiológicas adecuadas. Otra ventaja importante es que debido a su tamaño el volumen de fluido necesario para trabajar es

mínimo, lo que implica menos cantidad de reactivos y muestras biológicas, pero también de residuos. Además, estos volúmenes tan pequeños de medio facilitan la formación de gradientes químicos generados por las mismas células debido a su actividad celular, gradientes observados *in vivo* [25].

Además, por el tamaño de las plataformas microfluídicas la precisión en la manipulación y análisis de la muestra aumenta [26]. Uno de los factores que permite esta manipulación es el flujo laminar que caracteriza estos dispositivos, con lo que se logra controlar la concentración y otras condiciones de las reacciones. Por lo tanto se puede reducir el tiempo de síntesis y análisis de las muestras.

La microfluídica ha solventado de esta manera requerimientos básicos para cultivo celular como los que se muestran en la Tabla 1-1. Sin embargo, también tiene desventajas, como por ejemplo, las pequeñas muestras de las que disponen en el dispositivo, pueden no representar la condición promedio de donde fueron tomados. [27] [28].

Requerimientos	Cultivo celular convencional	Plataformas de cultivo microfluídico
Control de temperatura	Grandes cantidades de medio previniendo cambios rápidos	Pequeñas cantidades de volumen permiten un control dinámico
Control de pH y gases		
Adición de nutrientes	Infrecuente, cambio de gran volumen de medio manualmente	Medición precisa, cambio de medio continuo y transitorio.
Traslado de metabolitos		
Estimulación y monitoreo simultáneo	Normalmente no factible	Factible
Arreglos multicelulares	No factible	Alta capacidad para cocultivos
Automatización	Voluminoso, costoso	Compacto y barato
Manipulación unicelular	Poco preciso	Preciso y eficiente

Tabla 1-1: Requerimientos básicos para cultivo celular y mejoras cuando sistemas microfluídicos son usados.

1.4. Plataformas de cultivo celular

En conclusión, la plataforma de cultivo idónea requiere de muchos factores. No obstante, son tres parámetros generales los que podemos modificar, y en los que se incluyen los requerimientos principales para la construcción de un andamio celular que nos permita estudiar de manera más efectiva a las células *in vitro*: microfluídica, geometría-estructura y selección del material de fabricación. En estos parámetros se contemplan otros estímulos biológicos y químicos, como modificación superficial, adición de factores de crecimiento, entre otros. Adicionalmente se pueden incorporar micro electrodos para el monitoreo de la muestra, figura 1-2.

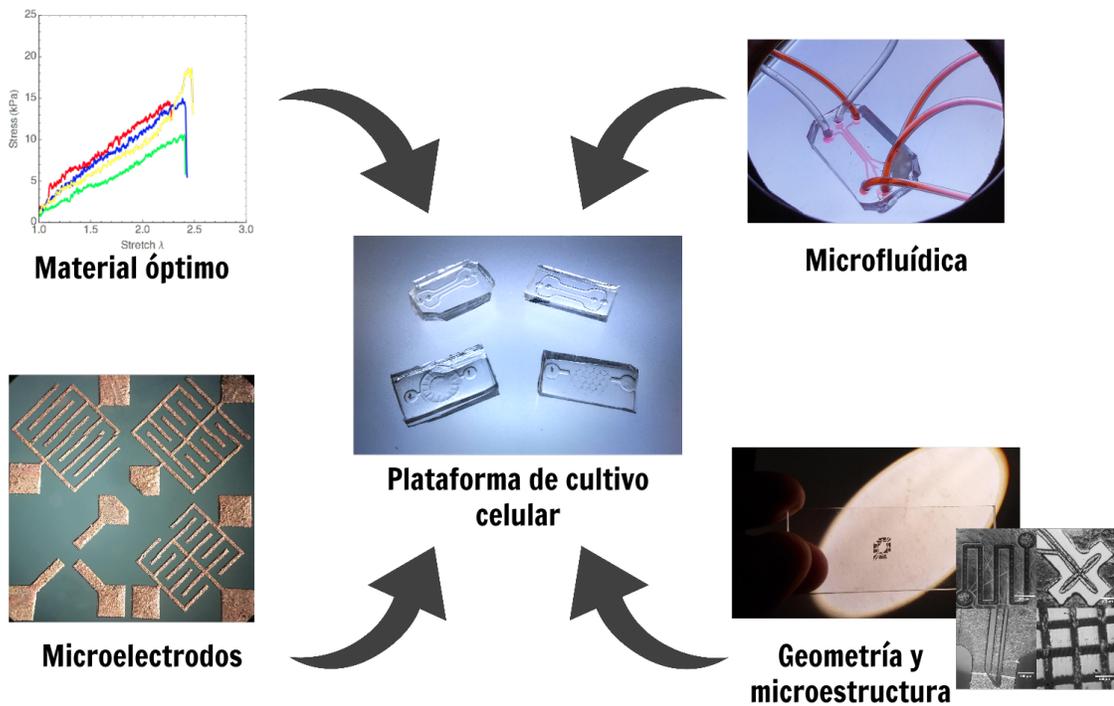


Figura 1-2: Requerimientos de una plataforma de cultivo celular.

1.5. Estado del arte

Trabajos recientes en ingeniería de tejidos se han basado en herramientas de microfabricación emergentes para imitar alguna de las partes del complejo microambiente celular, en particular del microambiente hepático [29], ideando modelos *in vitro* 2D y

2.5D ¹. Estos arquetipos simulan parte de la fisiología e histología hepática a través de estructuras compuestas.

Los primeros diseños de plataformas se basan en la técnica de impresión por microcontacto (μ CP microcontact printing [30]). Método que permite la creación de patrones bioquímicos a escala micro-nanométrica. Con este procedimiento se llevan a cabo cocultivos al realizar matrices con materiales sintéticos, como capas polielectrolíticas de poliestireno sulfonato [31], figura 1-3 A , y materiales naturales como colágena [32], figura 1-3 B, e incluso se pueden combinar [33]. Lo que permite sembrar hepatocitos junto con fibroblastos o células endoteliales y células de Kupffer de forma delimitada y específica [34]. En los tres casos anteriores se ha concluido la eficiencia de los cocultivos, ya que se observó un aumento en las funciones nativas de los hepatocitos y también un mayor tiempo en el que las mantenían viables las células en estos experimentos. A diferencia de los cultivos tradicionales donde la viabilidad celular se pierde en cuestión de horas, con estas técnicas se ha logrado mantener viables las células hasta semanas [5].

Los esferoides es otro método para estudiar los hepatocitos en cocultivos *in vitro*. Consiste en inducir la unión entre las células impidiendo se adhieran al sustrato, induciendo e imitando la interacción célula-célula presente en todos los conjuntos celulares [35]. Normalmente se producen por una mezcla de células sembradas sobre una superficie superhidrofóbica.

Últimamente se han hecho estudios sobre el efecto de señales paracrinas que recibe el hígado, señales provenientes por ejemplo de las células estelares sobre los hepatocitos. Con el uso de la microfluídica es posible el transporte de estas señales dentro de un *chip* [36] manteniendo comunicadas las células solamente por estas señales, figura 1-3 C. Demostrando que este tipo de señalización provee de un beneficio funcional y estructural esencial para los esferoides hepáticos, igualmente mostraron que el flujo fomenta la formación y mantenimiento por un período más largo de los esferoides [20].

En la misma dirección, sistemas más complejos han sido elaborados basados en técnicas litográficas de microfabricación. Nakao et al. fabricaron una plataforma microfluídica en la que buscaron imitar un cordón hepático junto con la barrera endotelial natural de los sinusoides. Utilizando una microestructura fabricada en resina fotopolimerizable SU-8 y replicada en PDMS [37] [4], figura 1-4 A, exhibiendo la polarización de los hepatocitos y la formación del canalículo biliar. Aunado a esto, empleando un diseño similar, han presentado la importancia de esta barrera endotelial, encargada de regular la presión hemostática en el sinusoides [38], figura 1-4 B.

¹La denominación de las dimensiones se explica en la sección 3.5.

Por último, para estudiar la interacción célula-célula y su orientación respecto a su entorno, polarización celular, se ha hecho uso de arreglos de microelectrodos para formar una trampa dielectroforica, produciendo un campo radial que induce la alineación de los hepatocitos en esta geometría, igual que en el lobulillo hepático [39], figura 1-4 C.

Investigaciones similares a las mostradas, han permitido avances importantes para el estudio, diagnóstico y tratamientos de enfermedades en otros órganos, creando modelos *in vitro*, denominados “organ-on-a-chip”, que asemejan las funciones de sistemas como los pulmones, páncreas, riñón y cerebro [40] [41] [42]. El hígado es el órgano más complicado, ya que además de sus funciones, estructura y microambiente a imitar, las células hepáticas son muy sensibles a cambios en su entorno.

El objetivo último del LaNSBioDyT es agrupar varias de estas técnicas, especializadas en una parte del todo, en una única plataforma de cultivo celular y poder desarrollar un andamio más acorde a la estructura *in vivo* del hígado. Puesto que la búsqueda de un microtejido *in vitro* bidimensional, cuyos componentes celulares organizados imiten la estructura y función natural del hígado es el inicio y la base para el desarrollo de andamios celulares tridimensionales y el principio del hígado artificial, beneficio para miles de personas con deficiencias hepáticas en espera de un trasplante.

En este capítulo introductorio se ha mostrado las necesidades y limitaciones que se tienen al realizar cultivos celulares, así como las nuevas alternativas que han surgido a partir de la ingeniería de tejidos. Un panorama general del estado del arte nos permite divisar los parámetros que se deben considerar al fabricar andamios celulares. En los siguientes capítulos se mostrará un protocolo de fabricación para andamios celulares que podrán incluir microflujo para favorecer o retrasar la no transdiferenciación celular, combinando andamios estructurados para estudios específicos.

En el capítulo dos, se expone una breve introducción a la física de la microfluídica, en el cual se ilustran las propiedades físicas principales que sobresalen a microescala y que también se deben tener presentes en el diseño de la plataforma. En el capítulo 3 se describen las técnicas de microfabricación disponibles en el LaNSBioDyT y utilizadas en la realización de las plataformas prototipo de esta tesis.

Finalmente en la sección de resultados se presenta en primer instancia el protocolo para elaborar plataformas de cultivo con microflujo con los recursos de este laboratorio, desde el diseño hasta su ensamble, considerando la creación de el molde con las distintas técnicas previamente presentadas. Para por último mostrar la validación de este protocolo con un estudio de caso para cultivo de células hepáticas.

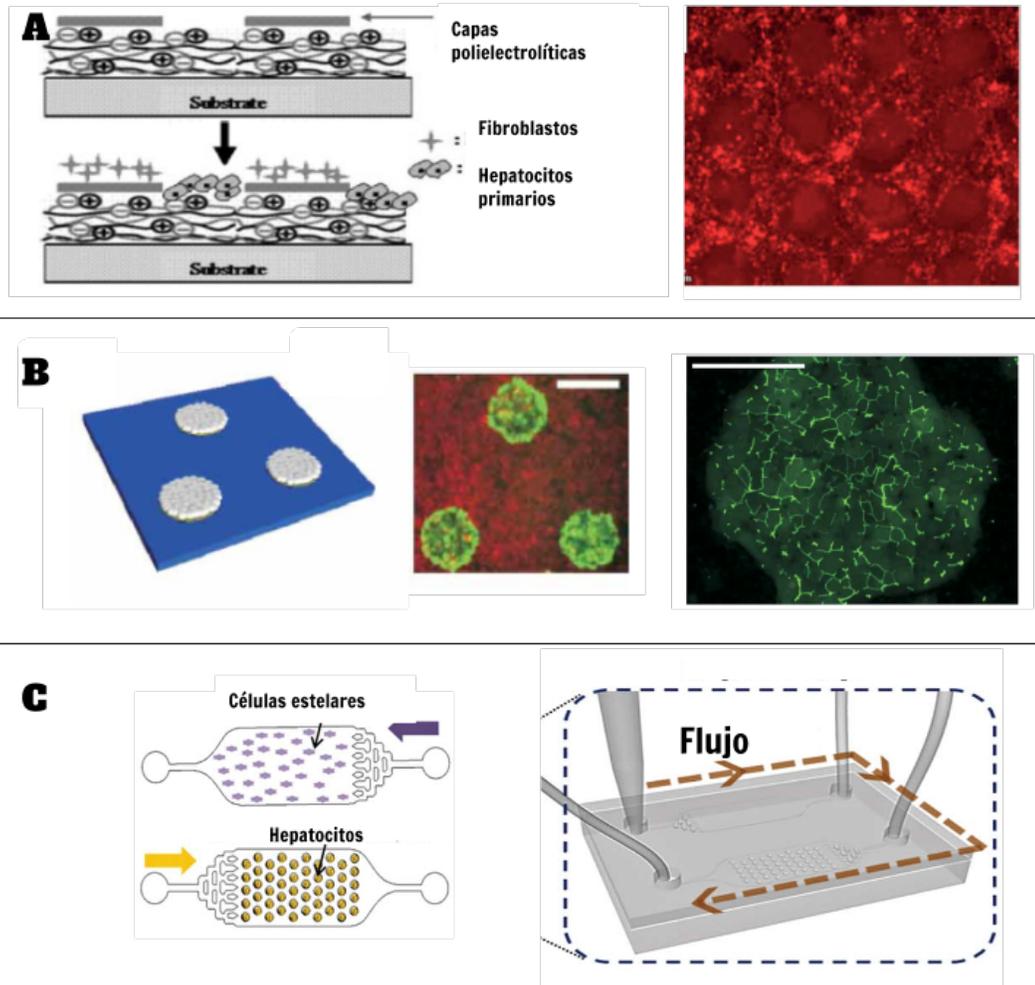


Figura 1-3: A) Plataforma de cultivo hecha por microcontact printing de capas polielectrolíticas con patrones cuadrados de cocultivo de hepatocitos, zonas brillantes, y fibroblastos. B) Plataforma de cultivo hecha por microcontact printing de colágena con patrones circulares de hepatocitos, zonas verdes, rodeadas de fibroblastos. Mostrando la formación de canalículos biliares. C) Plataforma microfluídica para cocultivo celular de esferoides de hepatocitos y células estelares. Modificado de [31], [32] [36].

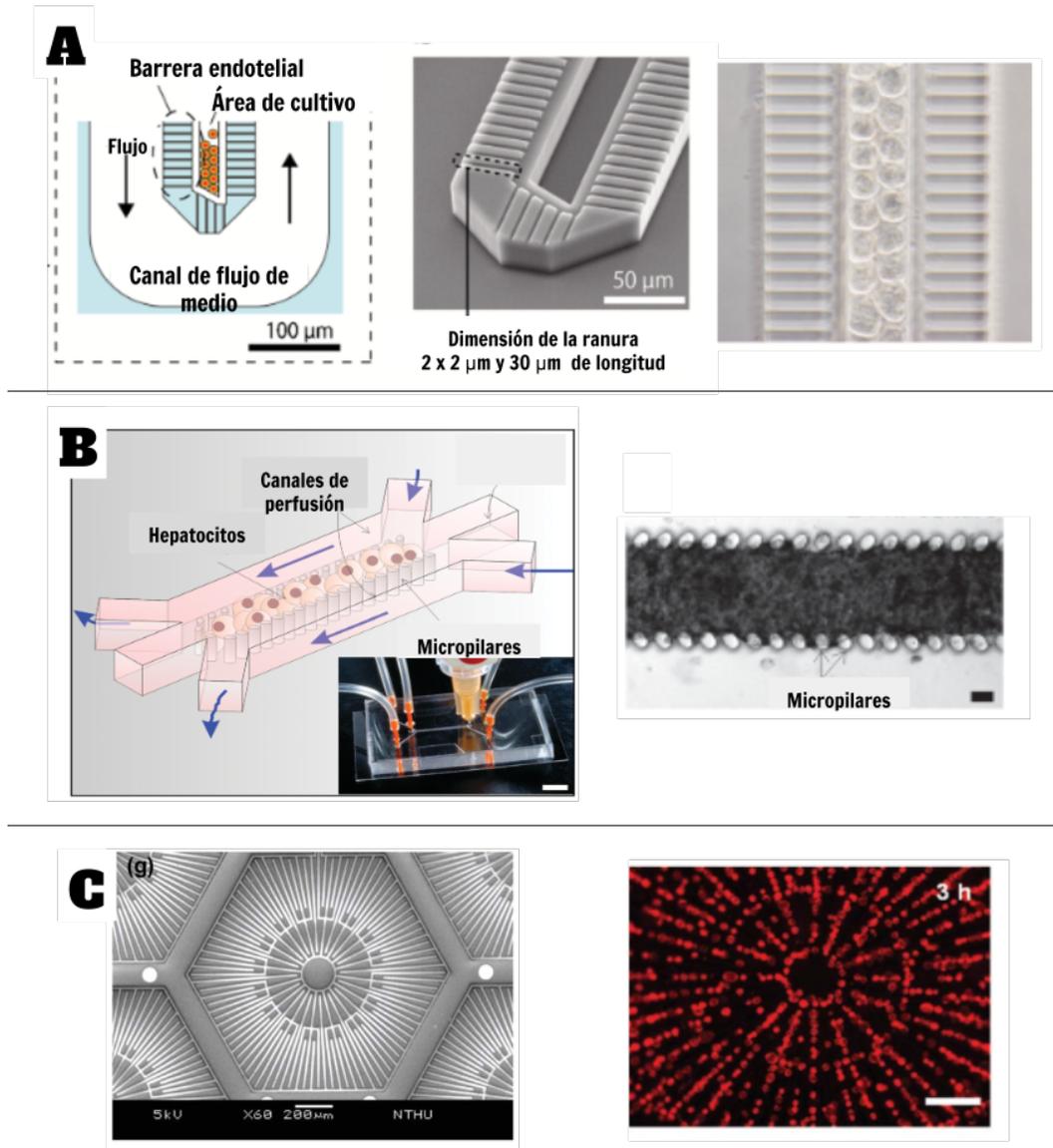


Figura 1-4: A)Plataforma de cultivo celular realizada por fotolitografía. En esta estructura se pretende imitar el sinusoides hepático, donde el canal central sirve como reservorio de hepatocitos y el circundante provee de nutrientes y otros factores a las células a través de las fenestraciones por donde se perfunde el medio de cultivo. B) Andamio celular para estudiar el efecto hemodinámico del flujo sobre células hepáticas C)Arreglo de microelectrodos orientados de tal manera que inducen a las células situarse radialmente. Modificado de [4], [38], [39].

Capítulo 2

Microfluídica

La microfluídica es una rama de estudio emergente que por causa de sus propiedades físicas tiene el potencial de aportar un enfoque distinto de investigación debido a su capacidad de miniaturización y manipulación, cualidades importantes en áreas como biología y medicina[43]. Los dispositivos microfluídicos ofrecen la capacidad de trabajar con volúmenes pequeños de reactivos, tiempos cortos de reacción y proceso, también da la posibilidad de realizar múltiples experimentos y análisis en paralelo en dispositivos portátiles y de bajo costo. Éstos incluso prometen la integración de un laboratorio entero en un chip (dispositivos Lab-on-a-Chip, LoC) [44] [45]. Pero además de las ventajas de la miniaturización, el gran potencial de la microfluídica recae en la física a microescala. La microfluídica permite llevar a cabo técnicas y experimentos que a nivel macro no son posibles, como la creación de gradientes, la manipulación unicelular y el biomimetismo hemodinámico. Siendo una nueva y útil herramienta que permite explorar otro tipo de efectos y problemas [22].

Si bien, el campo de la microfluídica no es una disciplina nueva, fue hasta hace algunos años que comenzó a desarrollarse en diversas aplicaciones. Hoy en día es una rama de la ciencia que se encuentra en constante crecimiento. Tanto que en los últimos años el número de artículos que hacen referencia a la “*microfluídica*” ha aumentado el triple en menos de diez años, figura 2-1. La microfluídica es relevante en diversas aplicaciones, como la síntesis química, biosensores (análisis biológicos y clínicos), pruebas de fármacos, ciencia básica, andamios celulares y en un gran número de aplicaciones nuevas [46] [47], por lo que su estudio y desarrollo es de interés para diversas áreas [23].

Un resumen de la física de la microfluídica es presentado a continuación.

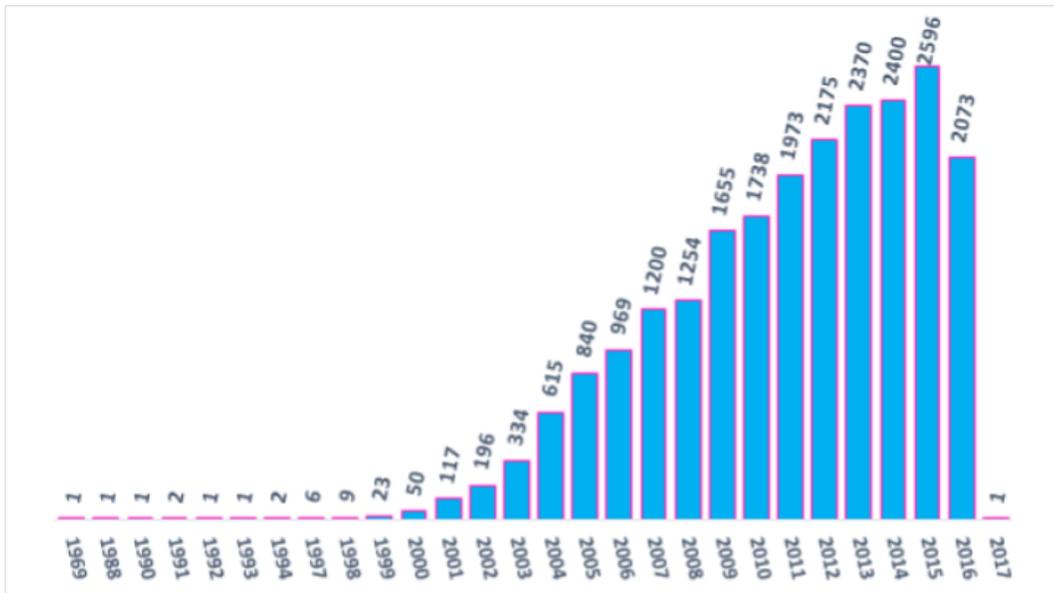


Figura 2-1: Evolución en la cantidad de artículos que mencionan “microfluidic” en la base PubMed. (Septiembre 2016)

2.1. La física de la microfluídica

Se define como microfluídica a la manipulación y análisis de fluidos en estructuras micrométricas, 1-1000 micras, es decir, la manipulación de volúmenes de fluidos desde 1×10^{-15} hasta 1×10^{-6} litros, figura 2-2. Y definimos un fluido como “una sustancia que se deforma continuamente bajo la aplicación de un esfuerzo cortante (tangencial), sin importar que tan pequeño es éste” [48], figura 2-3.

A microescala otros efectos surgen como predominantes, fuerzas diferentes a las que estamos acostumbrados en la vida diaria se hacen evidentes, fuerzas como de cohesión, adhesión y viscosidad. Que dan origen a efectos como el flujo laminar, difusión, resistencia hidráulica, razón área superficial- volumen, tensión superficial y capilaridad [49–53].

2.1.1. Número de Reynolds

El número de Reynolds (Re) es un número adimensional que relaciona la razón entre las fuerzas inerciales y las de viscosidad. Más particularmente, es la razón entre el trabajo gastado en la aceleración y la energía disipada por fricción. Además describe el régimen en el que se encuentra el flujo, laminar o turbulento, tabla 2-1. El número de Reynolds puede ser calculado como:

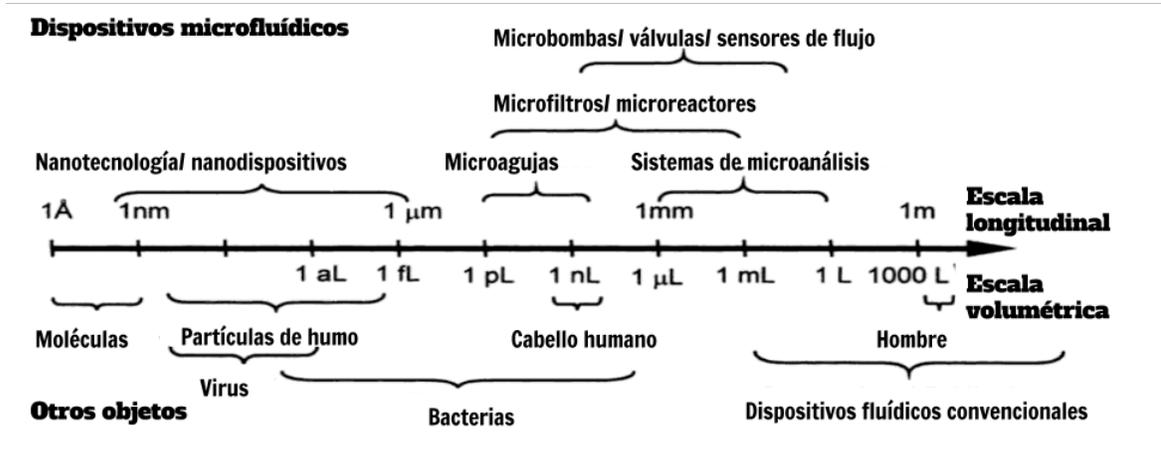


Figura 2-2: Contextualización de la microescala.

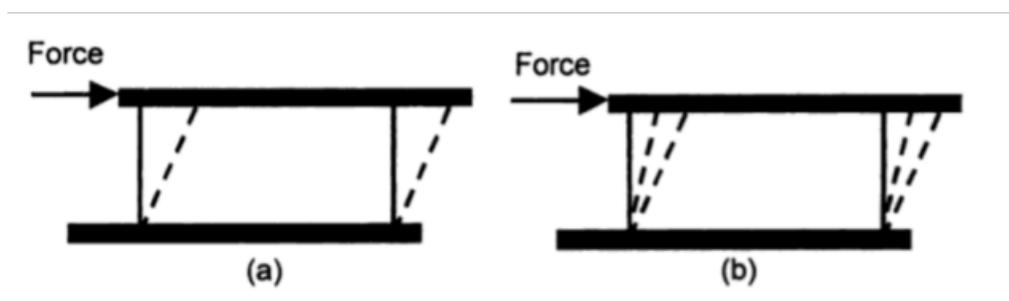


Figura 2-3: En un Sólido si se le aplica una fuerza tangencial este se deformara desde su posición de equilibrio a una segunda posición, y cuando se deje de aplicar la fuerza, y siempre que no sobrepase el límite elástico del sólido, este regresará a su posición inicial. Mientras que para un fluido si se le aplica una fuerza este llegará a una segunda posición de nuevo equilibrio y si se le aplica aún más esfuerzo seguirá deformándose. Aún cuando se deje de aplicar el esfuerzo este quedará en una nueva posición de equilibrio. [48]

$$Re = \frac{\rho \nu D_h}{\mu} \quad (2-1)$$

Donde ρ es la densidad del fluido, ν es la velocidad característica del fluido, μ es la viscosidad dinámica del fluido, y D_h es el diámetro hidráulico o longitud característica, el cual depende de la sección transversal de canal.

Si $Re < 2300$, indica que el flujo es laminar. Si se acerca a 2300 el flujo comenzará a mostrar signos de turbulencia y si es mayor a 2300 el flujo es considerado turbulento, es decir, es caótico e impredecible, siendo imposible saber la posición de una partícula en el

fluido a través del tiempo.

Flujo Laminar		Flujo Turbulento
$Re < 1$ (Régimen de Stokes)	$1 < Re < 2300$	$Re > 2300$
- No convección lateral	- Convección lateral comienza a incrementar de manera considerable	- Amplificación de las perturbaciones
- Efectos inerciales despreciables		- Rizado en las líneas de flujo
- No fusión de capas adyacentes		- Campo de velocidad impredecible en el tiempo

Tabla 2-1: Regímenes del flujo según el número de Reynolds.

Por ejemplo, si consideramos las propiedades del agua, de densidad $\rho = 1000 \text{Kg/m}^3$, $\mu = 0.001 \text{Ns/m}^2$ y una velocidad de flujo nominal de 1cm/s , rango en el que se encuentra típicamente la velocidad del fluido en un microcanal, entonces se obtendrá $Re = 10$ para un canal de dimensión característica de 1mm . La transición a un flujo turbulento en un canal sucede alrededor de $Re = 2300$. Entonces, podemos observar que en la mayoría de los microflujos se encuentran en el régimen laminar. El número de Reynolds es muy bajo en un gran número de las aplicaciones microfluídicas, colocando el flujo en el régimen de Stokes, donde los efectos inerciales son despreciables. En estos flujos laminares, efectos como la separación y la turbulencia son ausentes.

2.1.2. Longitud característica

La longitud característica de un canal es el diámetro para un canal circular y puede ser generalizado denominado diámetro hidráulico para canales de sección transversal no circulares como:

$$D_h = \frac{4A}{P_w} \quad (2-2)$$

Donde A es el área de la sección transversal del canal y P_w es el perímetro mojado. En la expresión se puede observar que D_h se reduce al diámetro para una sección transversal circular.

2.1.3. Flujo Laminar

El término de flujo laminar se debe a la apariencia de las líneas de flujo en el fluido, organizadas en capas (láminas) manteniendo su relación con las capas adyacentes a través del flujo, figura 2-4. En contraste con un flujo turbulento caracterizado por fluctuaciones de velocidad espaciales y temporales.

En un flujo laminar la velocidad y posición de una partícula en la corriente del fluido no es una función aleatoria dependiente del tiempo.

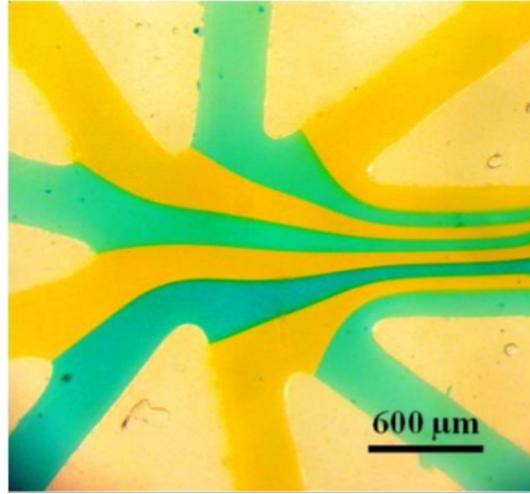


Figura 2-4: Ejemplo de flujo laminar.

2.1.4. Difusión

La difusión es el proceso por el cual un grupo de partículas concentradas en un volumen se propagan debido a su movimiento Browniano en un determinado tiempo. Esto ocurre principalmente por su energía térmica. La difusión puede ser modelada en una dimensión como:

$$d^2 = 2Dt \quad (2-3)$$

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (2-4)$$

Donde d es la distancia promedio que una partícula recorre en un tiempo t , y D es el coeficiente de difusión de la partícula en el medio que la contiene; k es la constante de Boltzmann, $1.38 \times 10^{-23} JK^{-1}$, T la temperatura, η la viscosidad del fluido y r el

radio hidrodinámico de la partícula. D es aproximadamente $10^{-5}cm/s$ para una partícula pequeña en un cuarto a temperatura ambiente.

A microescala, este proceso no es despreciable y se tiene que evaluar. Por ejemplo, la hemoglobina tiene un coeficiente de difusión $D = 7 \times 10^{-7}cm^2s^{-1}$, entonces en agua le toma 10^6 segundos difundirse $1cm$, pero solamente 1 segundo difundirse 10 micras. Por lo tanto en un canal de $1cm$ no es tan importante la difusión, sin embargo en un canal microfluídico es de suma importancia considerar sus efectos. Incluso se puede tomar ventaja de ello, debido al tiempo tan corto que toma la difusión, los microcanales pueden ser utilizados para crear gradientes de concentración con distintas características, figura 2-5.

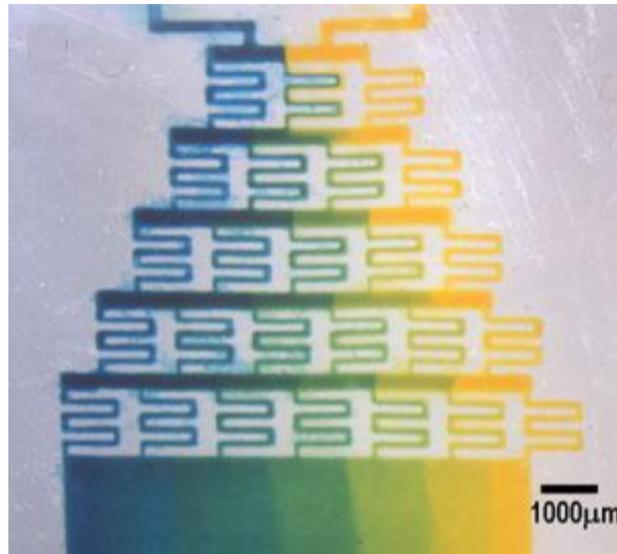


Figura 2-5: Ejemplo de gradientes de concentración en un microcanal [54]

2.1.5. Caída de presión

La ley de Poiseuille nos permite determinar la tasa de flujo en un líquido incompresible, laminar estacionario y uniformemente viscoso, así como la caída de presión. La ley de Poiseuille se escribe como:

$$\Delta P = \frac{8\mu QL}{\pi r^4} \quad (2-5)$$

Donde ΔP es la caída de presión, Q es la tasa de flujo volumétrico, L la longitud del canal, μ es la viscosidad dinámica y r el radio. De esta ecuación es notable que para un

flujo laminar en un canal la caída de presión es directamente proporcional a la velocidad de flujo pero inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud característica. Por lo que para un canal pequeño, la caída de presión aumentará rápidamente. Esto es uno de los principales problemas al introducir un fluido en un microcanal. Además se define la resistencia fluídica como:

$$R = \frac{8\mu\Delta x}{\pi r^4} \quad (2-6)$$

$$R = \frac{12\mu L}{wh^3} \quad (2-7)$$

Donde x es la distancia en dirección del flujo en un canal circular, μ la viscosidad dinámica, w el ancho y h el alto del canal ($w \gg h$ o $w \ll h$).

2.1.6. Capilaridad

La tensión superficial es el resultado de las fuerzas de cohesión entre las moléculas del líquido en la interfaz de este con otro medio. Dependen únicamente de la naturaleza del líquido. Con ellas compiten las fuerzas de adhesión entre el líquido y el sólido con el que está en contacto, dependiendo esta última de la naturaleza de ambos materiales. La relación entre estas fuerzas determina la forma de la superficie libre del líquido en las proximidades de la pared, figura 2-6 A , caracterizado por el ángulo de contacto θ que forma la superficie sólida con la tangente a la superficie líquida en el punto de contacto, pasando por el líquido, figura 2-6 B y C. Un ángulo de contacto menor a 90° indica una superficie hidrofílica, mientras que un ángulo de contacto mayor a 90° representa una superficie hidrofóbica.

Debido a las dimensiones tan pequeñas en los sistemas microfluídicos donde las fuerzas superficiales tienden a dominar sobre las fuerzas volumétricas, la capilaridad puede ser un efecto importante a microescala, así como la caída de presión que es su contraparte. El flujo capilar, que es el movimiento de un fluido debido a la tensión superficial, puede ser utilizado como bombeo en algún dispositivo microfluídico. Si el capilar tiene un radio interno r , al realizar el balance de fuerzas entre las fuerzas inerciales, la fuerza de fricción y la fuerza de tensión se obtiene el avance del fluido, figura 2-7, dado por la ecuación de Washburn:

$$x = \sqrt{\frac{\gamma \cos\theta}{2\mu r} t} \quad (2-8)$$

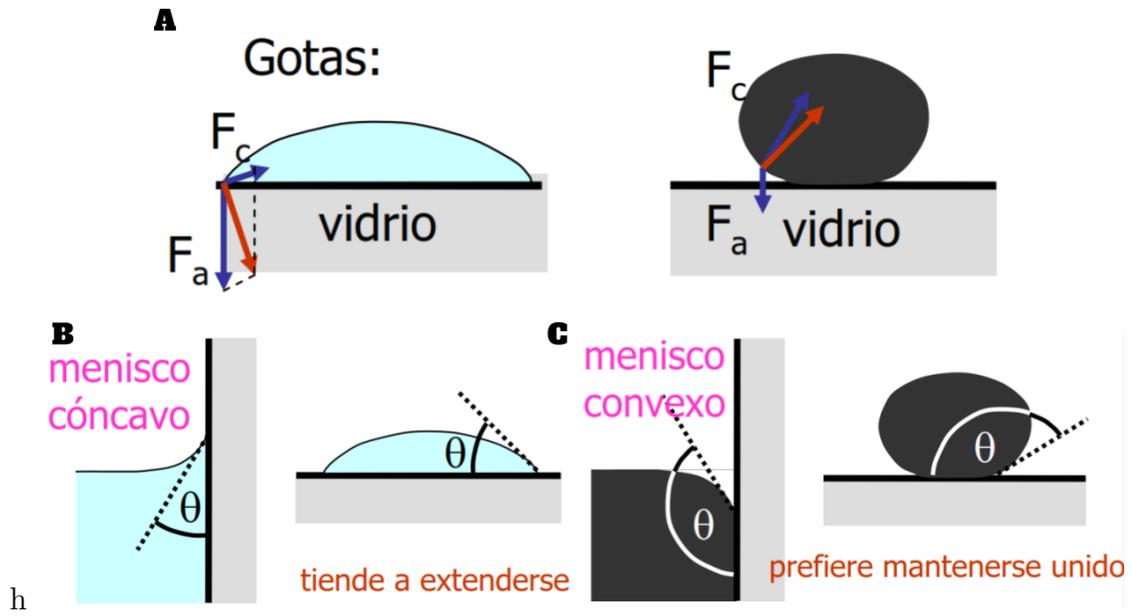


Figura 2-6: Efecto de la fuerza de cohesión y adhesión. A) La resultante entre estas fuerzas determinan la forma de la gota. B) Superficie hidrofílica ($\theta < 90^\circ$) C) superficie hidrofóbica ($\theta > 90^\circ$).

Con γ el coeficiente de tensión superficial, θ el ángulo de contacto, μ la viscosidad dinámica y t el tiempo.

Las propiedades físicas mostradas son propiedades que se deben de tener muy en cuenta al diseñar y fabricar los dispositivos microfluídicos. En particular propiedades como la caída de presión, que es uno de los factores que dificulta el manejo de microflujos y aunque no se pueda excluir cuanto más reducimos las dimensiones del canal, incluso aumenta, se deben de tener presentes las herramientas con las que se puede ha-

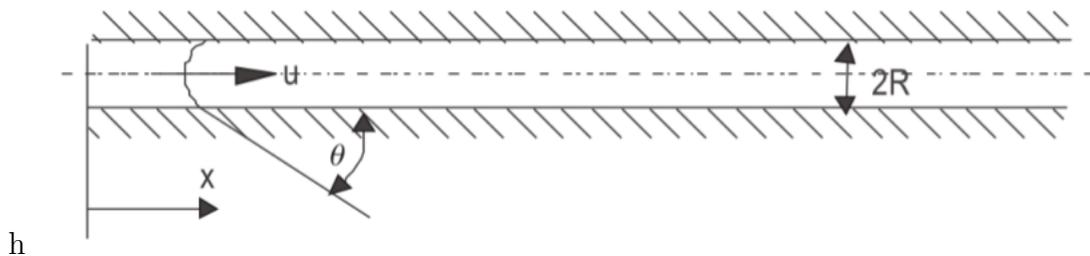


Figura 2-7: Flujo capilar en un canal horizontal.

cer frente, como bombas de presión o peristálticas de potencia suficiente. Por otro lado hay propiedades que pueden beneficiar a los dispositivos microfluídicos, como la capilaridad, pero que depende del material del dispositivo y del fluido, y en particular a las plataformas de cultivo celular como el flujo laminar y la difusión, el primero que es la cualidad más sobresaliente de trabajar a estas escalas y que adjudica a los dispositivos microfluídicos la mayoría de sus atributos y capacidades de manipulación, y el segundo que permite reproducir condiciones biológicas como gradientes y difusión de nutrientes. Estas características aunadas a las expuestas en el capítulo anterior, son las que hacen a las plataformas microfluídicas una formidable e interesante herramienta para el cultivo celular.

Capítulo 3

Métodos de fabricación de chips microfluídicos

La microfabricación tiene sus orígenes como base para el desarrollo de la microelectrónica, principalmente en la producción de dispositivos informáticos como procesadores y memorias digitales. Sin embargo, su aplicación en otras áreas distintas a la microelectrónica se ha ampliado en los últimos años. Y es que la miniaturización de los elementos permite la integración y portabilidad de una gran cantidad de dispositivos en un espacio o volumen reducido como las plataformas LoC. Dispositivos donde se ha logrado incorporar una o varias funciones propias de un laboratorio en un chip, de dimensiones que van desde algunos milímetros hasta unos pocos centímetros. Como ya se ha mencionado, la ventaja de contar con microdispositivos se encuentra en la reducción de tiempo de análisis, costo, volumen de muestra y reactivo, entre otros, sección 1.3.

Aunque la técnica de microfabricación más conocida es la fotolitografía, existen otros procedimientos, incluso, algunos que han sido desarrollados dentro del grupo de microfabricación de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Un resumen de los métodos de microfabricación utilizados en esta tesis se presenta en este capítulo.

3.1. Elaboración de plataformas con microflujo

En la construcción de chips microfluídicos, objetivo del presente trabajo, podemos dividir el proceso de fabricación en tres partes principales, que darán como resultado final el chip, figura 3-1:

1. Fabricación de micromolde.

2. Fabricación del canal, (réplica de micromolde).
3. Ensamble, fabricación del chip sellado.

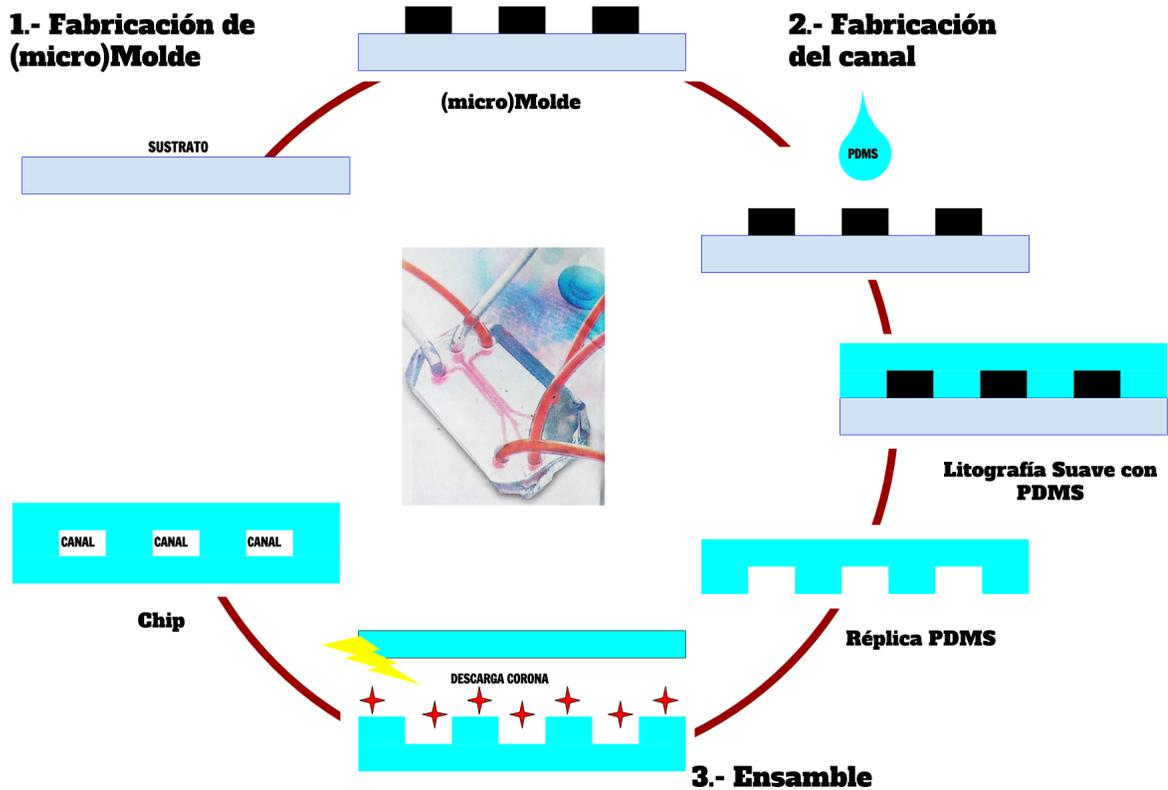


Figura 3-1: Proceso de elaboración de plataformas con microflujo.

El molde es una estructura maestra donde se modela el diseño a utilizar en el dispositivo microfluídico, en general son estructuras tridimensionales sobre o en sustratos rígidos planos. Sin embargo, por los materiales y procesos empleados en su fabricación no es posible utilizar estos moldes como andamios directos, ya que no son compatibles con procedimientos biológicos, es por esto que se necesita duplicar el andamio en otro material que sea biocompatible, como algunos polímeros con los que es posible replicar el molde. Esta réplica será la base del andamio y es importante que sea una copia idéntica de nuestro molde, para asegurar su funcionamiento deseado, en ocasiones se pueden tener estructuras sub micrométricas. Por último, el ensamblado del chip permitirá contener los componentes de la plataforma y generar microflujos.

3.2. Fabricación del micromolde

Cuatro técnicas de fabricación para los moldes de las estructuras microfluídicas están disponibles en el grupo de microfabricación de la Facultad de Ciencias de la UNAM, de las cuales dos son las más utilizadas en la rama de la microfabricación en general y las últimas dos se presentan como opciones alternativas que además de ser de bajo costo, son versátiles, a la medida y al alcance de cualquier laboratorio, pero sobre todo funcionales:

3.2.1. Fotolitografía

La fotolitografía es la técnica de micro y nanofabricación más utilizada, debido a la madurez de esta tecnología, principalmente para aplicaciones en grandes volúmenes. El principio físico en el que se basa consiste en exponer de manera selectiva una resina fotosensible, SU8 es la resina más utilizada, a través de una máscara que contiene zonas transparentes y opacas a la luz, creando de esta manera el patrón deseado. El proceso se puede dividir en tres pasos, figura 3-2:

Preparación: Consiste en la deposición de la resina sobre el sustrato. Según el alto de nuestro patrón se coloca la cantidad de resina y se esparce por medio de *spin coating*.

Exposición: Consta en la exposición a luz ultravioleta de la resina, transfiriendo los patrones a la fotoresina, cambiando las propiedades físicoquímicas del área expuesta. La longitud de onda utilizada depende de la resina utilizada. Es importante cuidar particularmente la alineación de la máscara y el sustrato recubierto de la resina, ajustando la distancia entre estos para asegurar una buena transferencia de los patrones a la resina, sin perjudicar la resolución.

Revelado: Es la remoción de la resina expuesta (resina negativa) o no expuesta (resina positiva) a través de la máscara con el patrón utilizando una solución reveladora.

La resolución del grabado final depende de la longitud de onda, la distancia entre la máscara y capa de resina, el tiempo y potencia de exposición, el espesor de la capa y la resina utilizada. Aunque se pueden obtener estructuras hasta del orden nanométrico, tiene la desventaja de ser un método costoso, puesto que requiere una fuerte inversión en infraestructura, mantenimiento y material. Por lo tanto, es una técnica que es aplicada a

producción de grandes volúmenes de chips. Últimamente, se han producido equipos de fotolitografía menos costoso para resolución menor utilizando leds, equipos de fotolitografía sin máscara que pueden operar con láseres enfocados y que trazan los patrones a grabar o equipos con máscaras virtuales proyectadas por microespejos con láser que podrían ser otra opción para la fabricación en aplicaciones modulares de prototipado rápido o único.

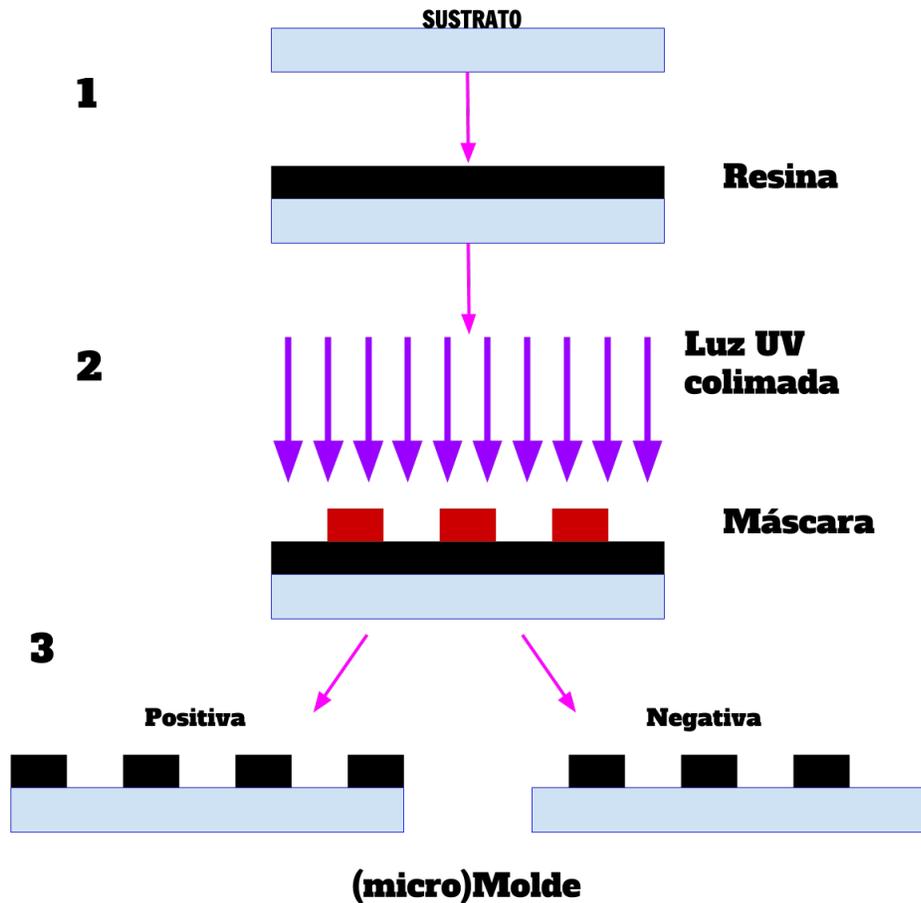


Figura 3-2: Proceso de fotolitografía. 1 preparación, 2 exposición y 3 revelado.

3.2.2. Polimerización por doble fotón

Es en este proceso de microestereolitografía en el que está basado el funcionamiento del equipo Photonic Professional GT de Nanoscribe GmbH del LaNSBioDyT en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Para “*imprimir*” la estructura utiliza un láser infrarrojo de 780 nm de longitud de onda, con pulsos de femtosegundos , que provee una potencia máxima

de 80 mW y una duración de pulso de 120 fs a 80 MHz [55]. El láser es enfocado por un objetivo de microscopio de 25x ó 63x en el interior de una gota de un polímero fotosensible sobre un sustrato de vidrio como un microscopio confocal, figura 3-3 A. El punto de enfoque, llamado *voxel* y que en realidad tiene una forma elipsoidal tridimensional, tiene una resolución del orden de cientos de nanómetros o menos dependiendo de la potencia del láser [56].

El proceso de polimerización por doble fotón, 2PP por sus siglas en inglés, está basado en la multiabsorción fotónica. Se ha demostrado que un átomo puede absorber dos o más fotones simultáneamente, permitiendo la transición electrónica a estados que no podría alcanzar con la absorción de solo un fotón. La absorción de dos fotones (2PA) es mediada por un estado virtual que tiene un tiempo de vida muy corto, algunos femtosegundos. Es por ello que la doble absorción es posible solamente si un segundo fotón es absorbido antes del decaimiento del estado virtual, figura 3-3 B. Además, para llevar a cabo el proceso de doble absorción se añaden fotoiniciadores al polímero, moléculas que tienen una energía de disociación baja, haciendo dicho polímero más fotosensible. La absorción de un fotón UV, o en este caso de dos fotones IR, por los fotoiniciadores conduce a la disociación de enlaces y a la formación de radicales altamente reactivos que reaccionan con los monómeros e inician una polimerización localizada.

La ventaja de este método en comparación con la polimerización por luz láser UV, es que la mayoría de las resinas son fotosensibles a esta longitud de onda y pasivas al infrarrojo. Por lo que la radiación láser UV induce la fotopolimerización con la absorción de un solo fotón, incluso si se enfocara dentro de la resina la superficie también sería polimerizada, permitiendo producir solamente patrones bidimensionales con volumen o moldes de dimensión 2.5D. Mientras que al ser transparente al infrarrojo, es posible crear estructuras tridimensionales desplazando el voxel en la trayectoria deseada dentro de la resina, figura 3-3 A y C.

Al igual que la fotolitografía, podemos dividir el proceso en tres pasos: preparación, grabado y revelado. Una ventaja del Photonic Professional GT es que sus resinas se revelan con solventes menos tóxicos que el SU8.

3.2.3. Shrinky Dinks

Los métodos anteriores son técnicas de fabricación muy precisas, sin embargo, su aplicación requiere de herramientas específicas como es el uso de un cuarto limpio, que no se encuentran disponibles para muchos laboratorios e incluso son procedimientos costosos por el material y la inversión que requieren. Es por ello que nuevos métodos de micro-

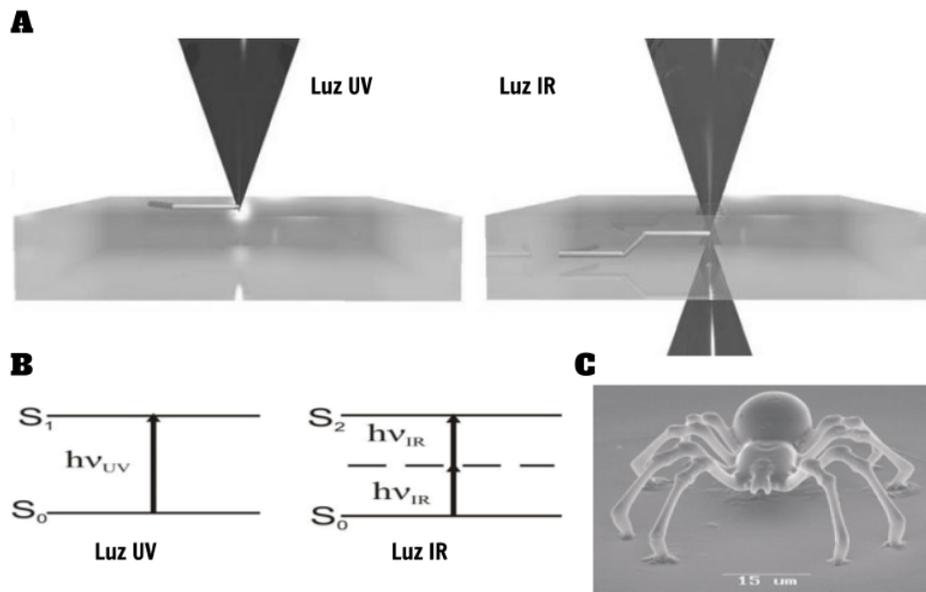


Figura 3-3: Polimerización por doble fotón. A) diferencia entre la estereolitografía con luz UV e infrarroja. B) Esquema de absorción de fotones. C) Ejemplo de grabado 3D. Modificado de [57]

fabricación se han desarrollado como alternativas. La impresión sobre acetatos es uno de estos procedimientos alternativos. No requiere de equipo y material costoso. En esta técnica se aprovecha el relieve de la impresión como micromolde.

Los Shrinky Dinks, figura 3-4 A , son hojas termoplásticas de poliestireno, creados en 1973 y popularizados en los 80s como juguetes para niños. Tienen la peculiaridad de que al ser calentados a una cierta temperatura se encogen en el plano reduciendo su tamaño considerablemente. Gracias al trabajo precursor de Michelle Khine, se ha estandarizado su uso para micromolde [54].

La forma de crear microcanales en Shrinky Dinks es imprimiendo en las hojas el diseño deseado; posteriormente se calienta en un horno de convección común y al reducirse obtendremos un molde que tendrá como relieve las guías del diseño impreso. Según las pruebas que se realizaron durante la elaboración de esta tesis, el termoplástico se reduce en promedio un 61 % de su tamaño original, figura 3-4 B.

La ventaja de utilizar esta herramienta radica en la facilidad con la que se puede realizar los moldes a la medida para una gran variedad de sistemas microfluídicos, utilizando únicamente una impresora y un horno de convección y el proceso se puede realizar

en un tiempo muy corto, posibilitando hacer muchas pruebas. Sin embargo, al ser una herramienta “casera” la repetibilidad de los canales es limitada. Además la resolución final y rugosidad de los canales dependerá estrechamente de la calidad de impresión.

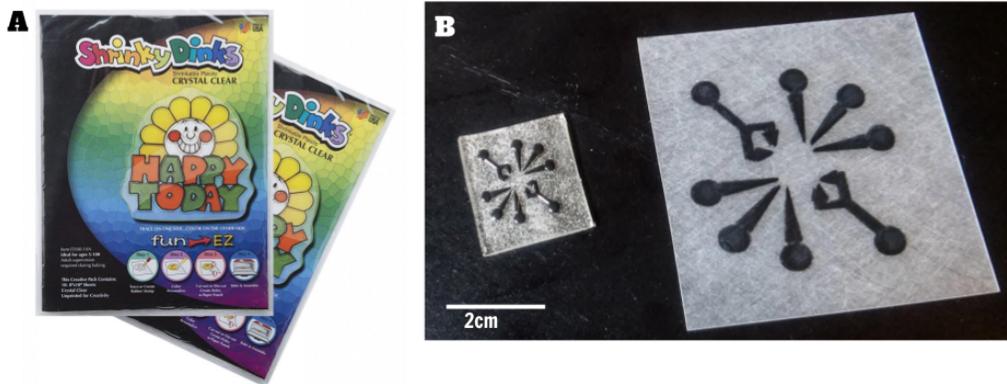


Figura 3-4: A) El termoplástico. B) Shrinky Dinks después y antes de introducir al horno.

3.2.4. Ablación láser

La ablación láser es una técnica en la que un rayo láser es enfocado en una superficie para remover material localmente. La cantidad de material removido depende de la densidad de energía, pero sobre toda de la densidad de potencia, es decir, la energía depositada en un instante, la cual debe de estar por encima del umbral de ablación correspondiente a la energía mínima necesaria para que se produzca un cambio en la superficie del sustrato. Cuando esta condición se cumple los fotones son absorbidos por el material en una área igual al spot del láser, entre más enfocado el láser más densidad energética, y como consecuencia aumenta la temperatura de esta porción. Los fotones absorbidos provocan la ruptura de una gran cantidad de enlaces covalentes en un periodo corto de tiempo, induciendo un cambio de volumen y de fase, este cambio de fase proyecta fragmentos de clusters atómicos hasta fragmentos del polímero. Este material eyectado está vibracional, rotacional y traslacionalmente excitado, tal que si la densidad de potencia es suficientemente alta se producirá un plasma en la superficie del material. Se ha observado que las velocidades de eyección alcanzan hasta 1000 m/s [58] [59].

Es conocido que los mecanismos que rigen la ablación son distintos según el tipo de material del que se trate, es por ello que en ocasiones se le añade otros elementos a la superficie del material que propician la absorción fotónica y por ende la ablación láser. En nuestro proceso se recubre la superficie con nanocarbón ya que los sustratos

utilizados son de materiales transparentes, como acrílico y otros polímeros como el PDMS [60]. En general, en aplicaciones biológicas es de suma importancia que el sustrato sea transparente para poder llevar a cabo observaciones en el microscopio.

Aunque la resolución que se puede obtener con esta técnica es de micras, tiene la desventaja de crear un grabado cuya rugosidad es notable, que puede ir desde 1 hasta 4 micras [61] y que dificultan el ensamble del dispositivo. Sin embargo, sigue siendo mejor que la que obtenemos con los moldes de Shrinky Dinks.

3.2.5. Otras técnicas de fabricación

Cabe mencionar que, básicamente, debido a la técnica de litografía suave de molde-réplica con el uso de polímeros elásticos, presentada más adelante, fundamental para la elaboración de las plataformas microfluídicas, se pueden fabricar moldes con métodos rústicos, es decir, es posible replicar cualquier molde de dimensión 2.5D de cualquier material. [62].

Micro alambre

Esta es una técnica poco utilizada pero que puede ser una herramienta conveniente en aplicaciones modulares, dado que ofrece flexibilidad en el desarrollo de prototipos únicos y con estructuras con organización tridimensional en un sólo paso [63] [64] [65]. Y aunque es un método muy económico y cuyos canales finales son muy uniformes en tamaño y disposición, tiene el inconveniente de ser complicado de manipular, limitando la creación de geometrías complejas, en especial para cultivo celular. Sin embargo, es posible combinar con otras técnicas, como el Shrinky, ablación láser o incluso con polimerización de doble fotón, con los que se pueden realizar los fragmentos más detallados y precisos del diseño de la plataforma.

El método se basa en el uso de “*microtubos*”, como hilo de nylon o alambres metálicos con los que podemos disponer de grosores desde 40 hasta 1000 micras de diámetro homogéneo (depende de la calidad de los alambres seleccionados). El procedimiento consiste en montar estos alambres en algún contenedor que permita ordenarlos espacialmente, y replicar el arreglo tridimensional diseñado. Al extraer el hilo del polímero en bulto se logra tener canales cilíndricos u otra geometría dependiendo del tipo de alambre que se emplee, figura 3-5, en los que se pueden realizar gran variedad de experimentos, e incluso como conexiones a otras estructuras.

En muchas ocasiones el alambre o hilo se adhiere fuertemente al polímero, se ha

reportado [63] que una manera de desprender el alambre es colocar el bloque de PDMS en una alberca de algún solvente provocando que PDMS se hinche al absorberlo. No obstante, el uso de solventes no es lo más adecuado cuando de aplicaciones biológicas se trata, ya que moléculas de estos solventes son pueden ser absorbidas por el PDMS [66], perjudiciales para las células. Una alternativa es usar algún líquido inerte como agua para hinchar el PDMS, la desventaja de realizarlo de este modo, es que el tiempo de hinchado es más largo. Otra alternativa de retirar el hilo, y la que se emplea en el laboratorio, es halando de estos lentamente. Empleando esta opción, puede que el hilo se fragmente dentro del bulto de PDMS, imposibilitando su extracción.

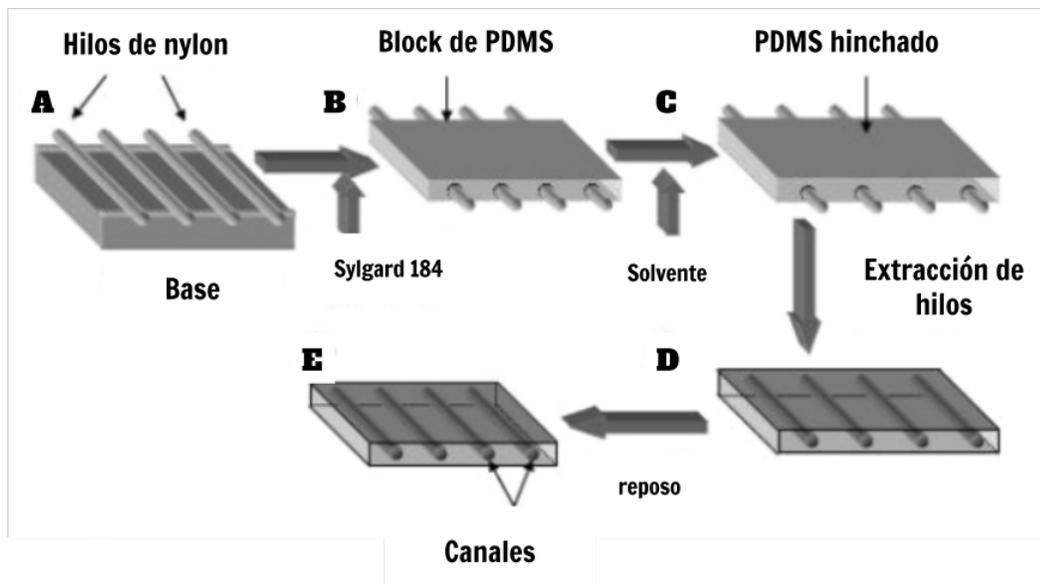


Figura 3-5: Método de fabricación por micro-alambre. Modificado de [63].

3.3. Fabricación del canal

La segunda etapa de la fabricación de la plataforma consta de la elaboración de lo que serán nuestro sistema microfluídico y sitios de cultivo celular. La necesidad de fabricar el canal a partir de la réplica del molde, recae en los procesos y materiales utilizados para las técnicas de fabricación presentadas, las cuales no son compatibles con procedimientos biológicos. En la réplica es posible utilizar otros tipos de materiales biocompatibles y adecuados para el cultivo celular, como los utilizados en litografía suave.

3.3.1. Litografía suave

La litografía suave se refiere a una tecnología catálogo de una serie de técnicas para la fabricación y/o réplica de ciertos patrones prefabricados en un molde con microestructuración, que serán parte del chip [67], entre las que se encuentran :

- Impresión por microcontacto (*μ CP microcontact printing*)
- Molde- réplica (*REM replica molding*)
- Moldeo por microtransferencia (*μ TM microtransfer molding*)
- Moldeo por capilaridad (*MIMIC micromolding in capillaries*)
- Moldeo asistido por solventes (*SAMIM solvent-assisted micromolding*)

Se les conoce como litografía suave porque en su proceso de fabricación se emplean solventes de microestructuración, ataque y depósito menos agresivos fisico-químicamente que los procesos comunes de la microelectrónica basados en fotolitografía, anteriores a la litografía suave. En cada caso se utiliza un estampado o molde polimérico a base de moléculas orgánicas y materiales menos rígidos de los usados en procesos litográficos comunes. Además, de la ausencia de ácidos fuertes para su fabricación.

Las ventajas de este tipo de técnicas son muchas, como lo es la producción rápida y sistemática de prototipos a partir de un molde. Además requiere poca inversión de capital en material y equipo, y en muchos casos no es necesario trabajar en un cuarto limpio para su manejo. Todas estas características, permitieron poner esta técnica al alcance de varios laboratorios de distinta líneas de investigaciones no especializadas en microfabricación. Otro factor importante son los materiales posibles a emplear, mucho más accesibles a todos y con una mayor gama de propiedades útiles en otros tipos de aplicación como en biología y medicina, ofreciendo por ejemplo, propiedades necesarias en biotecnología como la biocompatibilidad y biodegradabilidad. Materiales como el PDMS, PMMA, macromoléculas biológicas, polímeros conductores, etc pueden ahora emplearse en microfabricación gracias a esta tecnología.

Para la fabricación del tipo de canal que nos interesa aquí, empleamos el método REM.

REM (REplica-Molding)

El principio en el que se basa el método de molde-réplica, consiste en duplicar la información topológica de un molde maestro prefabricado con la estructura o los patro-

nes de interés. En el molde donde se encuentra la estructura, se vacía un prepolímero normalmente líquido o semilíquido, para después inducir su polimerización de distintas formas, según el tipo de molde. Una vez polimerizado el polímero vertido, es posible separar ambas partes si el polímero seleccionado es flexible para obtener un duplicado negativo al molde, figura 3-6. Según el material utilizado se puede obtener réplicas cuya fidelidad alcance los nanómetros, como es el ejemplo del PDMS, material que usamos en este trabajo.

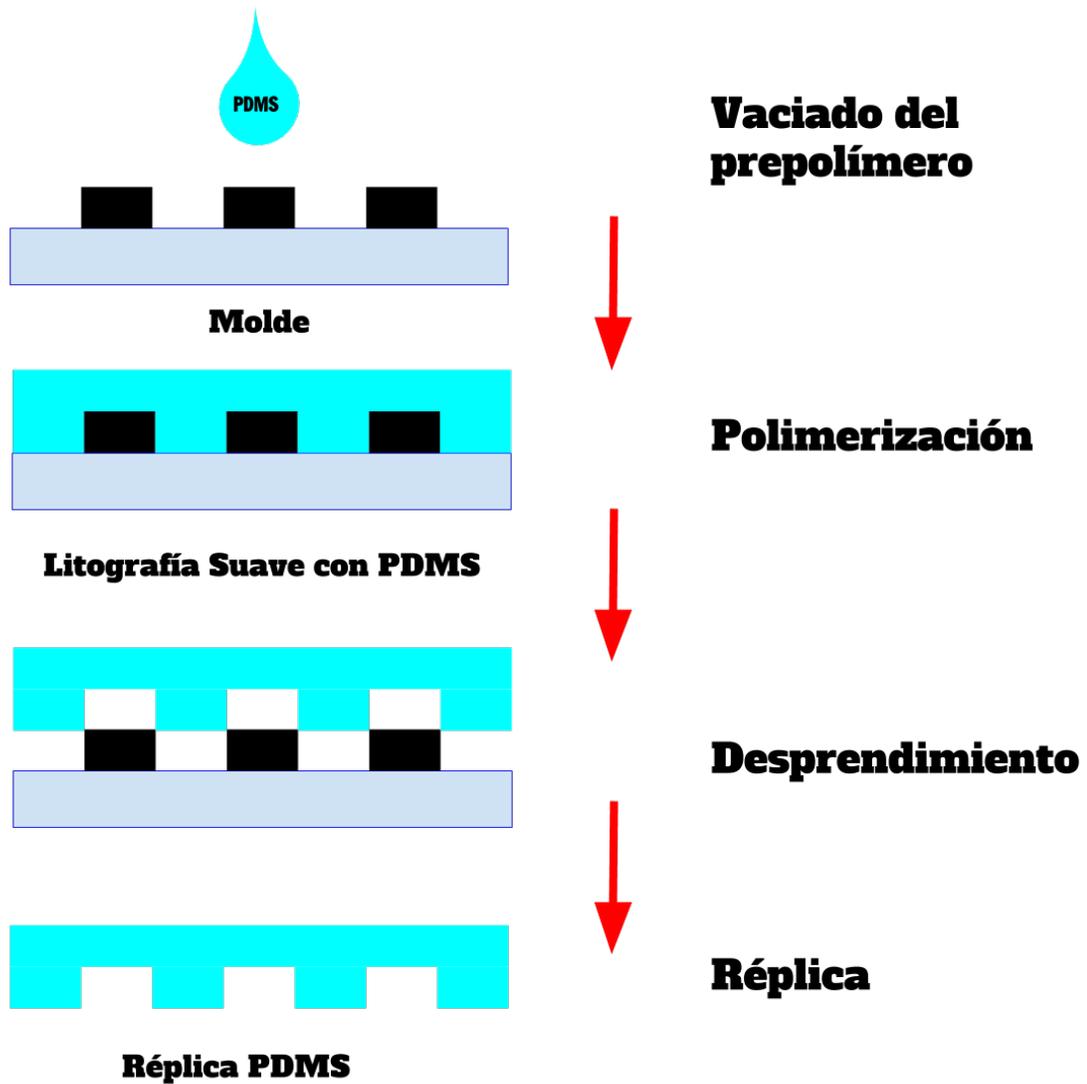


Figura 3-6: Proceso de litografía suave molde-réplica.

3.3.2. PDMS

El poli(dimetilsiloxano) mejor conocido como PDMS, es un polímero orgánico basado en silicio, usado en una gran cantidad de aplicaciones biomédicas como implantes, catéteres y lentes de contacto. Recientemente su uso ha tenido un auge en la fabricación de chips microfluídicos con aplicaciones analíticas. Este auge se debe a sus propiedades particulares entre las que destacan la sencillez en su manejo y fabricación, su capacidad de replicar estructuras nanométricas, transparente en el UV-visible (importante para la visualización, especialmente por microscopía para cultivo celular) no auto fluoresce, es inerte químicamente, presenta conductividad eléctrica, polaridad y elasticidad bajas, es estable térmicamente y mal conductor de calor, tiene baja toxicidad y es permeable a gases como el oxígeno y el dióxido de carbono. Además de ser biocompatible, aunque no biodegradable, y su costo de fabricación es bajo comparado con otros materiales como el vidrio o silicio. Es por ello que utilizamos este material para la fabricación de dispositivos para cultivo celular [68].

La fórmula química del PDMS está descrita como $\text{CH}_3[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, figura 3-7, donde n es el número de unidades monoméricas: $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$. El más utilizado en investigación es el PDMS Sylgard 184 de Dow Corning Corporation, el cual consta de dos partes, el prepolímero y el agente curante, los cuales pueden ser mezclados en distintas proporciones en peso para modificar propiedades físicas como su rigidez e índice de refracción [61].

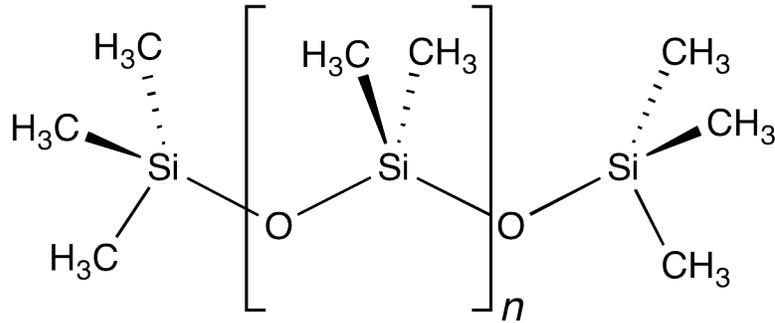


Figura 3-7: Estructura del PDMS.

3.3.3. Preparación del molde para réplica

Para llevar a cabo el proceso de molde réplica con PDMS, en muchas ocasiones es necesario, según la afinidad del sustrato al polímero, llevar un proceso de silanización que

permita la separación de la réplica sin maltratar al molde.

La silanización es un proceso en el cual la superficie es recubierta con moléculas organofuncionales alcoxisilanas, que contienen un radical alcoxil unido a un silicio, a través de un proceso de autoensamblaje mediante la deposición química por vapor ó inmersión del silano. Para que este proceso se lleve a cabo es necesario que la superficie pueda oxidarse, debido a que la reacción se lleva entre los grupos hidroxilo de la superficie oxidada y los radicales alcoxil creando enlaces covalentes entre la superficie y silanos a través del silicio, figura 3-8.

La consecuencia de la silanización es el aumento de la hidrofobicidad superficial, reduciendo la adherencia entre el PDMS y el sustrato. Incluso, este proceso nos permite obtener réplicas de PDMS a partir de un molde de PDMS, es decir, una doble réplica [69].

Cuando se lleva a cabo este proceso hay que tomar las medidas adecuadas, trabajar con protección y en una campana de extracción, ya que los residuos de la reacción y el silano en sí son nocivos a la salud.

3.4. Ensamblaje

Finalmente, dado que del proceso de molde réplica, en la mayoría de los casos obtenemos canales no confinados, condición necesaria para el control y manipulación del fluido y evitar se derrame, para cual se precisa de una tapa que limite los canales previamente realizados. Esta tapa puede ser de materiales como vidrio y PDMS. Para unir la tapa con la réplica previamente realizada existen varios procesos probados entre los que se encuentran:

3.4.1. Tratamiento por plasma

Esta técnica nos permite unir un bloque de PDMS a un sustrato de vidrio o de PDMS a través de la oxidación superficial por plasma producido en la descarga corona de una bobina tesla [70]. El plasma es un estado de la materia donde las moléculas se encuentran altamente energizadas e ionizadas, esta excitación es producida por el flujo de electrones, provenientes de la punta de la bobina, a través de un medio gaseoso. Este flujo produce la ionización de átomos presentes en el aire así como la ruptura de enlaces covalentes, principalmente de oxígeno diatómico, produciendo ozono, molécula inestable y un potente oxidante. El plasma también interactúa con la superficie del polímero, provocando el

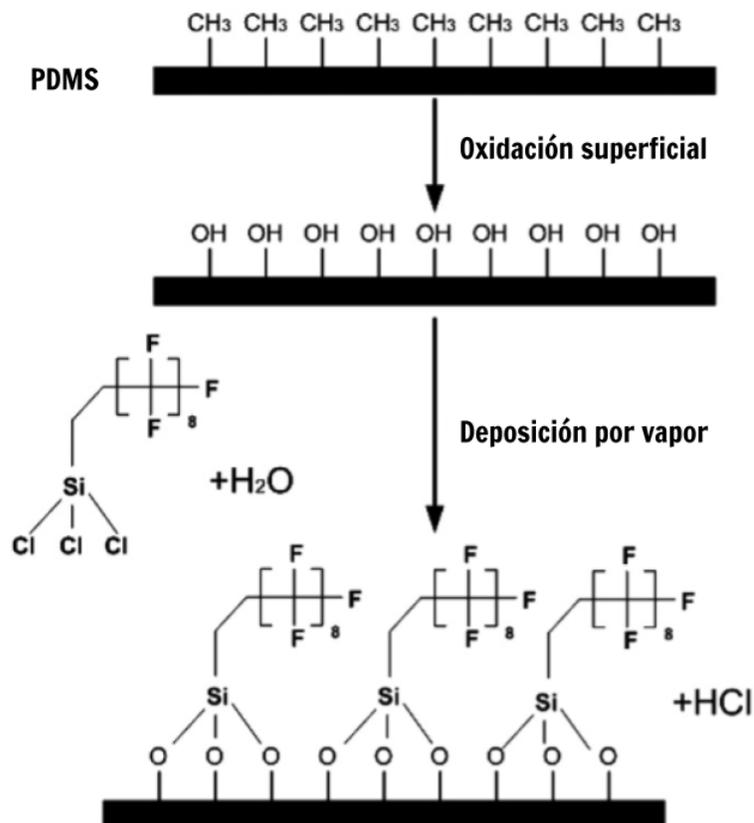


Figura 3-8: Proceso de silanización superficial del PDMS. En este caso se representa con el grupo silano FDTS (1H ,1H ,2H ,2H perfluorodecyltrichlorosilano). Análogo con otros grupos. Tomado de [69].

desapareamiento del grupo metilo e intercambiando por un grupo hidroxilo en el átomo de silicio de la estructura monomérica del PDMS, formando un grupo silanol, figura 3-9. Este grupo OH será el intermediario para crear enlaces covalentes con otro siloxano, como PDMS o vidrio.

El proceso de oxidación de PDMS además de con la bobina tesla, también puede ser estimulado por exposición a luz UV y/o a una cámara de ionización, siendo el último el método más efectivo y el primero el menos de los tres presentados.

3.4.2. Curado parcial

El curado parcial consiste en retirar la réplica del molde antes de que polimerice por completo la superficie en contacto con el sustrato. Controlando el tiempo y temperatura de curado del PDMS, e inmediatamente unir la réplica con la tapa, también parcialmente

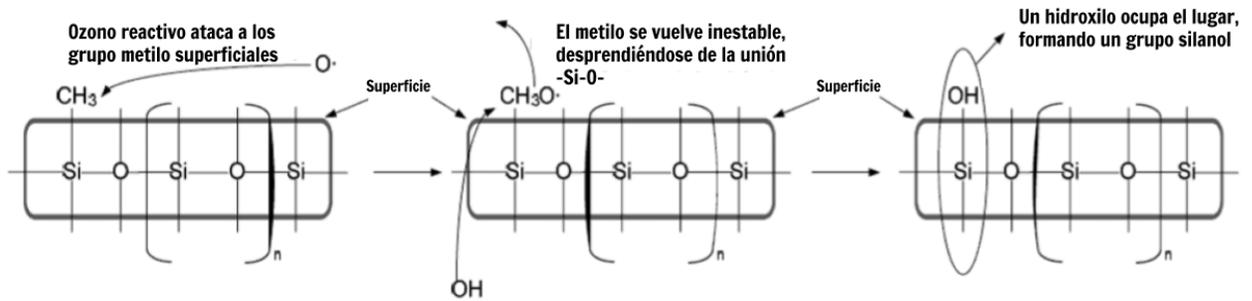


Figura 3-9: Proceso de oxidación superficial del PDMS. Modificado de [71]

curada, dejando que se complete la polimerización entre estos y se creen los enlaces necesarios que mantendrán ambas superficies unidas.

3.4.3. Otras técnicas

Existen otros métodos para unir la cubierta y los canales. Algunos más efectivos que otros [72], pero dependerá del uso final y las herramientas que se dispongan por cual se optará. Por ejemplo, el pegado con cinta adhesiva, como su nombre lo indica, consiste en utilizar una cinta adhesiva como adhesivo de la cubierta de los canales [73]. Es una técnica que permite la fabricación de dispositivos microfluídicos en un tiempo corto y empleando solamente un horno o parrilla. Es utilizado principalmente para hacer pruebas rápidas del dispositivo. Sin embargo, no resiste altas presiones, además de envejecer rápidamente lo que provoca se pierda adherencia entre ambas superficies.

Otras técnicas más elaboradas, como el esparcimiento de PDMS sin curar sobre la superficie creando una capa uniforme de PDMS de apenas algunos cientos de nanómetros, esto evitará que interfiera con la estructura original del canal [74]. Esta última técnica, junto con el curado parcial, se han observado formar las uniones más sólidas, debido a que por naturaleza se forman las uniones poliméricas entre ambas superficies del molde y la cubierta. [75].

3.5. Dimensiones

Las estructuras realizadas con las distintas técnicas de microfabricación pueden ser clasificadas según su aspecto en:

2D: Como su nombre lo indica, son todas las estructuras bidimensionales conformadas de una sola capa, por ejemplo, las generadas por impresión por microcontacto o monocapas autoensambladas, figura 3-10 A.

2.5D: Son estructuras que en realidad son tridimensionales, pero están hechas a base de acoplar varias capas y que su sección transversal en alguno de sus ejes es la misma para cualquier corte que se haga. Es el tipo de estructuras más común generada por técnicas de deposición de capas y grabado. Una de sus características es que no contiene estructuras voladas, figura 3-10 B.

3D: A diferencia de las estructuras 2.5D, en este tipo de configuración no se tiene la misma sección transversal en cualquier corte. Además de que pueden tener estructuras voladas. Su fabricación puede ser por capas o espacialmente, como la polimerización por absorción de doble fotón, figura 3-10 C.

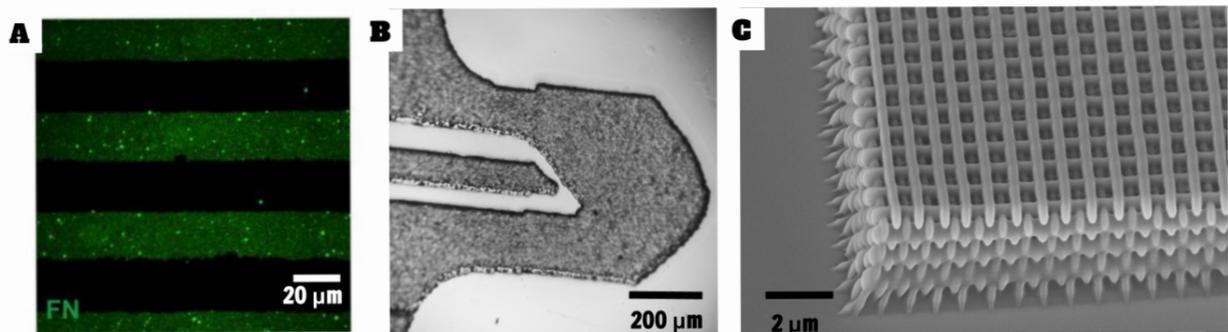


Figura 3-10: Ejemplos de estructuras de diferentes dimensiones: A) 2D, B) 2.5D, C) 3D.

De acuerdo a lo expuesto en este capítulo se determinó que era posible trabajar con las técnicas de fabricación presentadas, ya que por sus características particulares de cada técnica de microfabricación, como costo, resolución y tiempo de fabricación, se pueden plantear y abordar una gran variedad de proyectos de interés en el laboratorio, e incluso es posible juntar las propiedades de dos técnicas para obtener una plataforma más flexible con las necesidades y posibilidades de dichos proyectos. Desde plataformas para cultivo celular hasta microcanales para manipular partículas.

En los dos siguientes capítulos se muestra los resultados de este trabajo, donde se explora un poco más los alcances de cada técnica. Así como el procedimiento de fabricación de plataformas microfluídicas en general, basado en las herramientas disponibles del LaNSBioDyT.

Parte II

Resultados

Capítulo 4

Protocolo de fabricación de chips microfluídicos

La necesidad de contar con un protocolo para la fabricación de plataformas microfluídicas se origina desde la visión y objetivos de laboratorios que tienen la intención de aplicar nuevas herramientas a su trabajo de investigación, tales que imiten en mayor medida las condiciones microambientales de los procesos biológicos a estudiar. Plataformas que permitirán originar, controlar y medir fenómenos más afines a los naturales, incluyendo procesos microfluídicos presentes en los sistemas vivos. De tal forma que se requiere de un protocolo que sea repetible y reproducible en las condiciones del laboratorio, con sus limitaciones y recursos disponibles. Es de lo anterior donde reside la relevancia de este protocolo, donde basándose en la técnicas de microfabricación antes presentadas, se optimizó y realizó dicho protocolo para la fabricación de dispositivos microfluídicos presentados a continuación.

La forma en que se presentan los siguientes resultados es de tal modo que conforme un material de uso continuo en el laboratorio, de manera que está escrito como un protocolo. Sin embargo, todos son resultados de este trabajo.

4.1. Elaboración de plataformas con microflujo

Al igual que las técnicas de fabricación, se divide esta sección en tres partes, para una mejor comprensión, de acuerdo a la etapa de fabricación: molde, réplica, ensamble, figura 3-1.

4.2. Molde

Es la parte más importante del proceso, puesto que comienza desde la planeación del diseño de la estructura, en esta se define la geometría y dimensiones del andamio según las necesidades particulares de cada experimento, dicho de otro modo, aquí surge y comienza la idea.

El primer paso es llevar a cabo el estudio de caso. Investigar y conocer a detalle las características que debe tener el dispositivo según la índole de la aplicación para la que es desarrollada la plataforma. En el caso de plataformas para cultivo celular entre los principales factores a considerar se encuentran: la línea celular, el microambiente, configuración geométrica, tamaño y las propiedades mecánicas y químicas de la matriz extracelular nativa. Para que teniendo presente estas características, se pueda plantear el método de microfabricación más conveniente.

Las cuatro técnicas de microfabricación para los moldes de las estructuras microfluídicas que están disponibles en el LaNSBioDyT son: fotolitografía, polimerización por doble fotón, impresión en moldes de poliestireno encogible por calor llamados Shrinky Dinks y ablación láser. Para cada una hay un proceso específico a seguir, iniciando por el diseño.

4.2.1. Fotolitografía

En el proyecto, se pudo colaborar con el grupo de la Dra. Aline Cerf del LAAS-CNRS de Toulouse, Francia, quien dispone de un equipo de fotolitografía con máscaras. Es de esta colaboración que se pudieron fabricar algunos diseños con este método.

Para las estructuras realizadas por fotolitografía se utilizó un programa de diseño de máscaras ópticas, especializado para crear máscaras de alta resolución, utilizadas para formar los patrones en la resina, figura 4-1.

Algunas consideraciones que hay que tener:

- La resolución óptima de la máscara con la que se fabrica el molde es de 15-20 μm , por lo que al hacer estructuras más pequeñas no se garantiza su adhesión y permanencia en el sustrato, así como la geometría correcta.
- La resina más usada es la SU-8, una resina negativa, esto significa que por donde pasa la luz será el relieve que quedará impreso. Por lo tanto, se debe hacer un diseño negativo.
- Se debe cuidar dejar espacio suficiente entre los diseños. Es importante espaciar los diseños, ya que muy comúnmente en una misma oblea se fabrican más de un

molde. Esto permitirá manipular cada diseño y ensamblar el dispositivo final, 2mm del borde del diseño, para asegurar la unión en el ensamble, y un milímetro más para el recorte. Además se ha de considerar, si el diseño es muy pequeño, si se usará otra estructura a acoplar, sección 4.4.1.

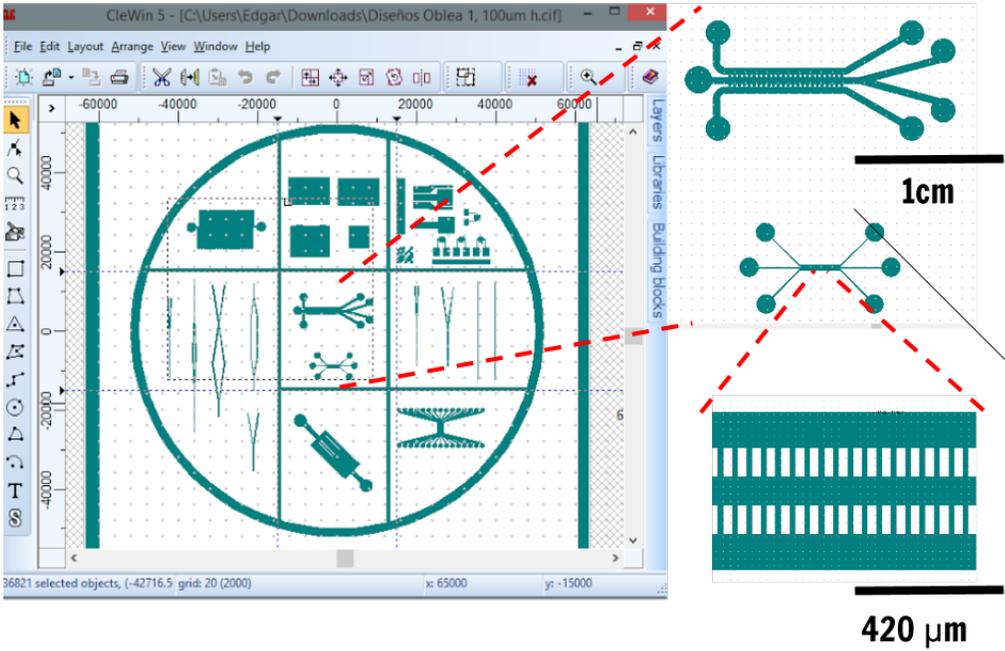


Figura 4-1: Ejemplo de máscara para proceso de fotolitografía, con diseño positivo.

4.2.2. Polimerización por doble fotón

Para llevar a cabo esta técnica estereolitográfica se utiliza el equipo de nanoimpresión Photonic Professional GT de Nanoscribe, con el cual se pueden elaborar estructuras tridimensionales en una escala submicrométrica. Por lo tanto, el diseño debe ser realizado en un formato en tres dimensiones para que la máquina pueda realizar la impresión. Cualquier software para modelado 3D como AutoCAD, Inventor o similar puede ser utilizado. El único requerimiento es que el formato de salida se encuentre en “.stl” (por sus siglas en inglés STereo Lithography), formato especializado para impresiones 3D.

Construido el diseño digital es necesario convertirlo en un script con las instrucciones que el equipo pueda interpretar para efectuar el grabado, para ello se utiliza el software

DeScribe de Nanoscribe. En este se configuran parámetros como dimensión, andamiaje, grosor de pared, método de escaneo y grabado, entre otros para que el equipo pueda reconstruir el molde diseñado, asegurando estabilidad estructural y resolución deseada, figura 4-2.

La principal ventaja de esta técnica es la resolución que se puede obtener, del orden de decenas de nanómetros, permitiendo construir estructuras complejas que se encuentran en la escala de las células, lo que se traduce en un mejor control sobre estas para su estudio, confinamiento y manipulación.

Cabe resaltar que la resina con la que se cuenta, hasta el momento, no es biocompatible, es por esta razón que no puede ser utilizada como andamio directo. Y aunque se cuenta con la ventaja de realizar microestructuras tridimensionales, el diseño debe ser tal que permita obtenerse la réplica de este. Por esta razón el molde no puede tener estructuras voladas, es decir, separadas de la base del sustrato, que al realizar la réplica quede embebida dentro del polímero y sea imposible separar el molde de la réplica al menos que se utilice un método destructivo.

4.2.3. Grabado láser (Ablación láser)

La máquina utilizada para generar ablación láser ha sido desarrollada y fabricada en el laboratorio, basada en el funcionamiento de un diodo láser de un cabezal de un quemador de discos comercial, figura 4-3 A [76] [77]. Para generar el grabado se emplea una plataforma XY y por medio de un programa CNC (por sus siglas en inglés Computer Numerical Control), también desarrollado en el laboratorio, es posible transferir el patrón diseñado para el andamio. En este caso el esquema se esboza en formato de mapa de bits monocromático(.bmp) y convertido en una matriz de ceros y unos, figura 4-3 B, donde cero corresponde a las zonas claras y uno a las zonas oscuras, lo que se traduce como las posiciones donde el láser será pulsado, unos, para generar la ablación. Se pueden emplear programas como Paint o Inkscape, que nos permiten tener control píxel por píxel. Cabe resalta que la máquina emplea motores a pasos de 1 μm de carrera por paso, característica importante para resolución del grabado.

El factor más importante a tener en cuenta es la proporción píxel-tamaño del grabado de una posición, dada como: un píxel en el diseño corresponde a 4 micras en el grabado físico. Otra consideración importante es la limitación de la plataforma XY la cual puede grabar una área máxima de 5×5mm en una corrida.

El grabado se lleva a cabo en un portaobjetos de acrílico recubierto con nanopartículas de carbón, material que se ha observado favorece la ablación láser para grabar este

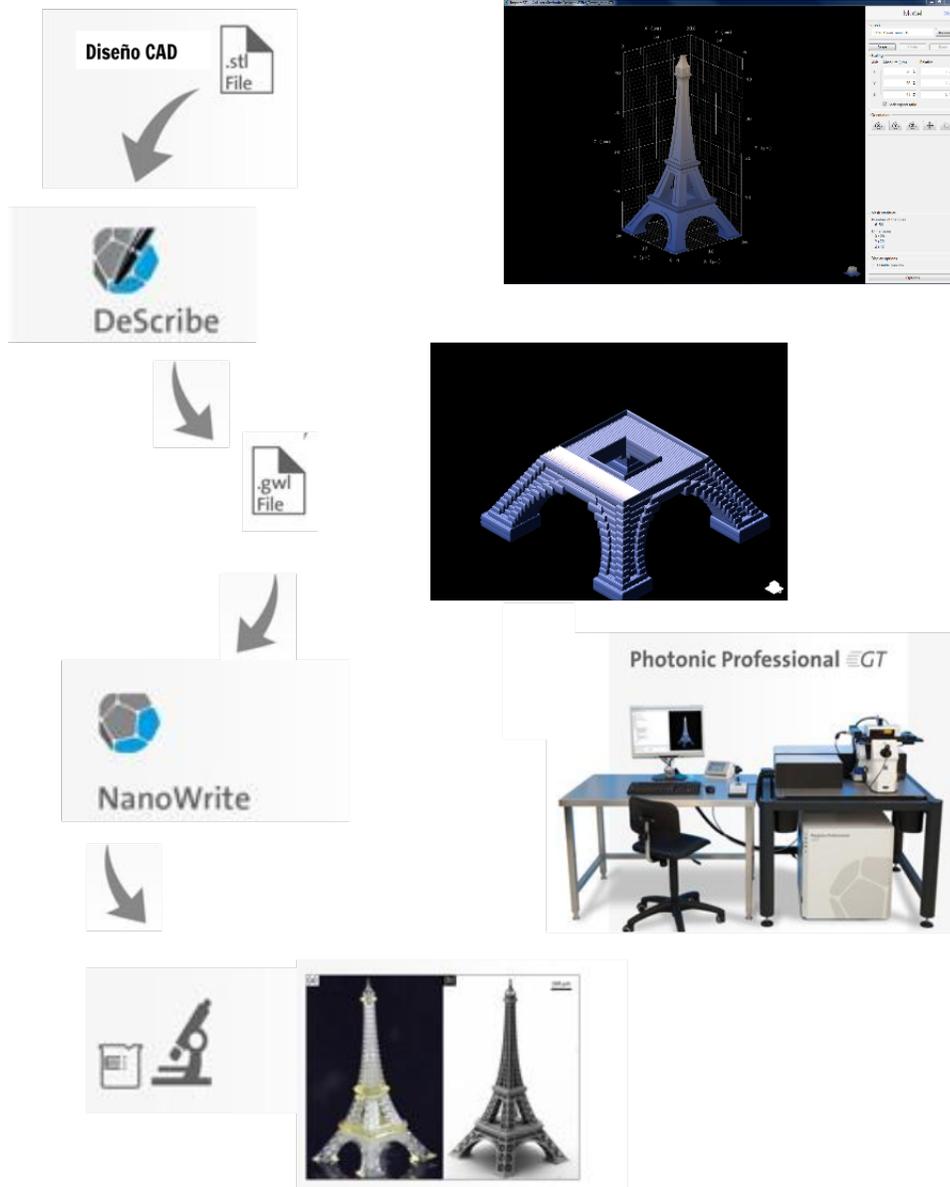


Figura 4-2: Proceso de fabricación de estructuras por polimerización de doble fotón.

sustrato, previamente reportado [78]. Una vez enfocado el láser sobre la superficie, la computadora es la encargada de hacer el grabado, basándose en el archivo cnc previamente cargado. lo que le permite controlar el pulso del láser y el movimiento de los motores.

Finalizado el grabado láser, se limpia con un hisopo humedecido con alcohol isopropílico para remover las nanopartículas residuales. Posteriormente se enjuaga con agua para

retirar cualquier otro residuo.

Este es un método de fabricación de bajo costo, versátil y a la medida.

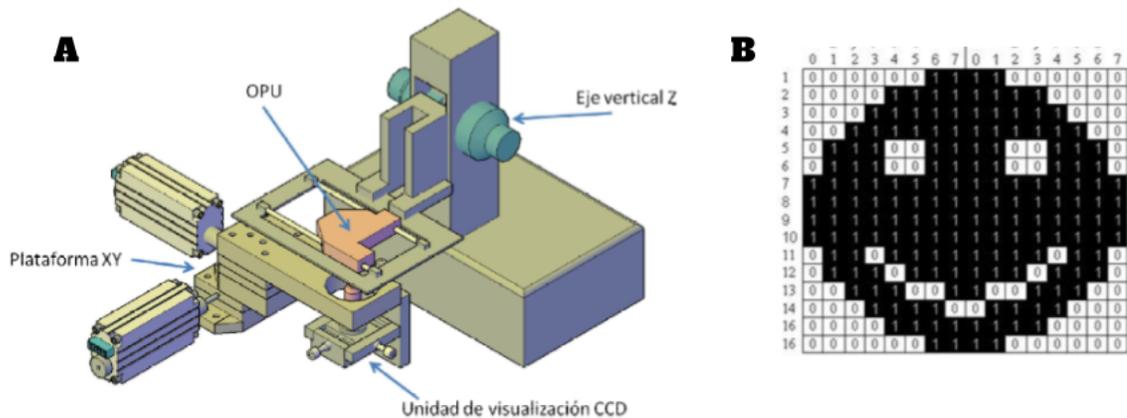


Figura 4-3: A) Unidad de grabado láser. B) Ejemplo matriz para CNC.

4.2.4. Shrinky Dinks

Los Shrinky Dinks representan una opción económica, simple y, de cierta manera, versátil y de prototipado rápido, ya que la técnica permite realizar varios diseños y pruebas de moldes distintos en poco tiempo. Pero dependerá de la aplicación final para la que se decida utilizar este método ya que tiene la desventaja de tener resolución máxima de aproximadamente 100 micras.

El diseño de los moldes a imprimir en las hojas de los Shrinky Dinks puede ser realizado en cualquier programa que permita realizar bosquejos, tal como Power Point, Word, Inkscape, Paint, Adobe Illustrator, etc.. Sólo hay que tener en cuenta que el Shrinky se reduce el 60% de su tamaño original al calentarlo, en otras palabras, el esquema lo haremos 2.5 veces más grande que el requerido (final).

Una vez que se tengan los diseños se han de imprimir, recomendablemente en una impresora láser, en modo normal y utilizando los 4 colores, figura 4-5 A, esto para aumentar la altura de los canales por impresión, ya que se ha de re-imprimir sobre la misma hoja de Shrinky, y sobre cada gráfico, las veces necesarias para obtener el ancho y alto deseados de los canales finales. Para saber, en promedio, las dimensiones que se obtendrán al concluir el proceso de fabricación, se tiene que caracterizar cada impresora y cada vez que se cambie el cartucho de impresión, puesto que las dimensiones finales están estrechamente relacionadas con la calidad del tóner y las especificaciones particulares de cada cartucho.

La impresora utilizada en el laboratorio es marca HP modelo LaserJetCP1025nw color, de la cual se han obtenido las curvas de caracterización que se muestran en la gráfica 4-4, del perfil de altura y ancho de los canales en proporción al número de impresiones y el ancho en el diseño digital. Se observa, existe una relación creciente lineal según el número de impresiones y ancho de las líneas, como se esperaba.

Observación: La parte más delicada en el proceso de impresión de los Shrinky Dinks se encuentra en la alineación dentro de la impresora para la multi-impresión, figura 4-5 B, sobre todo cuando el tamaño de la hoja es más pequeña que tamaño carta, medida estándar para la gran mayoría de las impresoras comerciales, y en general las hojas de Shrinky Dinks cuentan con un tamaño de 5x7 y 8x10 pulgadas. Por lo tanto, se recomienda pegar el acetato a una hoja tamaño carta para que la alineación sea mejor. Además, es recomendable que sólo se adhiera el tamaño preciso a imprimir de la hoja de Shrinky, esto evitará que la hoja completa se ensucie con los residuos de tóner.

Impresa la hoja, se recortan los dibujos de cada diseño, ya que se pueden imprimir varios diseños por hoja, en trozos más pequeños que contengan individualmente cada uno, figura y se limpian con alcohol isopropílico, usando hisopos de algodón para delinear las líneas y paños libres de pelusa, por ser más suaves y no desintegrarse con el alcohol, para áreas delicadas suavizando la superficie del patrón impreso, figura 4-5 C y D. Es crucial hacerlo suave y en patrones ordenados, izquierda-derecha, arriba-abajo, para no remover más tinta en alguna zona y evitar rayones en el molde al aplicar mucha presión. Si se observa que no se ha limpiado adecuadamente se puede diluir acetona en alcohol, 10 % de acetona es suficiente.

Para concluir el proceso de fabricación del molde se precalienta el horno a 175°C, alcanzada la temperatura se introduce el molde y en cuestión de 5 min se ha reducido un tercio de su tamaño original. Pasado este tiempo se retira inmediatamente del horno y se deja enfriar para poder manipularlo , figura 4-5 E y F.

Observación: Introducir el Shrinky sobre una superficie lisa y plana para que el molde final sea de igual manera plano.

Terminado cualquier proceso de fabricación, la primera caracterización del molde será visual, con la ayuda de un microscopio óptico se puede detectar si existe alguna imperfección y decidir si es apropiado seguir el proceso, según el estado de este. Posteriormente se realiza la caracterización perfilométrica de la superficie, para conocer las dimensiones exactas de los moldes.

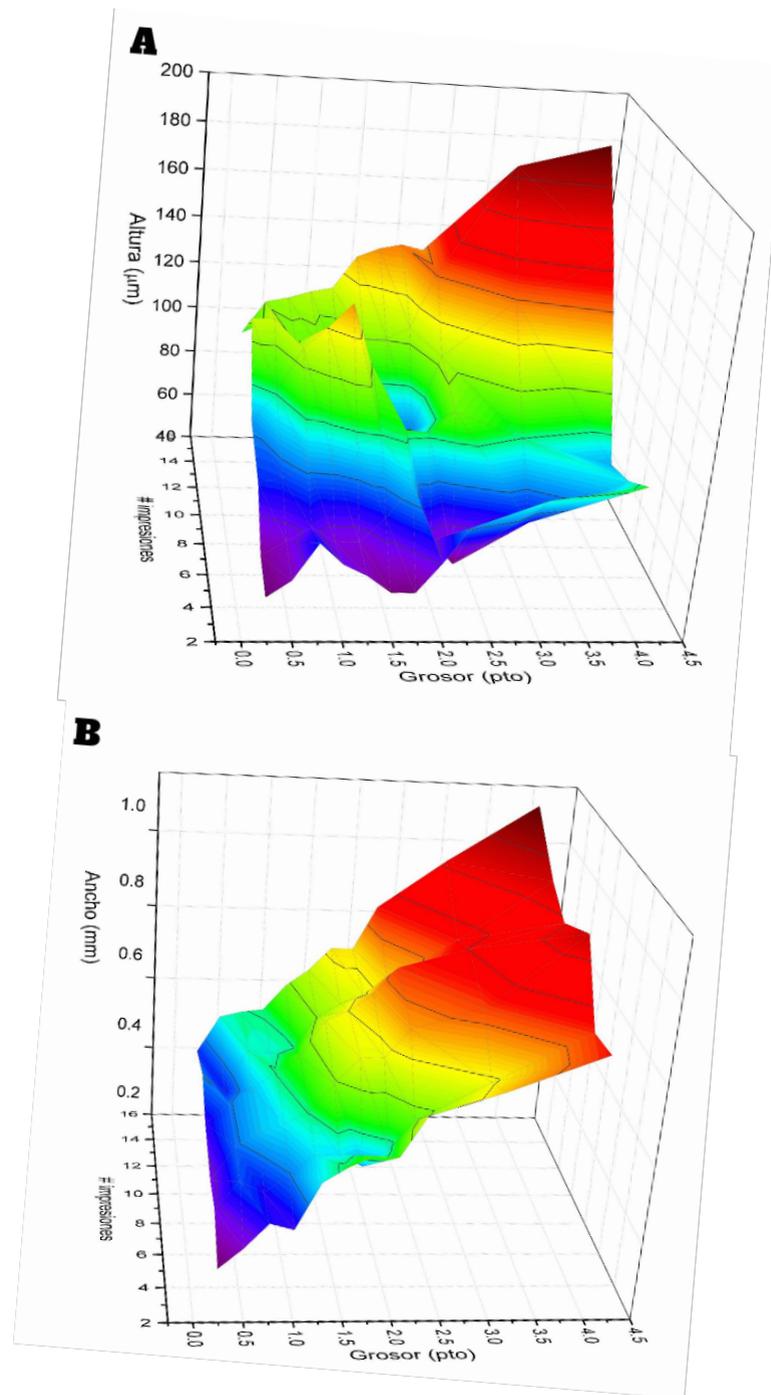


Figura 4-4: Perfil de altura (A) y ancho (B) de canales hechos en Shrinky en función del número de impresiones y grosor del diseño.

4.3. Réplica

Para los procesos de fabricación de moldes presentados, el siguiente paso es el mismo¹ y está basado en la técnica molde-réplica de litografía suave. Se utiliza el polímero PDMS

¹Por simplicidad se muestra el proceso para los moldes de Shrinky Dinks, pero el proceso es idéntico para los otros tipos de moldes.



Figura 4-5: Proceso de fabricación de moldes con Shrinky Dinks.

por sus cualidades ya presentadas, sección 3.3.2. El molde se coloca en un contenedor hecho de papel aluminio, figura 4-6, donde se envuelven después de ser limpiados con alcohol isopropílico y sopleteado con aire para retirar el excedente y el polvo que tenga

sobre la superficie.



Figura 4-6: Contenedor de aluminio para hacer replicas.

El PDMS se prepara en una proporción 10:1 en peso, es decir, se pesa la cantidad deseada de prepolímero en un vaso de precipitados y se le agrega 1/10 del peso de agente curante, figura 4-8 A, B y C. Posteriormente se mezcla vigorosamente por aproximadamente 10 min. Para agilizar este paso y garantizar reproducibilidad, es recomendable utilizar un Dremel a 5 mil RPM. Posteriormente se coloca el vaso de precipitados en el desecador para extraer todas las burbujas de aire que se encuentren atrapadas, alrededor de 25 min, figura 4-8 D.

Por último, se vacía el PDMS sobre el molde, cuidando de no generar burbujas atrapadas entre el PDMS y el molde, y se deja curar térmicamente, calentándolo a 60°C por 48 horas para que quede completamente curado y de forma homogénea, figura 4-8 E y F.

Hay que tener en cuenta que es necesario hacer la cubierta de nuestros canales que puede ser de vidrio o del mismo material que los canales. Para esto, se replica una superficie plana limpia con PDMS, un portaobjetos es la mejor opción, y se sigue el mismo proceso explicado anteriormente.

Observación: La altura que se recomienda de PDMS para hacer las réplicas o el grosor del chip, es de mínimo 2 mm, para luego poder conectar el tubing con el dispositivo y quede sellado herméticamente.

Una vez curado el PDMS hay que retirar el excedente del polímero recortando los bordes y desprendiendo el contenedor de aluminio, figura 4-8 G. Enseguida hay que hacer los orificios en las entradas de los canales donde se conectará el tubing e introducir el fluido dentro del chip. Para ello, se usa una perforadora comercial o sacabocados (instrumento de boca hueca y bordes afilados que sirve para horadar), otra opción es usar un extractor de biopsias, la ventaja de utilizar el sacabocados es que cuenta con

varios tamaños de orificio facilitando usar tubing de distintos diámetros. Para hacer la punción se desprende la réplica del molde y en las marcas hechas perforamos firmemente, de lo contrario se corre el riesgo de rasgar el bloque de PDMS en la periferia del corte, figura 4-8 H.

Observación: Mantener la réplica de PDMS con el canal boca abajo cuando se manipule y al hacer los orificios. Esto para evitar que polvo u otros residuos ambientales contaminen el bloque de PDMS.

4.3.1. Doble réplica

Cuando utilizamos un grabado láser como molde, es necesario realizar una doble réplica, ya que por la naturaleza de la ablación láser el grabado final es muy rugoso, sección 3.2.4. Esta rugosidad impide ensamblar el dispositivo y contener el canal, puesto que reduce la superficie de contacto. En consecuencia el diseño debe ser positivo, garantizando que la rugosidad estará dentro de los canales donde no estará en contacto con la tapa a unir. Ya que si es negativo, se graba el exterior al diseño deseado, por lo tanto la rugosidad se encuentra alrededor del canal, que es la superficie que se tratará de unir. Por tal motivo, se requiere hacer una segunda réplica del positivo para obtener el diseño útil en la réplica de la réplica, debido a que la primer réplica será negativa.

Para obtener la segunda réplica, se debe de silanizar el molde de PDMS, producto del proceso molde-réplica con el grabado láser. La silanización es un proceso utilizado para aumentar la hidrofobicidad del PDMS y disminuir la adherencia entre éste y el mismo polímero u otros materiales, sección 3.3.3.

Precaución: Este proceso debe de realizarse estrictamente dentro de una campana de extracción para evitar los riesgos a la salud del agente silano, ya que produce residuos como ácido clorhídrico, figura3-8.

El procedimiento consiste en depositar por evaporación el agente silano sobre la superficie del bloque de PDMS. Para esto se coloca dentro de un recipiente hermético un vaso de precipitados con 0.5 ml de dimetildiclorosilano, cuya fórmula química es $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$, y junto al vaso las réplicas a silanizar. Se tapa y deja por una hora para que se evapore y deposite el silano. A continuación destapar el recipiente y dentro de la campana dejar que se extraiga el exceso y los residuos del silano por 30 minutos más, figura 4-7.

Observación: Se pueden utilizar otros agentes silanos, según lo reportado en la literatura, como el FDTS, DDMS, PFDA [79].

Precaución: Si el tiempo de silanización es mayor a una hora o la temperatura ambiente en donde se coloca es más alta a la ambiente promedio de 23°C puede ocurrir una sobre silanización. Lo que provoca una acumulación excesiva del agente sobre la superficie y en ocasiones hasta condensación. Esto tiene como consecuencia la formación de burbujas en la segunda réplica y la no superhidrofobicidad, fusionándose ambas caras. De modo que hay que compensar el aumento de temperatura con menor tiempo de silanización y limpiar la superficie del PDMS con alcohol y agua destilada.

Precaución: El material desechable que haya tenido contacto con el silano, como guantes, jeringas y puntas de jeringas, se deben desechar como residuo sólido contaminado. Debidamente marcado en una bolsa cerrada. Mientras que el recipiente se limpia después de cada uso con sanitas y se mantiene completamente sellado en un espacio ventilado.

Silanizada la primera réplica de PDMS, se repite el proceso de molde-réplica para obtener la segunda réplica con el bloque de PDMS, esta será la que se utilizará para continuar el proceso de fabricación.

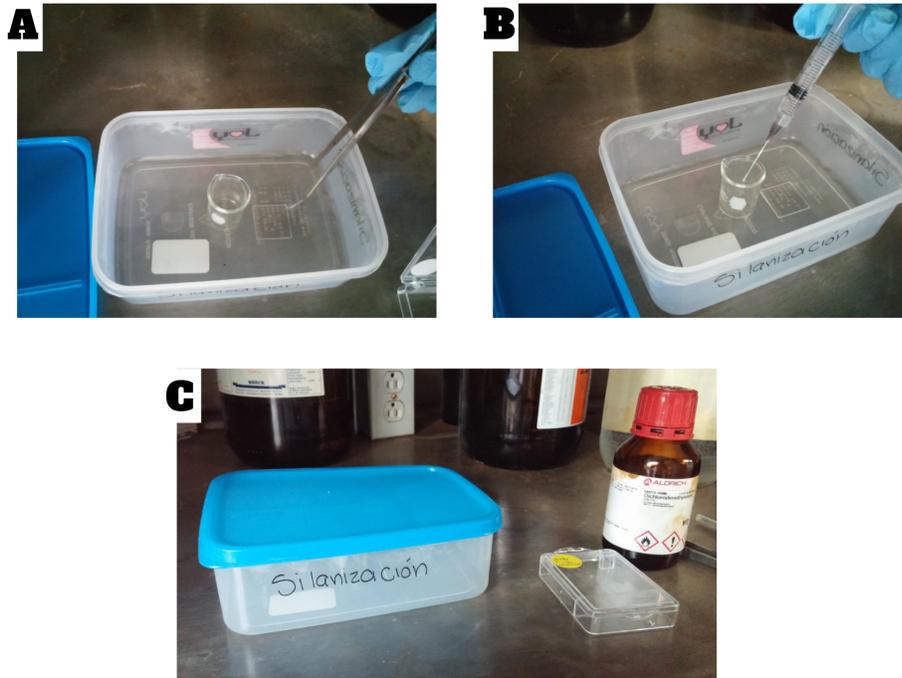


Figura 4-7: Proceso de silanización, A) Introducir en un recipiente hermético la réplica de PDMS a silanizar y el contenedor del agente silano, el uso de guantes y pinzas es importante. B) colocar 0.5ml de agente silano en el contenedor, en este caso un vaso de precipitados. C) Sellar el recipiente y dejar por una hora evaporando. Este procedimiento se lleva a cabo en una campana de extracción obligatoriamente.

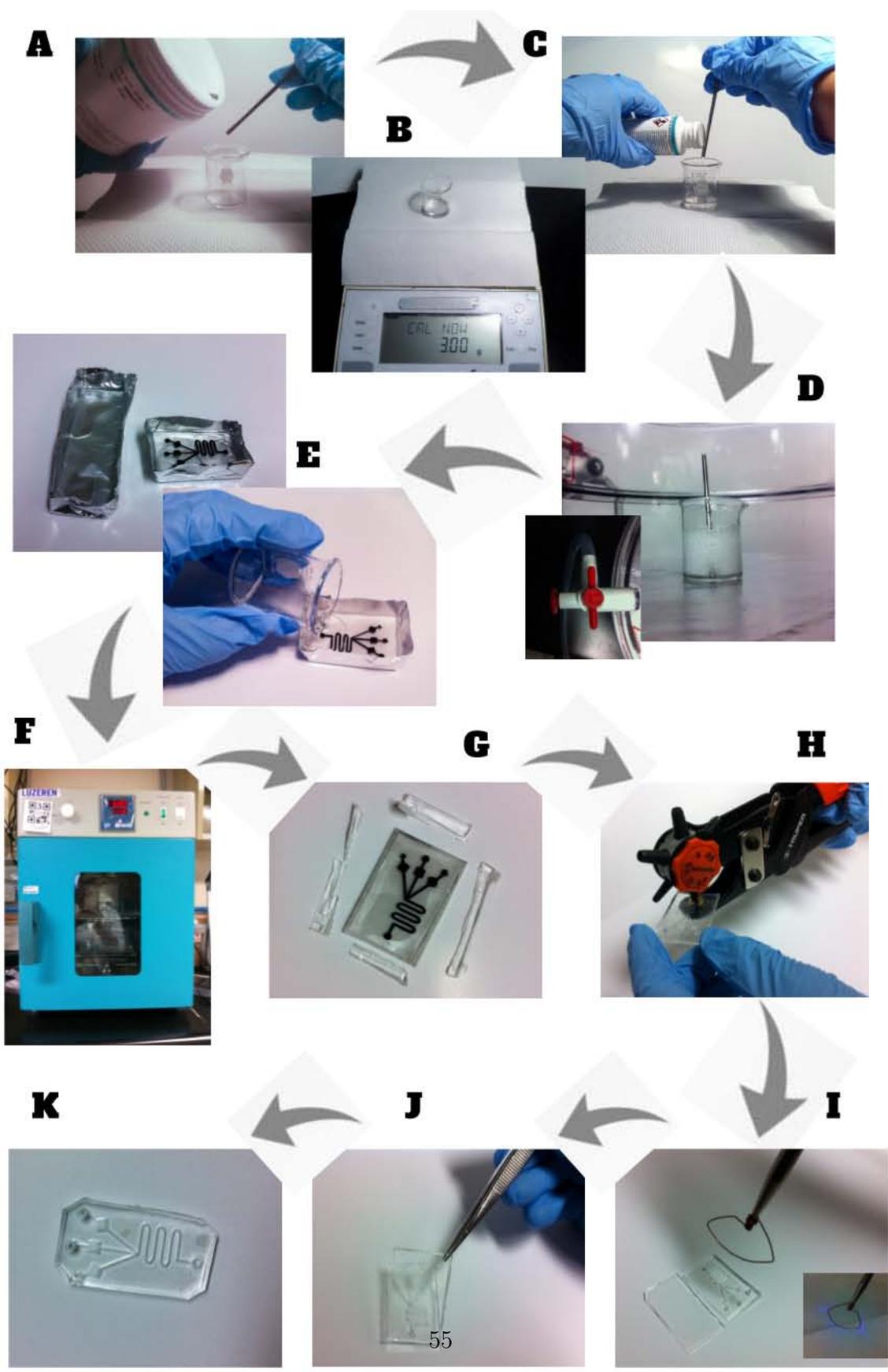


Figura 4-8: Proceso de fabricación de dispositivos microfluídicos.

4.4. Ensamblaje

Finalmente, para completar el armado de la plataforma microfluídica se hace uso de la oxidación del PDMS por descarga corona [80].

Observación Si la réplica de PDMS contiene polvo o pelusa, con cinta adhesiva Scotch se puede limpiar la superficie del bloque de PDMS.

Antes de iniciar el procedimiento para unir la réplica de PDMS y la tapa se precalentan las dos piezas del dispositivo en la parrilla a 60°C por 10 min. Para enseguida colocarlas boca arriba en una superficie no conductora y un ambiente libre de polvo. Con la punta de la bobina tesla a una distancia de aproximadamente 1.5 cm de la superficie aplicamos la descarga corona por 45 segundos, con movimientos continuos y lentos abarcando toda la superficie. Pasados los 45 segundos, inmediatamente se superponen las superficies oxidadas aplicando la presión suficiente para que se adhieran las superficies pero no en exceso para que no colapsen las estructuras.

Por último se coloca el chip en la parrilla por una hora a 90°C y después se deja reposar el chip por dos horas más para que esté listo para utilizarse.

Observación A la punta de la bobina Tesla es posible adaptarle un alambre en forma plana para que se abarque más superficie en cada pasada durante la oxidación del PDMS.

Precaución Durante todo el proceso el uso de pinzas y guantes para manipular el polímero es imprescindible. Cualquier residuo de suciedad provocará una adhesión deficiente o nula entre las superficies.

4.4.1. Ensamble con doble estructura

En ocasiones el diseño final que nos interesa es muy pequeño por las limitaciones de dimensiones de los métodos de alta resolución, lo que impide hacer las conexiones con los elementos macroscópicos externos, como jeringas o tubing. Para estos diseños nos valemos del uso de Shrinky Dink, con el que podemos fabricar una extensión de los canales del diseño central como se muestra en la figura. Estas extensiones nos facilitarían el enlace entre lo macro con lo micro y lo que permiten representa una importante contribución del presente trabajo, figura 5-7.

La extensión de Shrinky Dinks se diseña de tal manera que se ajuste al diseño principal, con especial atención en la impresión múltiple para que no se empalmen, ya que la

separación entre cada conexión puede ser mínima, decenas de micras, según el diseño. La réplica se realiza de igual manera con PDMS y se empalma con la estructura micrométrica a través de descarga corona, con mucho cuidado para acoplar de manera correcta las entradas, figura 4-9.

En la estructura central se tiene que considerar hacer los empalmes para sobreponer las dos estructuras y que se unan adecuadamente. Además de tomar en cuenta la separación entre las entradas ya que el tamaño mínimo promedio de ancho de los canales en Shrinky Dink es de 100 micras.

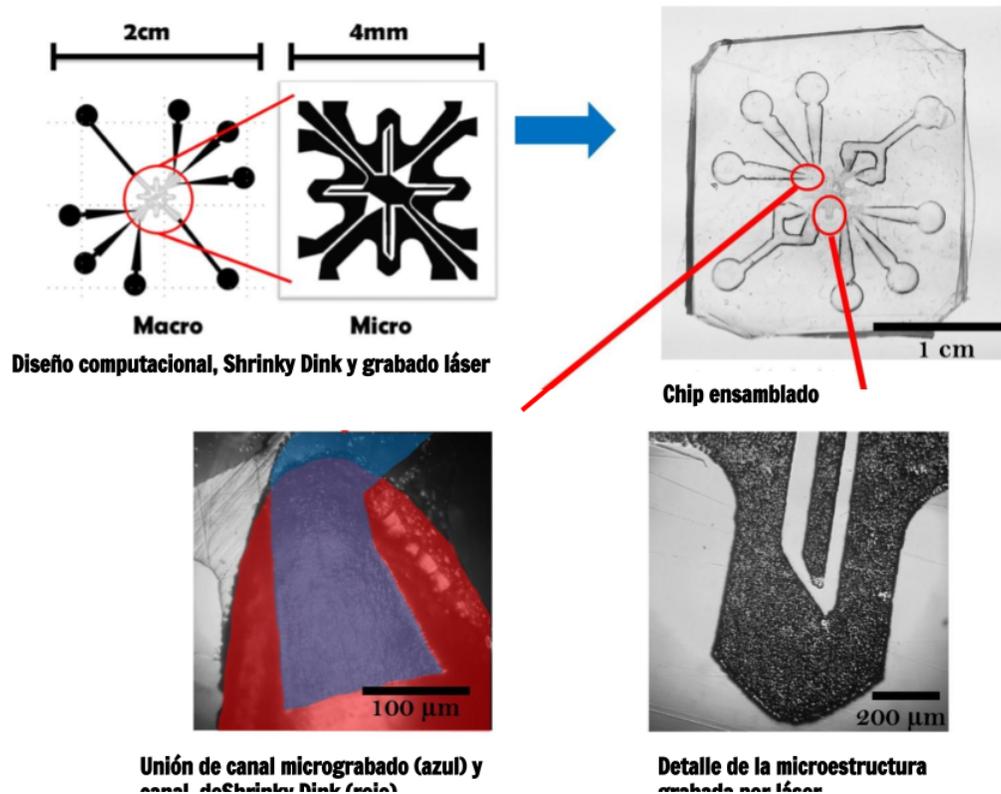


Figura 4-9: Ejemplo de chip ensamblado utilizando dos técnicas de microfabricación, Shrinky Dinks y grabado láser. Lo que permite conectar los instrumentos macroscópicos con los diseños microscópicos.

4.4.2. Pruebas de hermeticidad

Para finalizar el proceso de fabricación se deben realizar las pruebas de hermeticidad, para comprobar que ha quedado ensamblado y sellado los canales de PDMS. Como primer

punto se ha de hacer una inspección visual con la que se busca detectar si se crearon burbujas entre las dos superficies o si tiene algún lado separado. La siguiente prueba es tratar de despegar ambas superficies jalando uno de la otra con fuerza moderada. En los casos donde el procedimiento ha sido defectuoso se separan ambas partes con esta prueba. Sin embargo hay que hacer una tercera prueba para comprobar que en las vecindades de los canales se encuentran completamente sellados. Esta prueba consiste en llenar el canal completamente con agua o alcohol para después hacer fluir el líquido, primero a baja presión y posteriormente se aumenta esta presión, figura 4-10. Si el líquido es contenido después de fluir el chip es favorable y puede utilizarse, figura 4-11.

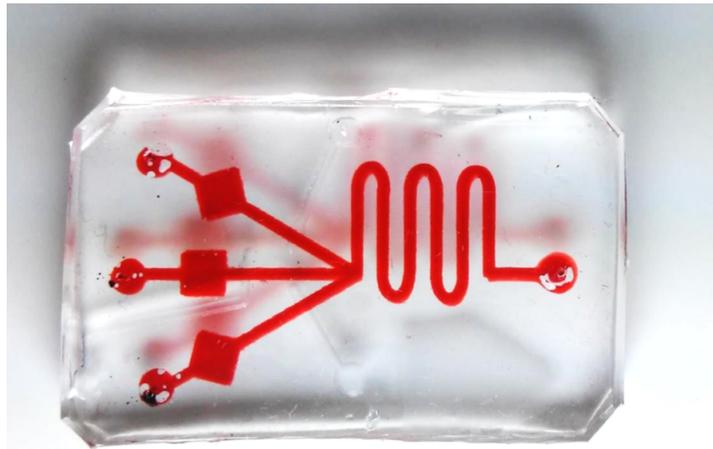


Figura 4-10: Chip ensamblado después de ser probado con agua con colorante rojo, se observa que contiene el líquido

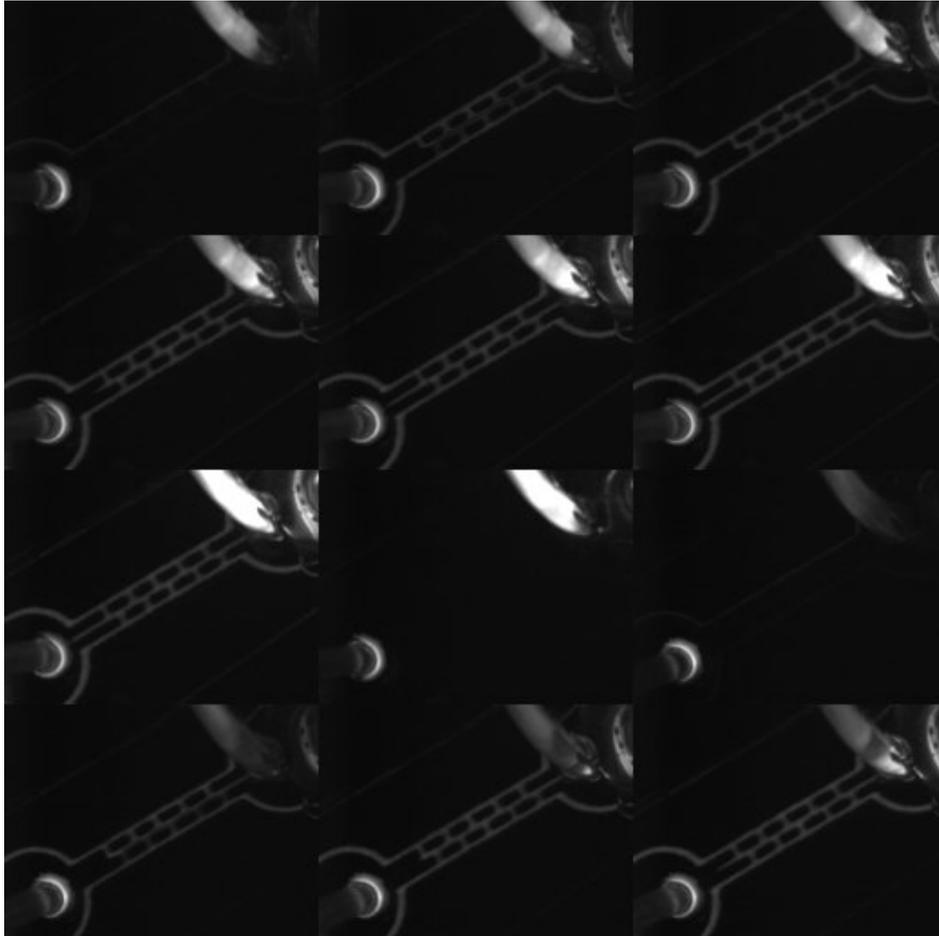


Figura 4-11: Sucesion de imagenes en pruebas de difusión y hermeticidad de flujo para chip microfluídico, separación de aproximadamente 5 seg entre cada imagen. Se utiliza fluoresceína disuelta en agua, a los 40 seg se vacía el canal por completo y se comienza de nuevo la perfusión.

Capítulo 5

Validación: Plataforma de cultivo para hígado

Se retomó el problema inicial de construir una plataforma de cultivo celular para hepatocitos tal que imite el flujo y sus efectos presentes *in vivo* en el interior del hígado. Se fabricaron 4 diseños, uno para cada método disponible.

5.1. Arquitectura del hígado

Para estudiar las funciones y disfunciones hepáticas, y poder realizar un dispositivo para cultivar células del hígado cercano al biomimetismo, es preciso conocer previamente la estructura del hígado, figura 5-1 A.

La unidad básica del hígado es el lobulillo hepático. El lobulillo hepático clásico representa una unidad morfológica descriptiva de forma hexagonal [81], en el cual los hepatocitos, células principales en el hígado, están dispuestos en cordones radiales a la vena hepática central y en las esquinas del hexágono se encuentra la triada portal, constituida por la vena portal, la arteria hepática y el conducto biliar, figura 5-1 B y D. La sangre fluye de los vasos de la triada en la periferia del lobulillo hacia la vena central por los sinusoides hepáticos, los cuales, son capilares que se disponen entre las filas de los hepatocitos. La pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas, dicho de otra manera, células perforadas. Este tipo de vaso facilita el intercambio de componentes entre la sangre y hepatocitos. Los sinusoides hepáticos están rodeados por todas partes de hepatocitos de manera que permean completamente el hígado. La superficie de cada hepatocito está en contacto con la pared del capilar

sinusoide a través del espacio de Disse y con la superficie de otros hepatocitos adyacentes. Dos hepatocitos colindantes delimitan un espacio tubular conocido como canalículo biliar que conforman la primera porción del sistema de conductos biliares, figura 5-1 C. Cabe resaltar que los hepatocitos son células polarizadas, es decir, tienen una orientación definida respecto a los componentes que la rodean.

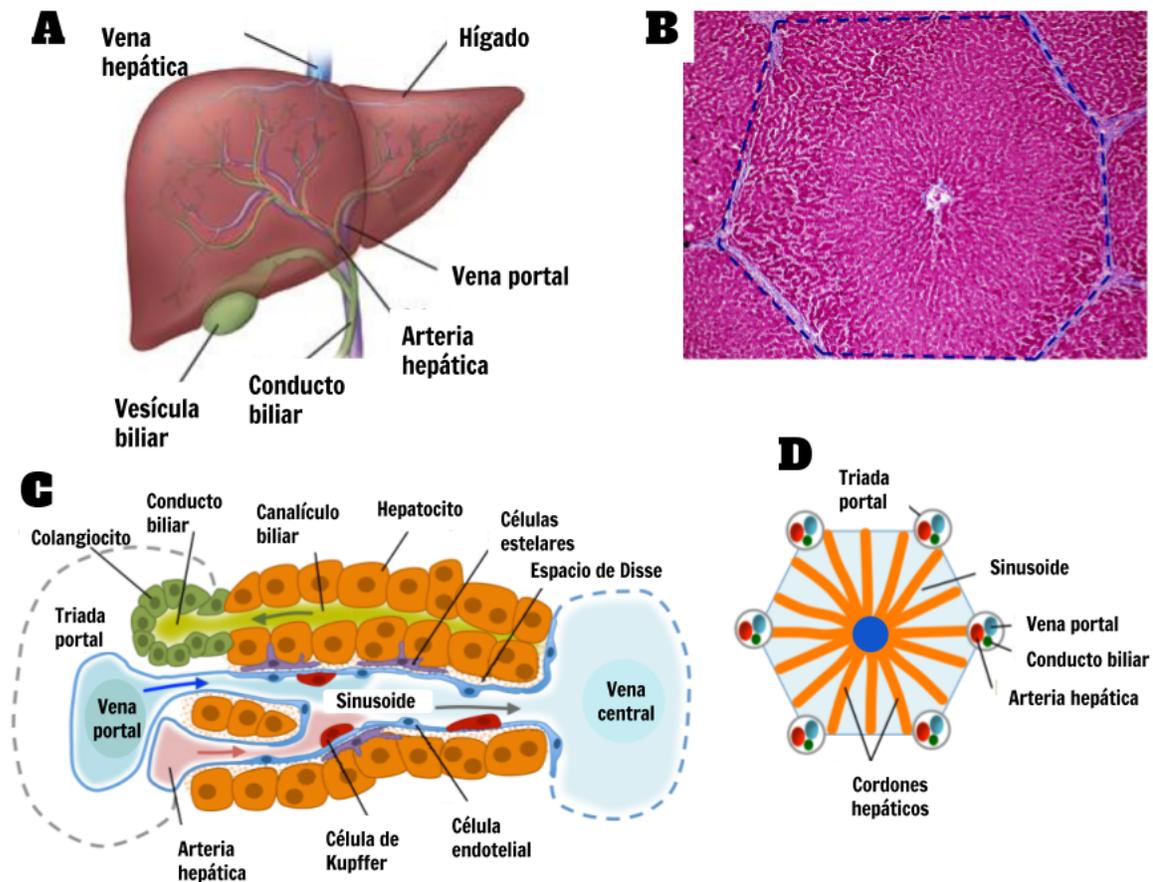


Figura 5-1: El hígado. A) Red sanguínea y conducto biliar en el hígado. B) Corte histológico del hígado donde se observa la estructura hexagonal del lobulillo hepático clásico. D) y C) Organización de los cordones hepáticos.

Los hepatocitos muestran distintos perfiles metabólicos según su distancia al espacio portal. Los hepatocitos cercanos al espacio portal están más expuestos a sangre oxigenada y contienen enzimas implicadas en reacciones oxidativas. Producen y almacenan glucógeno y producen y secretan proteínas. Los hepatocitos más distantes de los espacios portales tienen escasa capacidad oxidativa y contienen muchas esterasas, pues participan

en las reacciones de conjugación y detoxificación. Los hepatocitos presentes entre los dos extremos muestran propiedades metabólicas intermedias.

El hígado está conformado en su mayoría, 78 % del total, por hepatocitos, cuyo tamaño promedio es de 30 μm . No obstante, trabajan en conjunto con otras células para establecer un correcto funcionamiento hepático. Células como: colangiocitos (células epiteliales de las vías biliares que participan en la formación de bilis), células endoteliales de los sinusoides, células de Kupffer (macrófagos con gran capacidad de fagocitar y eliminar virus, bacterias y restos celulares), células T (también conocidas como “*natural killers*”), células plasmáticas (contribuyen con la síntesis de inmunoglobulinas) y células estelares (encargadas de almacenamiento de vitamina A).

5.2. En el LaNSBioDyT

5.2.1. Diseño y fabricación

Se realizaron 4 diseños análogos entre si para los métodos de fabricación presentados. Adaptando cada uno de estos al método de fabricación: shrinky dinks, ablación láser, fotolitografía y polimerización por doble fotón.

Basados en la estructura del sinusoides hepático y el trabajo previo de Nakao et al. [37] se propuso hacer un canal central donde se sembrarán los hepatocitos, y dos canales laterales, por donde fluirá el medio, interconectados con el canal central por fenestraciones para evitar el esfuerzo cortante del flujo, parámetro que promueve la transdiferenciación, y provocar el transporte del medio por difusión, imitando un sinusoides hepático.

El diseño para Shrinky Dinks fue realizado en Adobe Illustrator CC, con un grosor de 0.5 pts en las líneas centrales y 0.4 en las fenestraciones, con una longitud de 34 mm en el canal central y 64x14 mm total. El molde fue impreso 6 veces y concluido siguiendo el protocolo descrito. El molde finalizado tiene unas dimensiones de $65\pm 4 \mu\text{m}$ de altura x $424\pm 37 \mu\text{m}$ de grosor en los canales principales, $48\pm 6 \mu\text{m}$ x $491\pm 51 \mu\text{m}$ en las fenestraciones y un largo total de 1.2 cm con un volumen de aproximadamente 34.3 μL por canal, figura 5-2.

El diseño para producir por ablación láser varía con respecto a los demás, pareciéndose más al presentado por el grupo de Nakao, aunque con la misma intención. Realizado en Paint versión 6.3 y en formato bmp monocromático. El canal central es de 90x20 px y las fenestraciones de 30x1 y 3 px, con un tamaño total de 768x768 px. En el grabado final cada píxel tendrá un tamaño aproximado de 4 μm en el molde y una altura promedio de

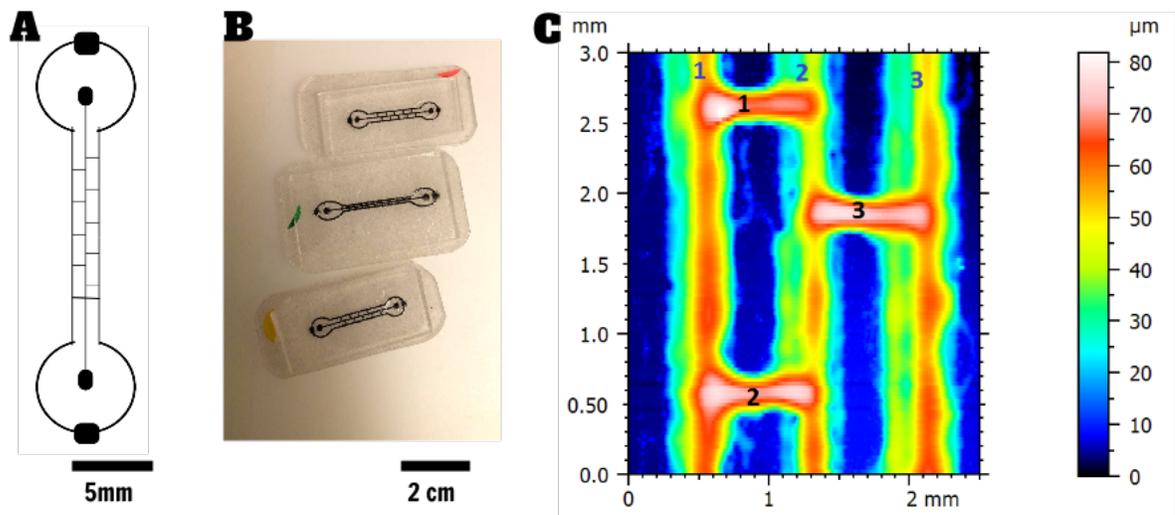


Figura 5-2: Diseño (A) y molde (B) de canales hechos con Shrinky Dink y (C) su perfil topográfico.

12.2 μm , figura 5-3.

El molde de SU-8 por fotolitografía fue realizado con unas dimensiones de 500mm de ancho por canal, $11100\mu\text{m}$ de largo y $100\mu\text{m}$ de alto, además las fenestraciones tienen una separación de $150\mu\text{m}$ por su lado más estrecho y $300\mu\text{m}$ por el lado más amplio. Dimensiones denotadas desde la elaboración del diseño. Este molde fue fabricado en el LAAS, Francia, figura 5-4.

Finalmente, el diseño para el equipo Nanoscribe fue realizado en AutoCad 2015 en formato *.stl*. Cuenta con unas dimensiones dadas desde el diseño de $80\mu\text{m}$ en el canal central y $90\mu\text{m}$ en los laterales, con una altura de $100\mu\text{m}$. Las fenestraciones tienen una longitud de $20\mu\text{m}$, un ancho de $6\mu\text{m}$ y alto de $40\mu\text{m}$. Cabe resaltar esta ventaja con la que se cuenta con este método, en la que podemos obtener una altura distinta entre los canales y las fenestraciones. El tamaño completo del molde es de $600 \times 750\mu\text{m}$, figura 5-5.

Para la fabricación de cada uno de los moldes se siguieron los protocolos previamente descritos. Se utilizó el proceso de litografía suave molde-réplica con PDMS y descarga corona para el ensamblado PDMS-PDMS.

Desafortunadamente la primera estructura creada por polimerización de doble fotón no fue posible replicar, ya que como se observa en la figura 5-6, el PDMS curado ejerce sobre la estructura esfuerzos de compresión, desprendiendo por completo la resina del sustrato al momento de levantar la réplica que se debería separar del molde. Se realizaron

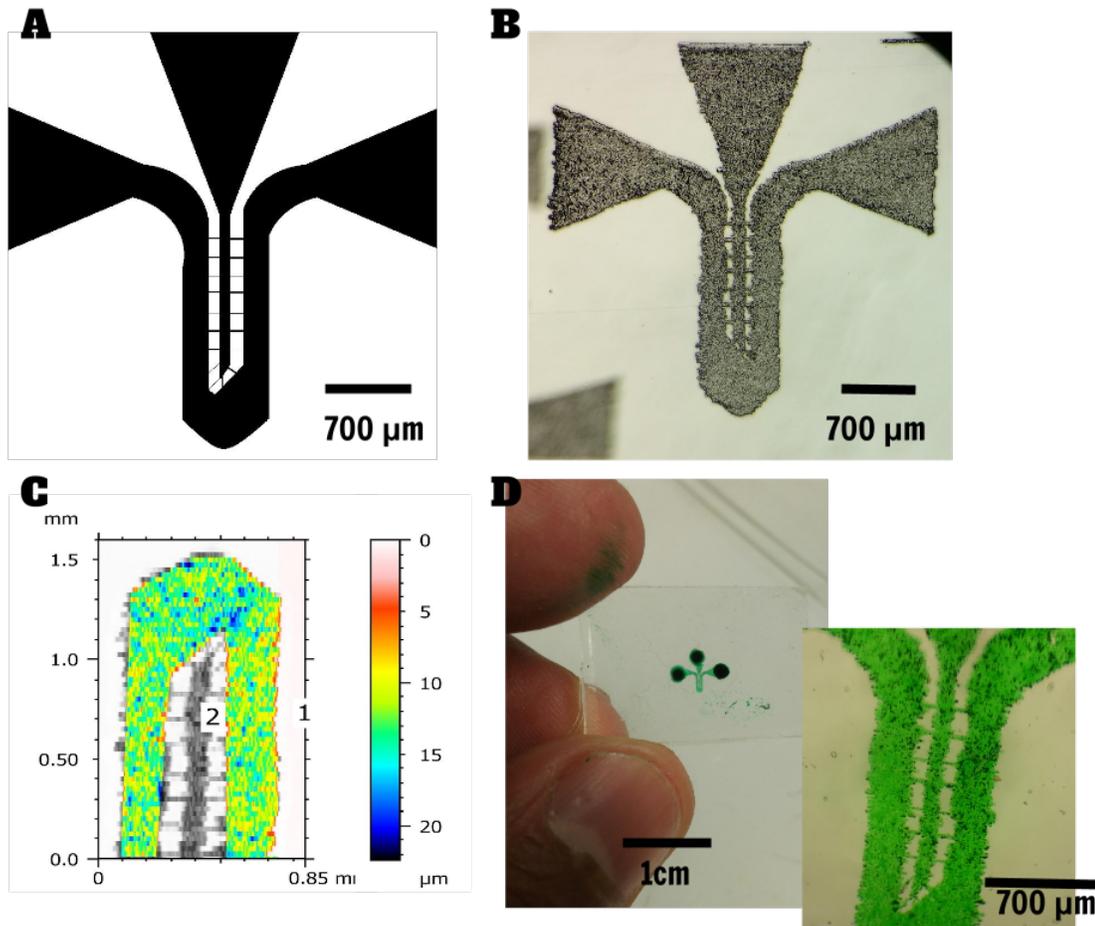


Figura 5-3: Diseño (A) y grabado láser en acrílico(B). Perfil topográfico del grabado (C) y chip finalizado(D) llenado con colorante vegetal para mostrar la viabilidad del chip para medio y flujo.

tres moldes más, variando la superficie de contacto con el sustrato, sin embargo, en los tres sucedió lo mismo. Al final, y gracias a la ayuda de una estudiante del laboratorio, se logró replicar la estructura del Nanoscribe trabajando en la promoción de adhesión de la resina sobre el sustrato y silanizando el sustrato del molde antes de ser replicado, figura 5-7. Actualmente nos encontramos en la optimización de este procedimiento.

5.3. Sembrado

Para sembrar las células en los canales, los chip microfluídicos se lavaron con alcohol etílico al 70 % inyectado por los orificios con una jeringa estéril de plástico y se dejaron

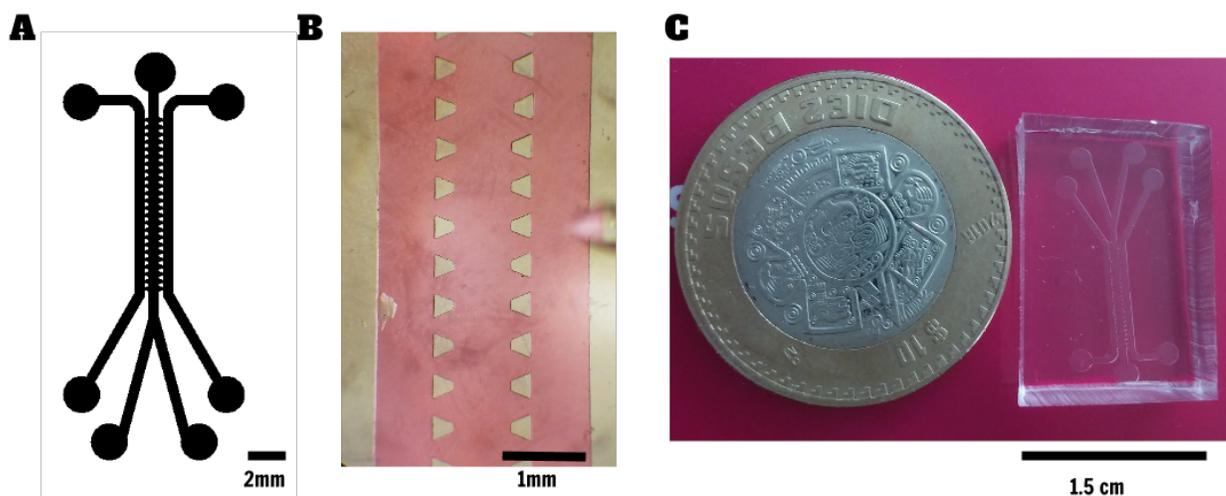


Figura 5-4: Diseño en la máscara para fotolitografía (A). Canales con medio de cultivo (B) y chip finalizado (C).

esterilizando dentro de la campana de flujo laminar con luz UV por media hora y posteriormente se lavaron con PBS (buffer fosfato salino), finalmente se llenaron con medio de cultivo y se dejaron incubando por un día. Esto se ha observado promueve la adhesión celular al PDMS [82]. Después de ser incubado se reemplazó el medio de cultivo y se introdujeron células de la línea hepática C9, empleando una jeringa Hamilton de $100\mu\text{l}$. En todo este procedimiento los fluidos fueron introducidos por presión ejercida por el usuario a la jeringa, que desafortunadamente no es controlable.

En ambos casos se insertaron las células por el canal central. Y en el diseño de la "U", del grabado laser 5-3, se succionó por la salida derecha para promover la entrada de las células.

5.4. Evaluación de los chips: cultivo celular

El primer chip en ser probado fue el fabricado por Shrinky Dink. Donde se inyectó una alícuota celular con concentración de 4 mil células por ml. El chip se introdujo en la incubadora con una cama húmeda, la cual permite mantener el entorno del chip con una alta humedad y evitar la evaporación del medio dentro de los canales, de lo contrario por la cantidad de líquido en los canales se evapora por completo provocando la muerte celular. Se dejó reposar por 24 horas. Transcurrido este tiempo se realizó una inspección

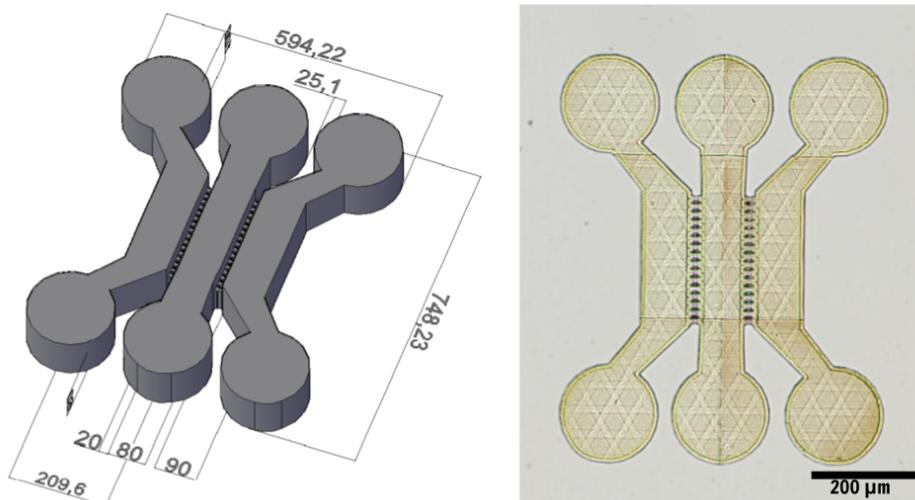


Figura 5-5: Diseño tridimensional para fabricación en el equipo Nanoscribe© (A) y estructura finalizada (B).

visual para verificar la viabilidad de las células, corroborando que se adhieren al sustrato y sobreviven según su morfología observada. Sin embargo, las dimensiones son muy grandes para contener la alícuota en el canal central, figura 5-8. Por lo que se decidió fijar las células y teñirlas con cristal violeta y para de esta manera comprobar que efectivamente estaban adheridas al canal. Este el primer indicio que obtuvimos sobre la factibilidad de los andamios.

Con los dispositivos obtenidos de la réplica de SU-8 y el grabado láser, se aumentó la concentración de células insertadas a los canales a 2×10^6 células por mililitro para saturar el canal. En esta ocasión se dejó el cultivo por 4 días dentro de la incubadora y con su respectiva cama húmeda. Se reemplazó el medio de los canales dos veces al día y todos los días eran inspeccionadas visualmente bajo el microscopio.

Aunque las dimensiones de las fenestraciones que unen los dos canales externos con el central son más pequeñas que las obtenidas con el diseño de Shrinky Dinks, aún no son lo suficientemente pequeñas para contener las células, figura 5-9 A.

Al cuarto día se decidió agregar calceína, un sensor de calcio que al ser absorbido por las células a través de la membrana celular puede ser usado como indicador de viabilidad celular al fluorescer cuando es procesado por células activas. Observando que las células se encontraban vivas y se conjetura que estas habían proliferado en ambos casos, al observar una confluencia mayor de células en los canales. Aunque es necesario otro tipo de pruebas específicas de proliferación celular para validar dicha conjetura.



Figura 5-6: Estructura realizada en Nanoscribe inmersa en PDMS.

Sin embargo, se aprecian que se encuentran dispersas por todo el andamio. Y es de notar que en el diseño del grabado láser, donde las dimensiones de las fenestraciones, del orden de 4 a 12 micras, son más estrechas que el tamaño promedio de las células, estas han logrado mudarse hasta los canales externos. Y se observa, delimitada en rojo, una alta concentración en la salida del dispositivo por donde se succionó, figura 5-9 B. Este resultado apunta a que las células han sido deformadas para atravesar las fenestraciones por un exceso de presión ejercida y que no han sido dañadas, resultado notable que merece estudios posteriores y no observado anteriormente.

Por otro lado, también se observó el intercambio de gases entre los canales inmersos en PDMS y el exterior, llenando los canales con rojo de fenol, un indicador de pH en el medio de cultivo, el cual cambia de color al variar el pH. Para comprobar este intercambio de gases, se dejó un chip lleno de rojo de fenol por dos horas dentro de la incubadora y abierto de sus entradas para que se homogeneizara el pH con las condiciones del medio ambiente en la incubadora. Enseguida se taparon las entradas del chip con PDMS para obligar que el intercambio de gases fuese exclusivamente a través del PDMS. Se dejó una noche entera dentro de la incubadora. Pasado este tiempo se sacó y se colocó en un microscopio para grabar el cambio de color por durante dos horas bajo las mismas condiciones ambientales exteriores. El resultado se observa en la figura 5-10, donde se aprecia la modificación en

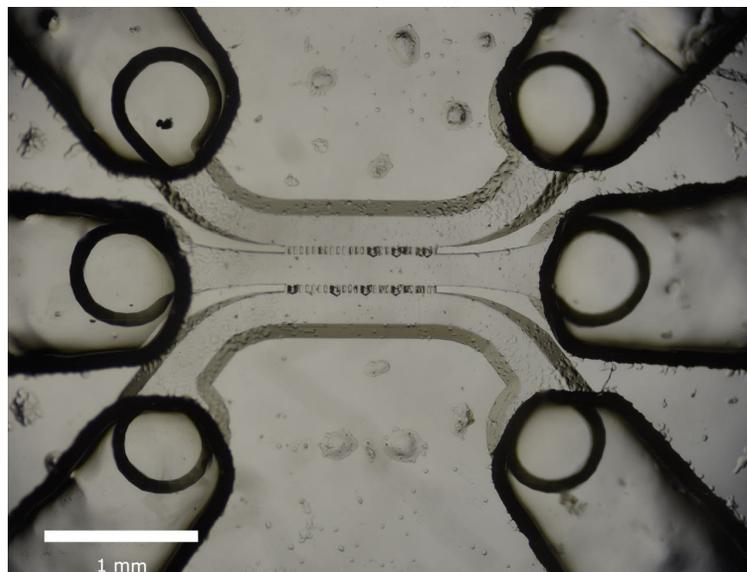


Figura 5-7: Réplica de estructura realizada en Nanoscribe © con uniones hechas con réplica de Shrinky Dinks, realizada por una estudiante del LaNSBioDyT (Mariel Cano).

el color del medio en el canal. Para corroborar se tomó el espectro del rojo de fenol, figura 5-11, durante el tiempo expuesto, donde también se aprecia el cambio. Esto demuestra que existe un intercambio de gases a través del PDMS.

El siguiente paso tendría que ser el introducir flujo dentro de los canales para evaluar los efectos que tiene sobre las células. Pero el resultado anterior nos indica la importancia de tener la plataforma inmersa en un entorno controlado, idóneamente con las condiciones de la incubadora, en las que sabemos un cultivo celular puede sobrevivir. Por esta razón se decidió no introducir microflujo a los andamios realizados, hasta construir una mini incubadora exclusiva para plataformas microfluídicas y evitar usar otras incubadoras de uso común y cotidiano en laboratorios de biología, y evitar contaminar otros cultivos de otros experimentos, ya que no es posible introducir y esterilizar todos los elementos que requiere la plataforma, como las bombas de perfusión. Proyecto que se encuentra en desarrollo en el LaNSBioDyT.

Además, después de observar que las células no han podido ser contenidas se decidió encontrar una estructura congruente con el sistema *in vivo*. Que para dichas dimensiones el método más efectivo es el uso del equipo Nanoscribe. Actualmente nos encontramos en el LaNSBioDyT desarrollando la técnica de fabricación de estos dispositivos con moldes a escala micrométrica.

Estos hallazgos durante el desarrollo de este trabajo, han delimitado su alcance, puesto

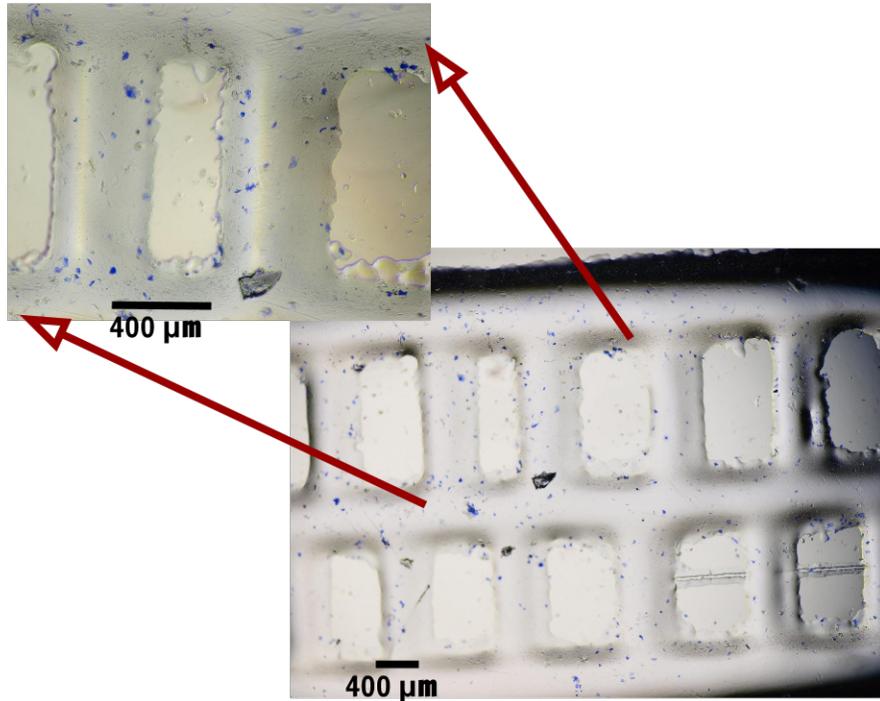


Figura 5-8: Chip proveniente del diseño de Shrinky, con células de la línea hepática C9 en azul.

que de no hacerlo no concluiría, dado que como se ha observado a lo largo de esta tesis, el desarrollo de una plataforma microfluídica para cultivo celular contempla un gran número de parámetros a considerar. . Pero confiamos en que con los avances que se han obtenido aquí y con otros proyectos que se llevan a cabo simultáneamente en el laboratorio, el alcance de nuestra investigación será de gran provecho para la comunidad científica.

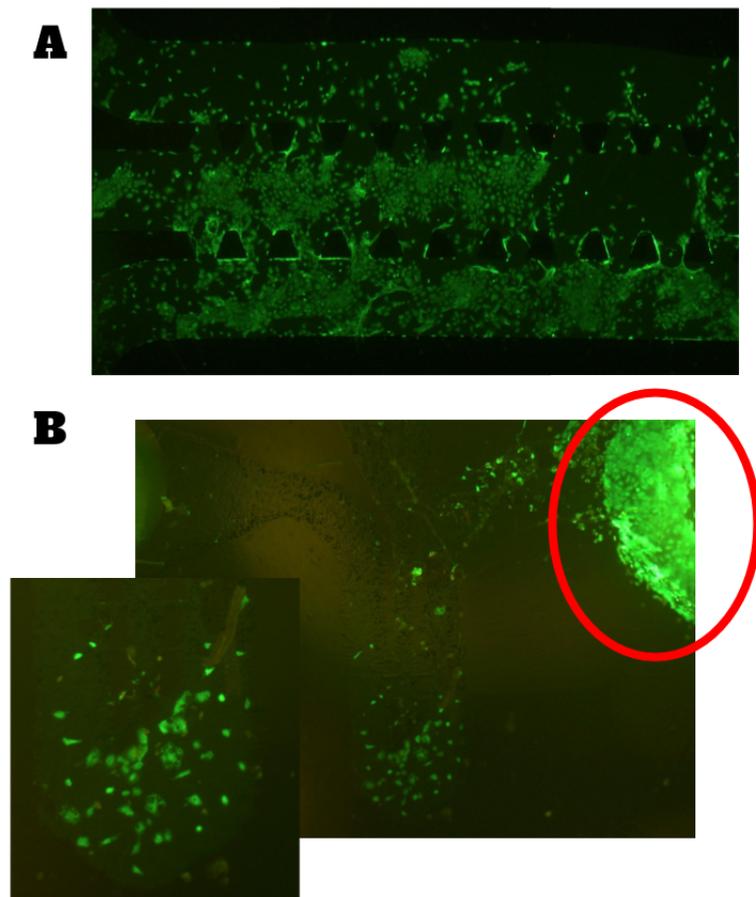


Figura 5-9: Imagen de microscopio de fluorescencia después de 4 días de cultivo y teñir las células con calceína en andamio procedente de fotolitografía (A) y grabado láser (B). Circundado en rojo se muestra la confluencia celular a la salida del andamio.

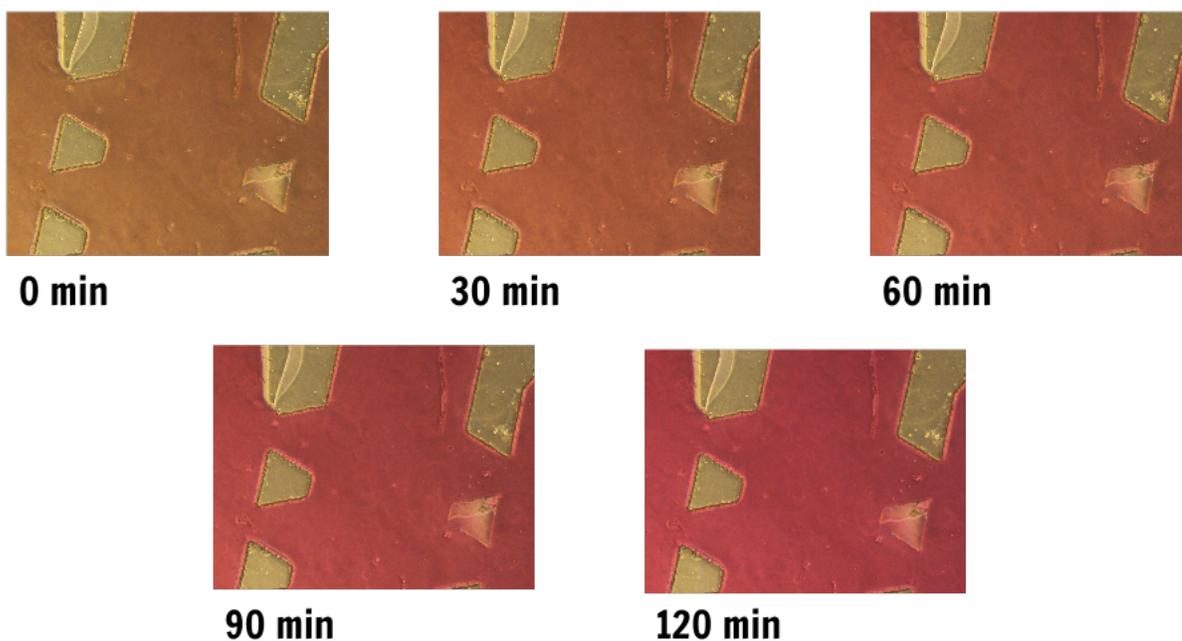


Figura 5-10: Muestreo del cambio de color de rojo de fenol dentro del dispositivo microfluido en el tiempo.

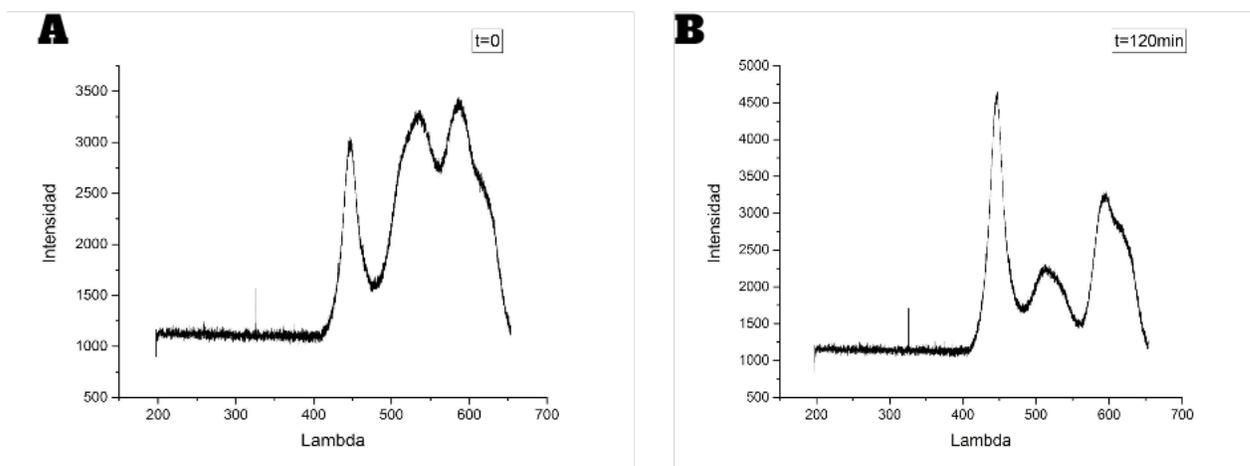


Figura 5-11: Espectros de transmisión del rojo de fenol en los canales, al salir de la incubadora (A) y después de 2 horas (B).

Capítulo 6

Conclusiones y trabajo a futuro

Al concluir este trabajo se logró desarrollar un protocolo de fabricación de dispositivos microfluídicos, el cual es aplicable a diversas áreas y aplicaciones. Con este método se obtiene un chip que es flexible, transparente, hermético, biocompatible y a la medida, además de ser muy fácil de implementar, en un intervalo corto de tiempo .

En particular, se demostró que es posible la elaboración de andamios celulares con las herramientas disponibles en el LaNSBioDyT. Esto abre la puerta y nos introduce a áreas en desarrollo en México y a nivel mundial, como lo es la ingeniería de tejidos, entre otras.

Con el protocolo y el estudio de caso desarrollado se evidencian los puntos en los que tenemos que enfocarnos para realizar las modificaciones necesarias en el diseño y procedimiento y lograr el cometido de un andamio biomimético funcional. Por ejemplo, las fenestraciones que interconectan los tres canales y contienen las células deben ser modificadas para que efectivamente contengan las células, disminuyendo su espaciamiento. Es por ello la importancia y la necesidad de optimizar el método de réplica de estructuras realizadas en el equipo de microestereolitografía Nanoscribe, dado que gracias a sus propiedades de microfabricación se pueden realizar andamios estructurados con resolución submicrométrica.

Otro factor importante a cuidar es la concentración de células insertadas al canal, las cuales no pueden ser pocas, porque no abarcan el andamio y tampoco interactúan entre ellas (factor importante para el biomimetismo), ni en exceso porque la sobresaturación provoca muerte celular.

Es importante resaltar que el diseño desarrollado y presentado en esta tesis (un canal central conectado con dos exteriores) es un diseño versátil, utilizado en otras aplicaciones muy a menudo, puesto que tiene la característica de imitar una barrera endotelial,

presente en todos los órganos, además de que permite delimitar dos o más sustancias pero permite interactúen entre estas por medio de la difusión. Otras de sus ventajas es la capacidad de crear gradientes.

Otro componente que se puede optimizar en la plataforma consistiría en promover la adhesión celular dentro del andamio por inmovilización de proteínas en la superficie del canal. Y aunque se demostró que es posible tener un cultivo celular dentro del andamio, esta técnica de inmovilización ayudaría a contener un mayor número de células en el canal, importante para el estudio de interacción celular, pero sobre todo para el biomimetismo, ya que como se mencionó, *in vivo* la concentración celular es alta y el flujo solo rodea el intersticio.

Por otro lado, para el desarrollo de toda plataforma microfluídica es esencial el control de la velocidad y presión del flujo, factor que tiene que ser estandarizado para garantizar:

1. El aporte continuo y homogéneo de nutrientes en el andamio.
2. La estimulación hemodinámica constante y coherente con el modelo *in vivo* de cada línea celular.
3. La introducción controlada de la alícuota en el canal, y evitar esfuerzos sobre las células perjudiciales, provocadas por un exceso de presión al ser incorporadas en los canales.

Desafortunadamente durante el desarrollo de este trabajo no se contó con alguna herramienta que nos facilitara un control preciso y ajustable a nuestra necesidades. Hoy en día ya se cuenta en el laboratorio con bombas especializadas en microfluídica con las que será posible el control de los parámetros antes mencionados.

Si bien, no se logró concluir la fabricación de una plataforma con microflujo para cultivo celular, esta tesis es una introducción a los procesos de microfabricación y desarrollo de plataformas microfluídicas. De igual manera, contar con un protocolo de fabricación permite la inclusión de nuevos integrantes que deseen iniciarse en el tema de dispositivos microfluídicos, reduciendo el tiempo de introducción a la técnica.

Cabe mencionar que al comienzo de este trabajo se contaba con un procedimiento no estandarizado, ni escrito y poco confiable de fabricación de canales en PDMS. Este procedimiento consideraba de uno a dos días. Al concluir este trabajo se ha optimizado cuantitativamente el tiempo de fabricación a 3 horas aproximadamente, en ambos casos sin considerar las 48 horas de curado del PDMS..

La experiencia obtenida nos muestra que no es un esfuerzo fácil, ni mucho menos individual, el lograr una plataforma de cultivo celular que asemeje el microambiente

celular. Pero después de esta tesis se cuenta con nuevas herramientas, ideas y visión para lograrlo.

Bibliografía

- [1] Centro nacional de trasplantes, http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html. online, 2016.
- [2] O'Brien Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3):88–95, mar 2011.
- [3] Robert Langer and Joseph P. Vacanti. Tissue engineering. 2008.
- [4] Philip J. Lee, Paul J. Hung, and Luke P. Lee. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5):1340–1346, 2007.
- [5] Gahl Levy, David Bomze, Stefan Heinz, Sarada Devi Ramachandran, Astrid Noerenberg, Merav Cohen, Oren Shibolet, Ella Sklan, Joris Braspenning, and Yaakov Nahmias. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat Biotechnol*, 33(12):1264–1271, oct 2015.
- [6] Matthias Mehling and Savaş Tay. Microfluidic cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 25:95–102, feb 2014.
- [7] A. Carrel. PURE CULTURES OF CELLS. *Journal of Experimental Medicine*, 16(2):165–168, aug 1912.
- [8] Edmond W. K. Young and David J. Beebe. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chemical Society Reviews*, 39(3):1036, 2010.
- [9] Frank A Gomez. *Biological applications of microfluidics*. John Wiley & Sons, 2008.
- [10] Mukund Gupta, Bibhu Ranjan Sarangi, Joran Deschamps, Yasaman Nematbakhsh, Andrew Callan-Jones, Felix Margadant, René-Marc Mège, Chwee Teck Lim, Raphaël Voituriez, and Benoît Ladoux. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nature Communications*, 6:7525, jun 2015.

- [11] Donald L Elbert. Bottom-up tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5):674–680, oct 2011.
- [12] B. P. Chan and K. W. Leong. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(S4):467–479, nov 2008.
- [13] Rebecca G. Wells. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*, 47(4):1394–1400, jan 2008.
- [14] Rebecca G. Wells. Tissue mechanics and fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(7):884–890, jul 2013.
- [15] Sebastian Mueller. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, page 49, may 2010.
- [16] Francesca Gattazzo, Anna Urciuolo, and Paolo Bonaldo. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8):2506–2519, aug 2014.
- [17] Linda G. Griffith. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(1):83–95, jun 2002.
- [18] Aftin M. Ross, Zhongxiang Jiang, Martin Bastmeyer, and Joerg Lahann. Physical aspects of cell culture substrates: Topography, roughness, and elasticity. *Small*, 8(3):336–355, dec 2011.
- [19] William J. Polacheck, Ran Li, Sebastien G. M. Uzel, and Roger D. Kamm. Microfluidic platforms for mechanobiology. *Lab on a Chip*, 13(12):2252, 2013.
- [20] A. Dash, M. B. Simmers, T. G. Deering, D. J. Berry, R. E. Feaver, N. E. Hastings, T. L. Pruett, E. L. LeCluyse, B. R. Blackman, and B. R. Wamhoff. Hemodynamic flow improves rat hepatocyte morphology, function, and metabolic activity in vitro. *AJP: Cell Physiology*, 304(11):C1053–C1063, mar 2013.
- [21] Lei Li, Yang Yang, Xuetao Shi, Hongkai Wu, Hongda Chen, and Jing Liu. A microfluidic system for the study of the response of endothelial cells under pressure. *Microfluidics and Nanofluidics*, 16(6):1089–1096, oct 2013.
- [22] P. Tabeling and S. Chen. *Introduction to Microfluidics*. OUP Oxford, 2010.

- [23] Björn Harink, Séverine Le Gac, Roman Truckenmüller, Clemens van Blitterswijk, and Pamela Habibovic. Regeneration-on-a-chip? the perspectives on use of microfluidics in regenerative medicine. *Lab on a Chip*, 13(18):3512, 2013.
- [24] Amy L. Paguirigan and David J. Beebe. From the cellular perspective: exploring differences in the cellular baseline in macroscale and microfluidic cultures. *Integrative Biology*, 1(2):182, 2009.
- [25] Skarphedinn Halldorsson, Edinson Lucumi, Rafael Gómez-Sjöberg, and Ronan M.T. Fleming. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 63:218–231, jan 2015.
- [26] Yi Zheng, John Nguyen, Yuan Wei, and Yu Sun. Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization. *Lab on a Chip*, 13(13):2464, 2013.
- [27] Amy L. Paguirigan and David J. Beebe. Microfluidics meet cell biology: bridging the gap by validation and application of microscale techniques for cell biological assays. *BioEssays*, 30(9):811–821, sep 2008.
- [28] Samuel K. Sia and George M. Whitesides. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *ELECTROPHORESIS*, 24(21):3563–3576, nov 2003.
- [29] Da Yoon No, Kwang-Ho Lee, Jaeseo Lee, and Sang-Hoon Lee. 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab Chip*, 15(19):3822–3837, 2015.
- [30] Amit Kumar and George M. Whitesides. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, 63(14):2002, 1993.
- [31] Srivatsan Kidambi, Lufang Sheng, Martin L. Yarmush, Mehmet Toner, Ilsoon Lee, and Christina Chan. Patterned co-culture of primary hepatocytes and fibroblasts using polyelectrolyte multilayer templates. *Macromolecular Bioscience*, 7(3):344–353, mar 2007.
- [32] Salman R Khetani and Sangeeta N Bhatia. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nature Biotechnology*, 26(1):120–126, nov 2007.

- [33] Imen Elloumi Hannachi, Kazuyoshi Itoga, Yoshikazu Kumashiro, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, and Teruo Okano. Fabrication of transferable micropatterned-co-cultured cell sheets with microcontact printing. *Biomaterials*, 30(29):5427–5432, oct 2009.
- [34] Yekaterina S. Zinchenko and Robin N. Cogger. Engineering micropatterned surfaces for the coculture of hepatocytes and kupffer cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 75A(1):242–248, 2005.
- [35] J Landry, D Bernier, C Ouellet, R Goyette, and N Marceau. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *The Journal of cell biology*, 101 3:914–23, 1985.
- [36] Seung-A Lee, Da Yoon No, Edward Kang, Jongil Ju, Dong-Sik Kim, and Sang-Hoon Lee. Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte–hepatic stellate cell interactions and flow effects. *Lab on a Chip*, 13(18):3529, 2013.
- [37] Yosuke Nakao, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Sakai, and Teruo Fujii. Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device. *Biomicrofluidics*, 5(2):022212, 2011.
- [38] Yan Wang, Yi-Chin Toh, Qiushi Li, Bramasta Nugraha, Baixue Zheng, Thong Beng Lu, Yi Gao, Mary Mah Lee Ng, and Hanry Yu. Mechanical compaction directly modulates the dynamics of bile canaliculi formation. *Integr. Biol.*, 5(2):390–401, 2013.
- [39] Chen-Ta Ho, Ruei-Zeng Lin, Rong-Jhe Chen, Chung-Kuang Chin, Song-En Gong, Hwan-You Chang, Hwei-Ling Peng, Long Hsu, Tri-Rung Yew, Shau-Feng Chang, and Cheng-Hsien Liu. Liver-cell patterning lab chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue. *Lab on a Chip*, 13(18):3578, 2013.
- [40] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, and D. E. Ingber. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 328(5986):1662–1668, jun 2010.
- [41] Dongeun Huh, Yu suke Torisawa, Geraldine A. Hamilton, Hyun Jung Kim, and Donald E. Ingber. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-chips. *Lab on a Chip*, 12(12):2156, 2012.

- [42] Dongeun Huh, Hyun Jung Kim, Jacob P Fraser, Daniel E Shea, Mohammed Khan, Anthony Bahinski, Geraldine A Hamilton, and Donald E Ingber. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nature Protocols*, 8(11):2135–2157, oct 2013.
- [43] Eric K. Sackmann, Anna L. Fulton, and David J. Beebe. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491):181–189, mar 2014.
- [44] George M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373, jul 2006.
- [45] Jamil El-Ali, Peter K. Sorger, and Klavs F. Jensen. Cells on chips. *Nature*, 442(7101):403–411, jul 2006.
- [46] Leslie Y. Yeo, Hsueh-Chia Chang, Peggy P. Y. Chan, and James R. Friend. Microfluidic devices for bioapplications. *Small*, 7(1):12–48, nov 2010.
- [47] J. Cooper McDonald, David C. Duffy, Janelle R. Anderson, Daniel T. Chiu, Hongkai Wu, Olivier J. A. Schueller, and George M. Whitesides. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21(1):27–40, jan 2000.
- [48] Nam-Trung Nguyen and Steven T Wereley. *Fundamentals and applications of microfluidics*. Artech House, 2002.
- [49] Henrik Bruus. Theoretical microfluidics. Lecture notes, third edition, fall 2006, 2006.
- [50] David J. Beebe, Glennys A. Mensing, and Glenn M. Walker. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4(1):261–286, aug 2002.
- [51] Sandeep Arya, Saleem Khan, Akhil Vaid, Harneet Kour, and Parveen Lehana. Microfluidic mechanics and applications: a review. *Journal of Nano- and Electronic Physics*, 5(4), 2013. Copyright - Copyright Sumy State University, Journal of Nano - and Electronic Physics 2013; Última actualización - 2015-06-01.
- [52] P. Abgrall and N.T. Nguyen. *Nanofluidics*. Artech House, 2009.
- [53] Keith Herold and Avraham Rasooly. *Lab on a Chip Technology: Fabrication and microfluidics*, volume 1, chapter Introduction to Microfluidics. Horizon Scientific Press, 2009.

- [54] Anthony Grimes, David N. Breslauer, Maureen Long, Jonathan Pegan, Luke P. Lee, and Michelle Khine. Shrinky-dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns. *Lab Chip*, 8(1):170–172, 2008.
- [55] M. Mihailescu, I. A. Paun, M. Zamfirescu, C. R. Luculescu, A. M. Acasandrei, and M. Dinescu. Laser-assisted fabrication and non-invasive imaging of 3D cell-seeding constructs for bone tissue engineering. *J Mater Sci*, 51(9):4262–4273, jan 2016.
- [56] Mangirdas Malinauskas, G Kiršanskė, S Rekštytė, T Jonavičius, E Kaziulionytė, L Jonušauskas, A Žukauskas, Roaldas Gadonas, and Algis Piskarskas. Nanophotonic lithography: a versatile tool for manufacturing functional three-dimensional micro-/nano-objects. *Lithuanian Journal of Physics*, 52(4), 2013.
- [57] Nanotools. Two-photon polymerization, 2016. Revisado 22 Junio 2016.
- [58] Carol I H Ashby. *Thin film processes II*, volume 2, chapter V-3 Laser-driven etching, pages 783–856. Academic press, 2012.
- [59] Keyffer J Salas P, VÁctor J Garica, Freddy FernÁndez-Rojas, and Carlos FernÁndez-Rojas. Regímenes de ablación láser en la elaboración de películas delgadas. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 25:121 – 126, 12 2010.
- [60] Lucia Cabriales Torrijo. Estudio de la microestructuración del polidimetilsiloxano por grabado láser y sus aplicaciones. Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015. Tesis Licenciatura.
- [61] Daniel Pérez Calixto. Fabricación y caracterización de guías de onda poliméricas para desarrollar microchips ópticos. mathesis, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
- [62] Jungkyu Kim, Rajesh Surapaneni, and Bruce K. Gale. Rapid prototyping of microfluidic systems using a PDMS/polymer tape composite. *Lab on a Chip*, 9(9):1290, 2009.
- [63] Mohan K. S. Verma, Abhijit Majumder, and Animangsu Ghatak. Embedded template-assisted fabrication of complex microchannels in PDMS and design of a microfluidic adhesive. *Langmuir*, 22(24):10291–10295, nov 2006.

- [64] YueFei Jia, JiaHuan Jiang, XiaoDong Ma, Yuan Li, HeMing Huang, KunBao Cai, ShaoXi Cai, and YunPeng Wu. PDMS microchannel fabrication technique based on microwire-molding. *Sci. Bull.*, 53(24):3928–3936, dec 2008.
- [65] Suk-Heung Song, Chang-Keun Lee, Tae-Jin Kim, In cheol Shin, Seong-Chan Jun, and Hyo-Il Jung. A rapid and simple fabrication method for 3-dimensional circular microfluidic channel using metal wire removal process. *Microfluidics and Nanofluidics*, 9(2-3):533–540, jan 2010.
- [66] Michael W. Toepke and David J. Beebe. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab on a Chip*, 6(12):1484, 2006.
- [67] Younan Xia and George M. Whitesides. SOFT LITHOGRAPHY. *Annual Review of Materials Science*, 28(1):153–184, aug 1998.
- [68] Jo Kuncova-Kallio and Pasi J. Kallio. PDMS and its suitability for analytical microfluidic devices. In *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), aug 2006.
- [69] Guisheng Zhuang and Jörg P Kutter. Anti-stiction coating of pdms moulds for rapid microchannel fabrication by double replica moulding. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 21(10):105020, 2011.
- [70] Chenying Yang, Wei Wang, and Zhihong Li. Optimization of corona-triggered PDMS-PDMS bonding method. In *2009 4th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 2009.
- [71] Kai-Seng Koh, Jitkai Chin, Joanna Chia, and Choon-Lai Chiang. Quantitative studies on PDMS-PDMS interface bonding with piranha solution and its swelling effect. *Micromachines*, 3(4):427–441, may 2012.
- [72] S. Lopera and R. D. Mansano. Plasma-based surface modification of polydimethylsiloxane for PDMS-PDMS molding. *ISRN Polymer Science*, 2012:1–5, 2012.
- [73] C. Shea Thompson and Adam R. Abate. Adhesive-based bonding technique for PDMS microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 13(4):632, 2013.

- [74] Hongkai Wu, Bo Huang, and Richard N. Zare. Construction of microfluidic chips using polydimethylsiloxane for adhesive bonding. *Lab on a Chip*, 5(12):1393, 2005.
- [75] Mark A Eddings, Michael A Johnson, and Bruce K Gale. Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18(6):067001, apr 2008.
- [76] Alejandro Kayum Jiménez Zenteno. Fabricación de microsistemas y máscaras de alta resolución con tecnología láser. Master’s thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- [77] M. Hautefeuille, L. Cabriales, R. Pimentel-Domínguez, V. Velázquez, J. Hernández-Cordero, L. Oropeza-Ramos, M. Rivera, M. P. Carreón-Castro, M. Grether, and E. López-Moreno. New perspectives for direct PDMS microfabrication using a CD-DVD laser. *Lab on a Chip*, 13(24):4848, 2013.
- [78] Lucia Cabriales, Mathieu Hautefeuille, Gerardo Fernández, Victor Velázquez, Marcela Grether, and Enrique López-Moreno. Rapid fabrication of on-demand high-resolution optical masks with a CD–DVD pickup unit. *Appl. Opt.*, 53(9):1802, mar 2014.
- [79] W.R. Ashurst, C. Carraro, and R. Maboudian. Vapor phase anti-stiction coatings for MEMS. *IEEE Transactions on Device and Materials Reliability*, 3(4):173–178, dec 2003.
- [80] Kathryn Haubert, Tracy Drier, and David Beebe. PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system. *Lab on a Chip*, 6(12):1548, 2006.
- [81] Francis Kiernan. The anatomy and physiology of the liver. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 123:711–770, 1833.
- [82] Lin Wang, Bing Sun, Katherine S. Ziemer, Gilda A. Barabino, and Rebecca L. Carrier. Chemical and physical modifications to poly(dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of caco-2 cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 9999A:NA–NA, 2009.