



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Desarrollo de membranas porosas de Colágena tipo I para
dispositivos Lab-on-chip**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICA

P R E S E N T A :

Ana Ximena Monroy Romero



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille
2019**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Monroy
Romero
Ana Ximena
26143433
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Física
310208154

2. Datos del Tutor

Dr
Mathieu Christian Anne
Hautefeuille

3. Datos del sinodal 1

Dra
Catalina Elizabeth
Stern
Forgach

4. Datos del sinodal 2

Dra
Patricia
Guadarrama
Acosta

5. Datos del sinodal 3

Dra
María del Pilar
Carreón
Castro

6. Datos del sinodal 4

Dr
Francisco Manuel
Sánchez
Arévalo

7. Datos del trabajo escrito

Desarrollo de membranas porosas de Colágena tipo I para dispositivos Lab-on-chip
80p
2019

Agradecimientos

A mi mamá y mi tía, quienes me han apoyado siempre. Por todo lo que hemos compartido que nos ha llevado hasta este momento y por que podamos compartir mucho más.

A Diego, por ser compañero y caminar junto a mí. Con todo mi amor.

A Alan, Emiliano, Hilda, Ian, Mariana, Panxo (Luis) y Shareny, por ser familia más que amigos. Por siempre poder compartir risas o lágrimas con ustedes.

A mis compañeras y compañeros durante la carrera con quienes compartí tardes de trabajo y desvelos. Por ser parte de este logro.

Al Dr. Mathieu Hautefeuille por su apoyo y confianza.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Micro y Nanotecnología (esperando que estas líneas compensen mis discursos previos fallidos). Por siempre estar abiertos a la discusión y a compartir sus conocimientos. Me inspiran a cada día mejorar. Es un gusto y honor trabajar día a día con ustedes.

A los miembros del jurado por su tiempo entregado a la revisión de mi trabajo, así como sus comentarios.

A los proyectos DGAPA-PAPIIT IT102017 y CONACyT-FORDECyT 272894 por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al LaNSBioDyT y la Facultad de Ciencias por permitir mi formación en sus espacios.

A la UNAM por ser mi segunda casa.

Agradecimientos Técnicos

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio por su guía durante la fabricación de las membranas y en las pruebas de cultivo.

Al M. en I. Raúl Sánchez Olvera y al Fís. Francisco Paéz Larios por su apoyo en la fabricación de los moldes utilizados en este trabajo a través de ablación láser y maquinado CNC, respectivamente.

Al Fís. Diego Zamarrón Hernández por realizar las mediciones de perfilometría y microindentación.

Al Fís. Yasab Ruiz Hernández por realizar las mediciones de microscopía de fuerza atómica.

Al Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille por su apoyo para realizar la microscopía electrónica de barrido.

Al Laboratorio de Nanopelículas del Instituto de Ciencias Nucleares, en particular a la Dra. Pilar Carreón Castro y a la Dra. Violeta Álvarez Venicio por su apoyo en la obtención de los espectros FTIR.

A la Dra. Beatriz Díaz Bello por su colaboración durante el cultivo celular en los chips.

Resumen

El desarrollo de dispositivos Lab-on-Chip ha permitido traducir procesos realizados usualmente en un laboratorio a dispositivos miniaturizados que se basan en el uso desde micro hasta nanoflujos, reduciendo así la cantidad de reactivos utilizados.

Una de las aplicaciones de estos dispositivos son los llamados órganos en chip, dispositivos poliméricos biocompatibles que buscan mimetizar el microambiente celular de tejidos y órganos. En particular un elemento crucial a imitar es la matriz extracelular que es el componente no celular de los tejidos que da soporte a las células, permite la interacción entre células a través de esfuerzos mecánicos, divide el espacio extracelular y permite el intercambio de nutrientes y productos de desecho. Con este fin se han generado procedimientos para fabricar membranas poliméricas microestructuradas. Dichos procesos de fabricación llegan a ser difíciles de replicar, además de que no necesariamente ofrecen un control en la rigidez del sustrato y requieren tratamiento posterior con proteínas para promover la adhesión celular.

En este trabajo presentamos un procedimiento de fabricación de membranas porosas de Colágena tipo I, proteína fibrilar nativa de la matriz extracelular, que fue estandarizado. Así como el procedimiento para integrar estas membranas a bloques poliméricos con microcanales para generar un dispositivo organ-on-chip, que también fue estandarizado.

De las membranas se caracterizó su espesor, topografía, microestructuración, rigidez, permeabilidad y envejecimiento; propiedades importantes a conocer para garantizar un sustrato válido para cultivo celular que evite la migración celular a través de ella pero, a su vez, permita procesos de difusión.

Como validación biológica se sembraron células HepG2, provenientes de un hepatocarcinoma humano, y fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 a cada lado de la membrana, es decir se realizó un cocultivo, cuya viabilidad se mantuvo durante dos semanas.

Adicionalmente, de este trabajo surgen 2 protocolos en idioma español con el formato establecido por el Sistema de Gestión de la Calidad por el que se rige el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT).

Índice general

1. Introducción	1
1.1. ¿Qué es un dispositivo Lab-on-Chip?	1
1.2. Organ-on-Chip	1
1.3. ¿Para qué una membrana porosa?	2
1.4. Colágena	4
1.5. Objetivos	5
1.5.1. General	5
1.5.2. Particulares	5
2. Procesos de Fabricación	6
2.1. Polidimetilsiloxano (PDMS)	6
2.2. Membranas de Colágena Tipo I	7
2.3. Membranas de Colágena Tipo I agregando un material sacrificial	9
2.4. Integración de membrana porosa a bloques de PDMS	11
3. Caracterización de las Membranas de Colágena tipo I	14
3.1. Perfilometría de Contacto	14
3.2. Microscopía de Fuerza Atómica	15
3.3. Microscopía Electrónica de Barrido	18
3.3.1. Diferentes sustratos	21
3.4. Pruebas Mecánicas a través de Microindentación	24
3.4.1. Evolución temporal de membranas de Colágena tipo I	24
3.4.2. Diferente pH de las soluciones de Colágena	26
3.4.3. Colágena tipo I con Alginato de Sodio	27
3.4.4. Diferentes sustratos	28
3.5. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier	30
3.5.1. Evolución temporal de membranas de Colágena	32
3.5.2. Tratamiento térmico	34
3.5.3. Colágena con Alginato de Sodio	36
3.6. Pruebas de Permeabilidad	38
4. Aplicaciones	44
4.1. Cultivo Celular: Antecedentes	44
4.2. Cultivo Celular sobre membrana de Colágena	45
4.3. Integración en un Chip con Cocultivo celular separado por membrana de Colágena	47

4.3.1. HepG2 - PAE	47
4.3.2. HepG2 - 3T3-L1	51
5. Discusión	58
6. Conclusiones	64
7. Perspectivas	66
Lista de abreviaturas	67
Bibliografía	68
A. Obtención del Módulo de Young a través del Modelo de Hertz	72
B. Espectros Infrarrojos	74
C. Portada LANSBIO-PROC-17	77
D. Portada LANSBIO-PROC-20	79

Índice de figuras

1.1.	Esquema de estructuración de una fibrilla de Colágena [17].	4
2.1.	Ciclo de fabricación de réplicas de PDMS a partir de un molde maestro. . .	7
2.2.	Ciclo de fabricación de membranas de Colágena tipo I.	9
2.3.	Ciclo de fabricación de membranas de Colágena tipo I agregando Alginato de Sodio como material sacrificial.	11
2.4.	Esquema del proceso para integrar membrana a bloques de PDMS.	13
3.1.	Gráfica de un perfil del escalón formado por la membrana de Colágena fabricado con HBSS y el bloque de PDMS 10:1	15
3.2.	Mapa de color y vista 3D de la topografía de membranas de Colágena tipo I	16
3.3.	Mapa de color y vista 3D de la topografía de membranas de Colágena tipo I con alginato de sodio como material sacrificial en diferentes proporciones	17
3.4.	Microfotografías representativas de membranas de Colagena tipo I obtenidas a través de SEM.	19
3.5.	Microfotografías representativas de membranas de Colagena tipo I con material sacrificial en proporción 2:1 obtenidas a través de SEM.	20
3.6.	Microfotografías representativas de membranas de Colagena tipo I con material sacrificial en proporción 1:1 obtenidas a través de SEM.	20
3.7.	Microfotografías representativas de membranas de Colagena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 obtenidas a través de SEM.	21
3.8.	Microfotografía representativa obtenida a través de SEM de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 fabricada sobre sustrato de PDMS en proporción 20:1.	22
3.9.	Microfotografía representativa obtenida a través de SEM de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 fabricada sobre sustrato de PDMS en proporción 10:1.	23
3.10.	Microfotografía representativa obtenida a través de SEM de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 fabricada sobre sustrato de PDMS en proporción 7:1.	23
3.11.	Módulo de Young para membranas de Colágena tipo I tras 30 días de envejecimientos. Datos obtenidos de muestra sumergida en PBS.	25
3.12.	Módulo de Young para membranas de Colágena tipo I tras algunos días de envejecimientos. Datos obtenidos de muestra sumergida en agua desionizada.	25
3.13.	Módulo de Young Normalizado para membranas de Colágena tipo I a diferentes pH.	27

3.14. Módulo de Young para membranas de Colágena fabricadas con Alginato de Sodio en diferentes proporciones.	28
3.15. Módulo de Young para membranas de Colágena fabricadas sobre diferentes sustratos.	29
3.16. Módulo de Young para membranas de Colágena con Alginato de Sodio en proporción 1:2 fabricadas sobre diferentes sustratos.	29
3.17. Espectro infrarrojo de membranas de Colágena tipo I sobre un bloque de PDMS.	31
3.18. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS. 3800 cm^{-1} - 2800 cm^{-1}	32
3.19. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS. 1800 cm^{-1} - 900 cm^{-1}	33
3.20. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con DMEM. 3800 cm^{-1} - 2800 cm^{-1}	33
3.21. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS. 1800 cm^{-1} - 900 cm^{-1}	34
3.22. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS tras tratamientos térmicos. 3800 cm^{-1} - 2800 cm^{-1}	35
3.23. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS tras tratamientos térmicos. 1800 cm^{-1} - 900 cm^{-1}	35
3.24. Espectro infrarrojo de solución de Alginato de Sodio utilizado como material sacrificial.	36
3.25. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS agregando material sacrificial en diferentes proporciones. 3800 cm^{-1} - 2000 cm^{-1}	37
3.26. Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS agregando material sacrificial en diferentes proporciones. 1900 cm^{-1} - 900 cm^{-1}	37
3.27. Comparativo de gotas obtenidas tras cierto tiempo en contacto con una membrana que separaba una solución marcada de una sin marcar.	38
3.28. Gráfica de intensidad de Fluorescencia Relativa contra tiempo de contacto entre solución marcada y sin marcar separadas por diferentes membranas porosas.	40
3.29. Permeabilidad Relativa de diferentes membranas porosas.	41
3.30. Gráfica y ajuste lineal de Concentración de FITC Dextran vs Intensidad de Fluorescencia Relativa.	42
4.1. Fotografía de cultivo de 24 horas de HepG2 marcadas con Calceína sobre membrana de Colágena tipo I.	46
4.2. Chip de dos canales separados por membrana de Colágena tipo I.	47
4.3. Fotografía de la cámara de Neubauer con células PAE.	48
4.4. Esquema de una caja de Petri donde se coloca el chip.	49
4.5. Microfotografía de células HepG2 marcadas con MitoTracker al ser excitadas.	50
4.6. Microfotografía de células HepG2 24 horas de cultivo.	50
4.7. Chips fabricados a partir de un molde de CNC.	51
4.8. Evolución del cultivo de células HepG2 en una membrana de Colágena contenido en un chip microfluídico.	53
4.9. Canal del chip 05 enfocado en el plano de las células 3T3-L1.	54

4.10. Canal del chip 06 enfocado en el plano de las células 3T3-L1 objetivo 4x . . .	55
4.11. Canal del chip 06 enfocado en el plano de los HepG2 con una semana de cultivo.	56
4.12. Construcción 3D del chip 06 obtenida de las imágenes de confocal.	57
A.1. Una fuerza actuando en un semi-espacio elástico [44].	72
A.2. Una esfera rígida en contacto con un semi-espacio elástico [44].	73
B.1. Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con HBSS.	74
B.2. Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con DMEM.	75
B.3. Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con HBSS con tratamientos térmicos.	75
B.4. Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con un material sacrificial.	76

Capítulo 1

Introducción

1.1. ¿Qué es un dispositivo Lab-on-Chip?

Lab-on-chip es un término que se utiliza para describir dispositivos miniaturizados en los cuales se pueden llevar a cabo uno o varios procesos, que usualmente se realizan en un laboratorio. Se basan en el uso de canales y estructuras micro hasta nanométricas, por donde se hacen pasar flujos de nano hasta microlitros por segundo. Sus dimensiones van desde milímetros hasta centímetros y pueden fabricarse a través de diferentes métodos como litografía suave o grabado láser y en diferentes sustratos como vidrio o polímeros, dependiendo de la función que cumplirá el dispositivo y de los materiales que pueden emplearse [1]. A su vez, pueden integrarse en ellos sistemas electrónicos y ópticos que permitan la detección de procesos biológicos o químicos [2]. Las aplicaciones más comunes son la formación de micro y nanogotas, biosensores, órganos en chip, y estudios de células individuales.

1.2. Organ-on-Chip

Son dispositivos poliméricos biocompatibles que buscan biomimetizar el ambiente en que se encuentran las células que conforman a los órganos para su posterior estudio. Al hablar de biomimetismo, nos referimos a imitar las condiciones como la topografía del tejido, las dimensiones y geometría de los arreglos celulares así como los esfuerzos mecánicos y flujos a los que se ven sometidas las células.

Estos dispositivos surgieron como un eslabón entre el cultivo *in vitro*, donde las células se ven expuestas a un ambiente estático donde los nutrientes del medio de cultivo sólo llegan a las células por procesos de difusión, y sistemas *in vivo* donde las células obtienen oxígeno y nutrientes a través del flujo sanguíneo además de estar expuestas a diferentes señales bioquímicas y físicas [3]. Estas diferencias ocasionan que tanto la forma como funcionamiento de la célula cambien. De aquí surge la importancia del biomimetismo en estos dispositivos.

Los dispositivos organ-on-chip suelen ser utilizados para pruebas de metabolismo de fármacos, estudios de toxicidad, farmacología, investigación sobre cáncer y otras enferme-

dades [4].

1.3. ¿Para qué una membrana porosa?

En particular, para plataformas complejas con vascularización o de co-cultivo como hígado en chip, pulmón en chip, etc, uno de los elementos a mimetizar es la matriz extracelular.

La matriz extracelular es el componente no celular hallado en todos los tejidos y órganos. Es el andamio en el cual se da la adhesión celular, además provee señales bioquímicas y biomecánicas para procesos celulares como diferenciación y homeostasis. Tiene diversas funciones: soportar fuerzas de tensión o tracción, permitir la interacción entre células a través de esfuerzos mecánicos, dividir el espacio extracelular en áreas más pequeñas, permitir el intercambio de nutrientes y productos de desecho, regular la migración celular, entre otros. Establece las propiedades biomecánicas de cada órgano y cambios en ellos dan pie a diferentes enfermedades como la fibrosis. Está formada por Proteoglicanos (glucoproteínas) y proteínas fibrilares (Colágena tipo I, pequeñas cantidades de Colágena tipo III, VI y XII así como Elastina, Fibronectina y Laminina) [5].

Para integrar dicho elemento se ha reportado un amplio uso de membranas poliméricas porosas que separan canales microfluídicos [6]. Estas membranas deben ser caracterizadas en cuanto a:

- o Tamaño de poro: Al servir de barrera física, definir el tamaño de poro modula el paso a través de la membrana de diferentes biopartículas y células dependiendo de su tamaño y capacidad de deformarse. Este control tiene influencia en procesos como migración celular donde se ha demostrado que células endoteliales pueden atravesar poros desde 3 hasta 10 micrómetros de diámetro [7]. También se tiene un control en la comunicación celular que se puede llevar a cabo en el chip tanto para modelos de comunicación parácrina, donde las células secretan moléculas de señalización que recibirá otra célula; como para modelos de comunicación yuxtácrina, donde la comunicación se da a través del contacto e interacción célula-célula. Por ejemplo, se puede mencionar que al separar células por membranas de poros nanométricos que aseguran el paso sólo de partículas secretadas por las células como exosomas y microvesículas, se ha estudiado la comunicación parácrina en modelos de cáncer [8,9]. Mientras que se ha observado que fibroblastos producen protusiones que atraviesan poros de 0.9 micrómetros para lograr contacto físico con células endoteliales donde se permita señalización yuxtácrina [10].
- o Propiedades mecánicas: Se ha demostrado que el módulo elástico del sustrato en el cual las células son sembradas tiene influencia en su comportamiento, desde su morfología, hasta su destino y en procesos como migración y diferenciación. Los cultivos celulares tradicionales suelen realizarse sobre cajas de Petri de poliestireno o de vidrio cuyo módulo de Young se encuentra en el rango de gigapascales, a diferencia de los tejidos cuyos módulos de Young se reportan entre cientos de pascales y algunos kilopascales. Es por ello que el módulo elástico del sustrato debe conocerse

para saber si mimetiza, o se acerca, al del tejido. Por otro lado puede ser requerida una membrana que pueda ser deformada para mimetizar un estímulo mecánico en el cultivo. Como es el caso del pulmón en chip en que la membrana es deformada para simular el esfuerzo debido a la respiración [11].

- Propiedades de la superficie: Topografía: se ha observado que en sistemas donde el sustrato al cuál está adherido la célula es fibrilar, se tiene una mayor distancia de sensibilidad ante esfuerzos, tanto del mismo sustrato como de otras células que se encuentren en él. Mientras que en sustratos homogéneos, como es el caso de los hidrogeles, esta distancia disminuye [12]. Por lo que el tipo de sustrato a utilizar dará también el tipo de interacción que se pueda tener entre célula - sustrato. Química del sustrato: Por otro lado, para que haya adhesión celular, debe encontrarse en la superficie proteínas que promuevan la creación de enlaces célula-sustrato. Es por ello que sustratos poliméricos deben ser cubiertos o tratados con proteínas previo al cultivo.
- Transparencia: Para poder observar el cultivo en microscopía y el posterior tratamiento de los resultados obtenidos por imagenología, es necesario que el sustrato sea fabricado en un material transparente.
- Espesor: En sistemas de cocultivo, donde de cada lado de la membrana se siembran células, el espesor modulará la distancia entre ambos tipos celulares. Dependiendo del tejido que se busque mimetizar, se tendrá que variar el espesor de la membrana, por lo que es necesario conocer si el material utilizado nos permite realizar esta variación.
- Permeabilidad: Nuevamente, en sistemas de cocultivo o aquellos donde las células no se encuentren en contacto directo con la fuente de nutrientes, se debe permitir que haya una vía de difusión por la cual exista comunicación celular, o bien el paso de dichos nutrientes. La densidad de poros así como sus dimensiones modificarán la permeabilidad de estos factores a través de la membrana.

En algunos de los trabajos citados en el párrafo anterior se muestran los métodos de fabricación de las membranas porosas poliméricas que han sido utilizadas hasta ahora. Estos métodos suelen presentar pasos adicionales para lograr la microestructuración de moldes con los cuales se realizan las réplicas en polímeros, o bien la directa estructuración del material a través de procesos químicos que lo degraden selectivamente. En ambos casos se presentan técnicas que pueden ser difíciles y costosas de replicar, además de que se mantiene la necesidad de agregar proteínas nativas de la matriz extracelular al sustrato para promover la adhesión de las células a él.

Como alternativa a estas técnicas se ha reportado la fabricación de una membrana semipermeable, transparente y económica derivada de Colágena tipo I, proteína fibrilar nativa de la matriz extracelular [13]. Dicho procedimiento tiene como ventaja que evita procesos de microestructuración complicados al obtener su estructuración de la propia polimerización de la proteína, que da también la porosidad de la membrana. Por otro lado, la membrana resultante es fácil de manipular y puede integrarse a canales microfluídicos. Además, debido a su composición, directamente promueve la adhesión celular al sustrato.

1.4. Colágena

Las proteínas son biomoléculas formadas por unidades llamadas aminoácidos los cuales cuentan con un grupo amino (-NH), un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo residuo (R). Se conocen 20 aminoácidos en la naturaleza. La unión de dos o más aminoácidos a través de enlaces covalentes (enlaces peptídicos) entre el grupo carboxilo de uno y el grupo amino del otro forman péptidos. A su vez, una cadena de aminoácidos unido por enlaces peptídicos forma una cadena polipeptídica.

La Colágena es una proteína cuya estructura consta de tres cadenas polipeptídicas paralelas enrolladas en una conformación helicoidal izquierda que se enrollan una sobre la otra con un escalonamiento de un solo residuo para formar una triple hélice derecha. El empaquetado ajustado de las hélices dentro de la triple hélice obliga a cada tercer residuo ser glicina, aminoácido más pequeño (75.07 g/mol) lo que da como resultado una secuencia repetitiva de Gli-X-Y, donde X suele ser prolina (115.13 g/mol) y Y hidroxiprolina (131.13 g/mol), lo que hace a estos aminoácidos característicos de la Colágena. La estabilidad de la proteína está dada por puentes de hidrógeno formados entre las cadenas polipeptídicas, entre los grupos -NH de la glicina y los grupos -CO de los residuos de las otras cadenas. Diferencias en la estructura química de estas cadenas polipeptídicas da pie a identificar diferentes tipos de Colágena con diferentes propiedades y funciones.

En la Colágena fibrilar (tipo I, II, III, V, XI), la agregación de Tropocolágena, molécula de 300 nm de longitud con la estructura descrita anteriormente, forma microfibrillas que a su vez forman fibrillas. Dichas fibrillas son estructuras finas y alargadas que contienen estriaciones transversales con una periodicidad característica de 67 nm, determinada por la superposición de la molécula Tropocolágena. Particularmente, en la Colágena tipo I y III, esas fibrillas se asocian para formar fibras [14–16].

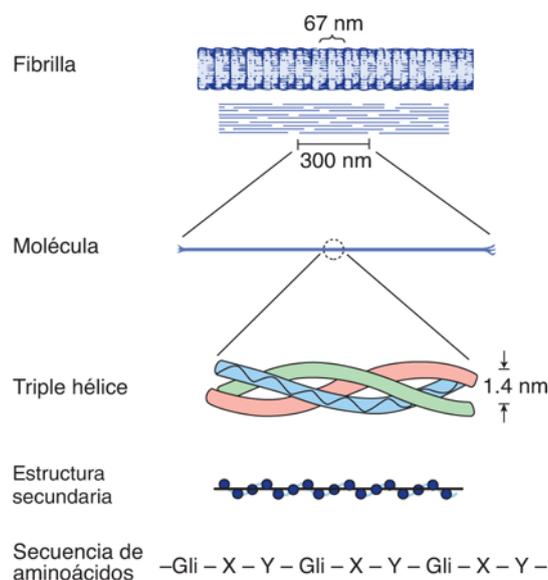


Figura 1.1: Esquema de estructuración de una fibrilla de Colágena [17].

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Estandarizar un procedimiento para la fabricación de membranas de Colágena tipo I, cuyas propiedades (espesor, rugosidad, microestructuración, Módulo de Young y permeabilidad) sean caracterizadas para asegurar su uso como sustrato para cultivo celular, así como establecer un procedimiento que permita la integración de la membrana a canales microfluídicos para finalmente tener un dispositivo Lab-on-chip.

1.5.2. Particulares

- Adaptar y estandarizar un procedimiento descrito en la literatura de fabricación de membranas porosas con Colágena tipo I para asegurar reproducibilidad y agregar una herramienta nueva al desarrollo de dispositivos órgano en chip en el LaNS-BioDyT.
- Caracterizar la membrana porosa fabricada para identificar si cumple con los valores de parámetros requeridos para su integración en un dispositivo órgano en chip. Se verificarán propiedades mecánicas (módulo de Young) ,de la superficie (topografía y rugosidad), espesor, permeabilidad y si se presentan cambios en ella debidos al envejecimiento.
- Comprobar si alguno de estos parámetros puede ser modulado a través del uso de un material sacrificial (Alginato de Sodio) para poder ampliar el rango de uso.
- Validar biológicamente la membrana porosa, es decir, comprobar la viabilidad como sustrato para cultivo celular y las características de las células sembradas en ella.
- Fabricar un dispositivo órgano en chip donde se pueda llevar acabo un cocultivo celular sin permitir la migración celular a través de la membrana pero donde existan procesos de difusión.

Capítulo 2

Procesos de Fabricación

Este capítulo iniciará describiendo el proceso de fabricación de los canales microfluídicos que integrarán al dispositivo organ-on-chip, para después proceder con el procedimiento para fabricar membranas de Colágena tipo I, así como el método para integrar ambos elementos en un solo dispositivo.

2.1. Polidimetilsiloxano (PDMS)

El PDMS es un polímero biocompatible, flexible, hidrofóbico, permeable a gases, estructurable y de rigidez modulable. Estas características, además de su fácil preparación y bajo costo lo hacen uno de los materiales más elegidos para la fabricación de andamios de tipo canales microfluídicos [18, 19]. Su fabricación se basa en mezclar una proporción dada de solución base y de agente curante que es polimerizada a través de un proceso térmico.

Existen diferentes técnicas de fabricación que permiten estructurar al PDMS. En particular se utilizará el proceso molde-réplica esquematizado en la figura 2.1, donde PDMS sin curar (polimerizar) se vierte en un molde previamente estructurado y es polimerizado sobre él (incisos A a C). Para esta técnica es necesario que el PDMS no se adhiera al material en que esté fabricado el molde ya que al desprender el material polimerizado es que se obtiene una réplica en negativo del molde. El proceso puede repetirse usando la réplica en PDMS, previamente tratada para evitar adhesión, como molde para obtener una segunda réplica idéntica al molde estructurado (incisos D a F).

Para este trabajo, se utilizaron como moldes a replicar bloques de Polimetilmetacrilato (PMMA) estructurado. Un molde fue estructurado a través de una máquina de control numérico por computadora (CNC) donde una punta se hace rotar a alta velocidad siguiendo una ruta sobre la superficie del material para desvastarlo, mientras que otro fue estructurado como se describe en [20] a través de un proceso de ablación láser con el equipo de microfabricación láser fabricado en el LaNSBioDyT.

Las réplicas fueron fabricadas con PDMS Sylgard 184 en proporción 10:1 (base:agente curante) que fue polimerizado a 60°C durante 48 horas, o bien a 150°C durante 2 horas.



Figura 2.1: Ciclo de fabricación de réplicas de PDMS a partir de un molde maestro. A) Se parte de un material que ha sido estructurado previamente que servirá como molde. B) Se prepara una mezcla de PDMS en la proporción deseada que es vertida sobre el molde. C) Tras un proceso térmico el PDMS habrá solidificado y se podrá retirar del molde obteniendo una réplica en negativo. D) Para utilizar esta réplica como nuevo molde, se debe dar un tratamiento que evite la adhesión de PDMS sin polimerizar a la superficie. E) Tras el tratamiento se vierte PDMS y se da tratamiento térmico para polimerizar el material. F) Se retira la nueva réplica que será idéntica al molde maestro.

2.2. Membranas de Colágena Tipo I

Se ha observado que factores como la concentración y pH de la solución de Colágena despolimerizada, así como el tiempo y temperatura de gelificación, tienen influencia tanto en la cantidad de fibras de Colágena formadas como en su diámetro y separación [21].

Como el proceso de fabricación se adaptó de [13], para hacer comparables los resultados se establece que dichos factores mantendrán el valor reportado de 2 mg/ml para la concentración, 37°C como temperatura de gelificación y 1 hora como tiempo de gelificación.

Es importante mencionar que al tratarse de elementos que se utilizarán en aplicaciones biológicas, como cultivo celular, se debe cuidar la esterilidad durante su fabricación. Este proceso se realizará dentro de la campana de flujo laminar BSC-1300IIA2-X Luzeren que cuenta con una clasificación II que asegura el filtro de aire proveniente del exterior de la cabina así como la recirculación del aire filtrado dentro de ella.

Dentro de la campana de flujo laminar, la solución stock de Colágena tipo I de cola de rata CORNING con una concentración de 3.57 mg/ml se lleva a la concentración establecida agregando medio de cultivo. Para ello se utilizaron Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) o bien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Lo anterior se realiza utilizando la relación

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \quad (2.1)$$

donde se despejará el volumen V_1 de la solución más concentrada C_1 que se debe colocar para lograr un volumen V_2 de la solución con concentración menor C_2 .

Tras una prueba de fabricación se observó que variar el pH de la solución de Colágena resultaba en muestras con características diferentes, reportadas en el capítulo 3, por lo que se determinó que la solución sería neutra (pH =7). Dicha neutralidad se obtuvo a través de un ensayo de titulación, adicionando un base fuerte [hidróxido de Sodio] a un

ácido débil [ácido acético 20 mM], comprobando el pH a través de tiras indicadoras de pH colorpHast de EM-Reagents.

Tras la fabricación de la solución, con una micropipeta, se distribuye una gota de 400 μl sobre un bloque plano de PDMS (Sylgard 184 con proporción 10:1), obtenido de replicar un portaobjetos de vidrio con 3 gramos de PDMS. El bloque a su vez se coloca dentro de una caja de Petri de poliestireno. Ambos sustratos deben ser permeables a gases para permitir que la solución seque tras haber gelificado y la altura del bloque estándar para que el tiempo de secado no varíe en cada fabricación.

Este recipiente se coloca después dentro de una incubadora sin CO_2 a 37 °C por una hora para obtener una solución gelificada. Es necesaria la ausencia de CO_2 ya que este acidifica la solución.

Se retira la caja de Petri de la incubadora y se deja secar la solución gelificada en un ambiente estéril durante una noche a temperatura ambiente. En este caso se coloca dentro de una campana con luz UV para PCR la cual se ha esterilizado previamente a través de 15 minutos de exposición.

En el proceso de secado la solución perderá volumen creando así la membrana. Las membranas se consideran totalmente secas cuando se puede observar en ellas residuos cristalizados como se observa en la figura 2.2 en la fila prima. Estos residuos provienen del medio de cultivo utilizado durante la fabricación y deben ser retirados a través de lavados que consisten en rehidratar la membrana con agua desionizada estéril durante cuatro horas a temperatura ambiente de las cuales 30 minutos se ponen a agitar a 25 revoluciones/minuto.

Se aspira el agua sobrante con ayuda de una línea de vacío y una pipeta Pasteur y se vuelve a tener un ciclo de secado como el descrito anteriormente dentro de la campana para PCR.

Finalmente se desprende la membrana del bloque de PDMS utilizando pinzas de punta fina. A esta membrana final se le pueden recortar los bordes para tener zonas uniformes con tijeras de disección. Se almacena para su posterior uso.

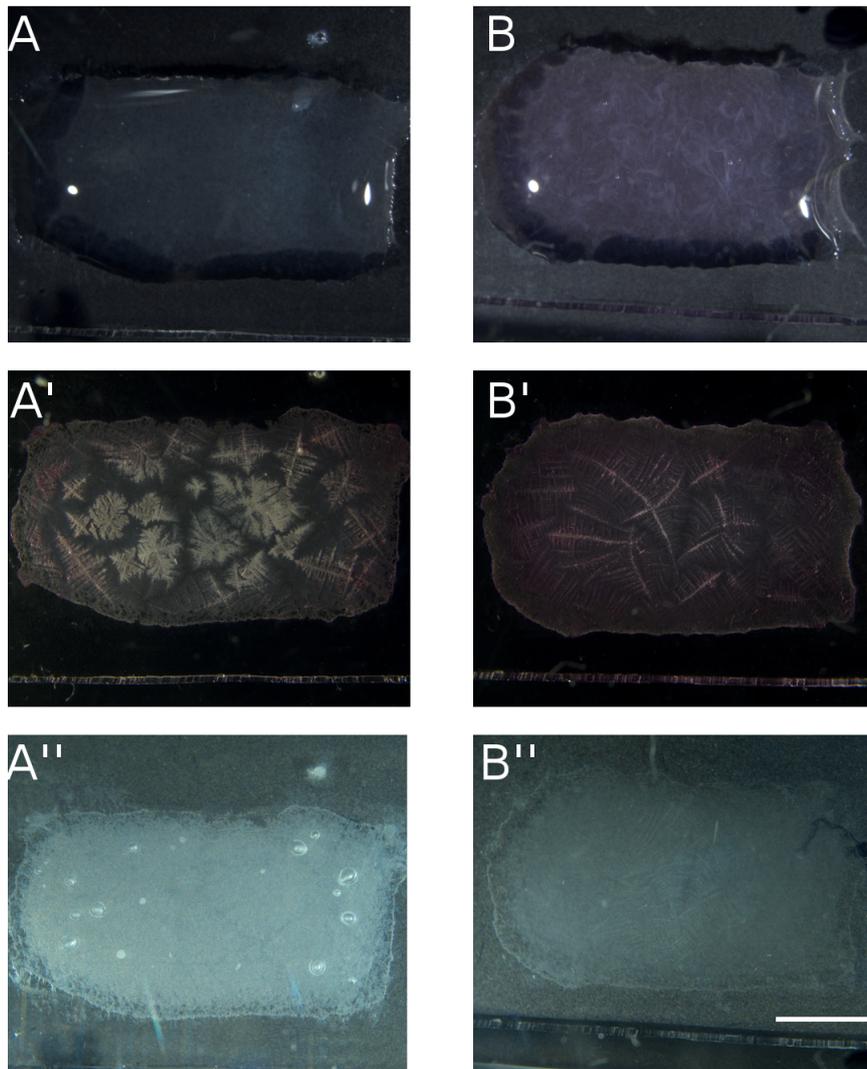


Figura 2.2: Ciclo de fabricación de membranas de Colágena tipo I. En la columna A se muestra las membranas a cada paso de la fabricación utilizando HBSS. Mientras en en la columna B las membranas fabricadas con DMEM. Primero el depósito de la gota, en la fila prima se muestra la membrana tras haber secado y en la fila biprima la membrana ya seca tras los lavados. Barra de escala correspondiente a 5 mm.

2.3. Membranas de Colágena Tipo I agregando un material sacrificial

Se describió en la sección anterior, el procedimiento para obtener una membrana conformada por una red de fibras de Colágena, donde, el espaciamiento entre las fibras generará poros que atraviesan la membrana volviéndola permeable. Se espera que al poder modular el espaciamiento entre las fibras, sin cambiar la composición final de la membrana, la permeabilidad sea también modulable. Para este fin se decide utilizar un material que no interfiera con la polimerización de la Colágena tipo I pero que ocupe un volumen

extra dentro de la solución para aumentar la distancia de separación entre las fibras, y que pueda ser retirado tras la obtención de la membrana.

Se utilizará Alginato de Sodio, que es un polisacárido soluble en agua, a una concentración de 10 mg/ml. La solución fue filtrada por un filtro de 0.22 μm . En este trabajo se referirá a él como material sacrificial.

El proceso de fabricación de las membranas en este caso es similar al descrito en la sección anterior. Al obtener la solución neutra de Colágena tipo I, se agrega el Alginato de Sodio en cierta proporción y se mezcla en un Vortex. Las proporciones de volumen de Colágena tipo I: volumen de Alginato de Sodio que se utilizaron en este trabajo fueron de 2:1, 1:1, y 1:2.

Tras obtener la solución de Alginato de Sodio y Colágena tipo I se colocan 400 μl de ella sobre un bloque de PDMS (Sylgard 184 10:1) y este a su vez en una caja de Petri de poliestireno.

Posteriormente se coloca en una incubadora sin CO_2 a 37 °C por una hora y se deja secar durante una noche en un ambiente estéril. Se toma la cristalización de las sales del medio como condición para considerar seca a la membrana como se observa en la figura 2.3. El lavado de este tipo de muestras con material sacrificial consiste de rehidratarlas con agua desionizada estéril durante 2 horas a 37 °C y dos horas a temperatura ambiente, de las cuales 30 minutos se ponen en agitación a 25 revoluciones/minuto.

Finalmente se retira el agua sobrante y se dejan secar nuevamente las muestras. Para desprender las membranas del bloque de PDMS se utilizan pinzas finas.

Las membranas de Colágena que se obtienen de los procedimientos anteriores son fáciles de recortar utilizando tijeras de disección para ajustarse a las dimensiones de cada chip.

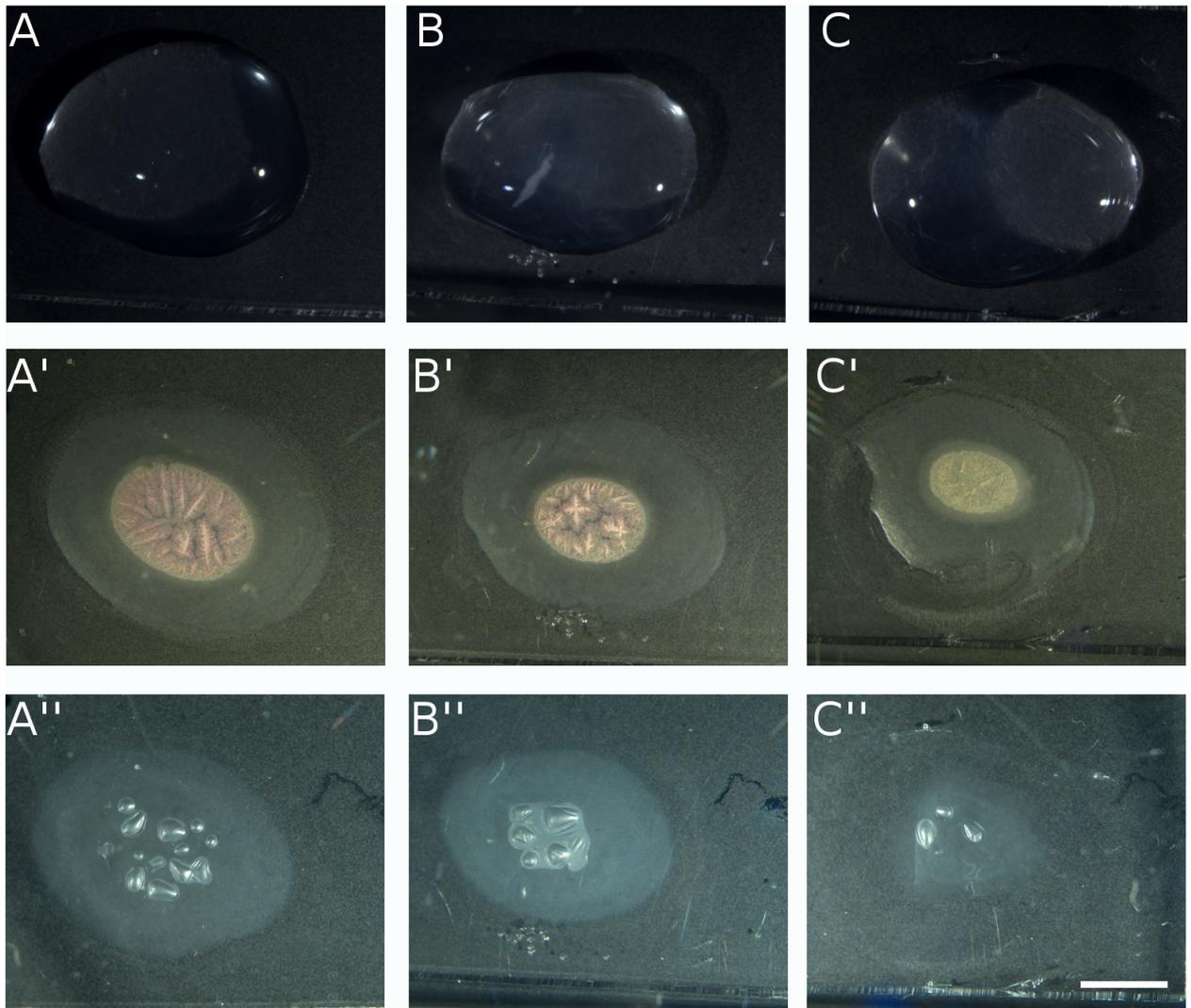


Figura 2.3: Ciclo de fabricación de membranas de Colágena tipo I agregando Alginato de Sodio como material sacrificial. En la columna A se muestra las membranas con material sacrificial en proporción 1:1 a cada paso de la fabricación . Mientras en en la columna B las membranas fabricadas con material sacrificial en proporción 2:1 y en la columna C las membranas con material sacrificial en proporción 1:2. Primero el depósito de la gota, en la fila prima se muestra la membrana tras haber secado y en la fila biprima la membrana ya seca tras los lavados. Barra de escala correspondiente a 5 mm.

2.4. Integración de membrana porosa a bloques de PDMS

Previo a iniciar la integración del chip microfluídico, se requiere haber fabricado los bloques de PDMS estructurados que servirán como base y tapa del chip. Además de la membrana de Colágena que los separará, recortada a las dimensiones necesarias.

El procedimiento para integrar a las membranas consiste en preparar PDMS Syglard 184 en proporción 10:3 que servirá como adhesivo para fabricar el chip. Aumentar la cantidad de agente curante en la mezcla de PDMS promueve mayor entrecruzamiento del material por lo que se aumenta la rigidez del material ya curado y aumenta la viscosidad de la solución, lo cual es importante para evitar que la solución llegue a los canales estructurados, bloqueándolos.

Para recubrir la cara del bloque de PDMS estructurado al que queremos adherir la membrana con el PDMS 10:3 previamente fabricado, se realiza un depósito del material sin curar sobre un portaobjetos de vidrio que será utilizado como tinta en un sello. El depósito es realizado a través de un spin coater Laurel donde, dada una velocidad de giro en revoluciones por minuto y la viscosidad del material, se tiene un control en el espesor del depósito.

El portaobjetos se coloca después sobre una parrilla a 90°C durante 30 segundos para promover la polimerización y aumentar la viscosidad del PDMS.

Si el bloque no ha sido perforado para agregar los inlets y outlets, es decir por donde entrará y saldrá el flujo, en este momento se debe perforar. Para esto pueden utilizarse perforadoras de diferente diámetro dependiendo de las dimensiones del canal. Además se limpia la superficie a cubrir con cinta adhesiva “mágica” que retira residuos que se encuentren en la superficie del PDMS sin dejar residuos de adhesivo.

El bloque estructurado a adherir se coloca boca abajo en contacto con el depósito de PDMS sin curar recién hecho, como se muestra en la figura 2.4. Después de verificar que se haya recubierto el bloque de PDMS estructurado, a través de un cambio visual donde el material pasa de observarse opaco a transparente, se retira el bloque estructurado y se coloca boca arriba sobre una superficie limpia.

Con ayuda de unas pinzas delgadas se coloca el fragmento de membrana ya recortado, cuidando cubrir todo el canal y que la membrana quede lo más extendida posible. Se deja curando durante una noche a temperatura ambiente.

El segundo bloque es preparado siguiendo el mismo procedimiento. Se alinea el canal inferior, en el que ha sido integrada la membrana, con el canal del bloque que acaba de ser recubierto y se presiona para unirlos. Finalmente se deja curando nuevamente a temperatura ambiente durante una noche.

Tras el periodo de polimerización, se puede verificar que el chip haya sellado correctamente, es decir que esté libre de fugas, al hacer pasar por cada canal independiente etanol al 70%. Si el etanol fluye sólo por el canal indicado, la fabricación del chip será considerada exitosa.

Es importante mencionar que este método de integración puede ser utilizado con cualquier membrana comercial.

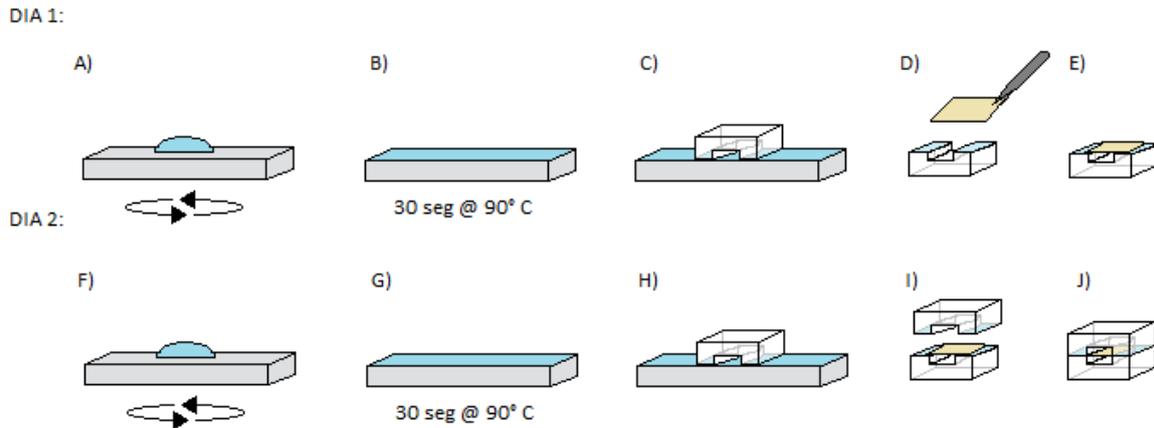


Figura 2.4: Esquema del proceso para integrar membrana a bloques de PDMS. A) se realiza un recubrimiento de PDMS 10:3 por Spin Coater a un portaobjetos de vidrio. B) Este recubrimiento se coloca en una parrilla a 90°C durante 30 segundos para aumentar su viscosidad. C) Sobre el recubrimiento se coloca el bloque de PDMS a adherir. D) Se retira del recubrimiento y se coloca sobre él la membrana porosa. E) El bloque y la membrana permanecen en temperatura ambiente durante una noche para permitir la polimerización del PDMS que adherirá la membrana al bloque estructurado. F) Se fabrica un nuevo recubrimiento. G) Es colocado en una parrilla. H) Se coloca el segundo bloque a adherir. I) Tanto el bloque con la membrana como el recién recubierto de PDMS se alinean. J) Ambos bloques son presionados y permanecen en temperatura ambiente durante una noche para permitir la polimerización del PDMS 10:3 que los adherirá.

Fotografías de chips fabricados con esta técnica se muestran en las figuras 4.2 y 4.7.

Existen factores que deben cuidarse durante la fabricación del chip ya que de existir, el sellado puede ser insatisfactorio y llevarán a fallas en los experimentos. Podemos mencionar:

- Que la parte de los bloques que se adherirán entre sí para integrar al chip sean planas y se encuentren libres de residuos de PDMS o polvo.
- Que las membranas queden lo más extendidas posibles, sin arrugas ni “elevaciones” en la zona donde se añadirá otro bloque de PDMS ya que estos desperfectos dificultan el sellado del chip.
- Al integrar los bloques de PDMS se debe cuidar que no queden burbujas entre ellos. Para evitar esto los chips pueden ser presionados y colocados bajo una masa que ejerza presión sobre ellos durante el proceso de polimerización del PDMS 10:3.

Capítulo 3

Caracterización de las Membranas de Colágena tipo I

En este capítulo se abordarán las pruebas con las que fueron caracterizadas las membranas de Colágena tipo I, incluyendo aquellas fabricadas agregando un material sacrificial. En cada sección se planteará los principios de cada método, la preparación de las muestras, los resultados y el análisis de ellos.

Iniciaremos con las pruebas enfocadas al estudio de la topografía de las membranas, seguido por el estudio de las propiedades mecánicas, un estudio sobre el envejecimiento y un comparativo de la permeabilidad de las diferentes membranas porosas incluyendo algunas comerciales.

3.1. Perfilometría de Contacto

Esta técnica permite obtener información macroscópica de la topografía de una muestra, ya sea en altura de escalón, rugosidad u ondulación. Se basa en una punta, sujeta a un brazo rígido, que recorre la superficie de la muestra. Se hace incidir un haz en la cola del brazo rígido que es reflejado hacia un fotodetector, donde cambios en la posición del haz sobre el detector serán relacionados con cambios en la altura de la superficie. Con esta técnica es posible obtener el perfil 3D de la muestra. La resolución del perfil está dada por el diámetro de la punta utilizada para obtenerlo.

se utilizó un perfilómetro de contacto KLA Tencor D-600 para medir la altura del escalón formado por la superficie de la membrana de Colágena y la superficie del bloque de PDMS utilizado como base de la fabricación. Esta altura indicará el espesor de la membrana.

Dos membranas fueron medidas, ambas de Colágena tipo I. Una fabricada con DMEM y una más con HBSS. La preparación de la muestra consistió en desprender sólo un fragmento de membrana del bloque donde se había fabricado. Se realizaron 10 mediciones perpendiculares al borde de cada muestra. Con cada medición se puede generar un perfil como el mostrado en la figura 3.1, donde se muestra el escalon formado entre la superficie

de la membrana y el sustrato.

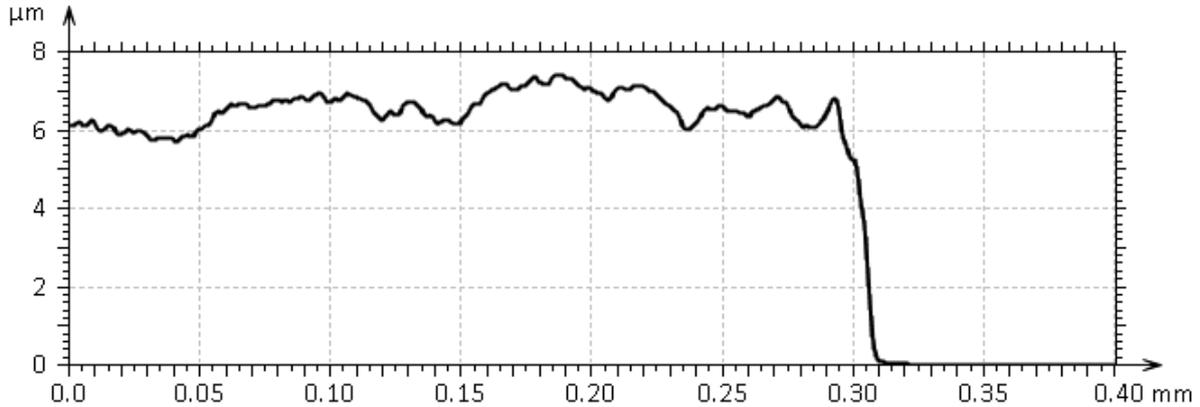


Figura 3.1: Gráfica de un perfil del escalón formado por la membrana de Colágena fabricado con HBSS y el bloque de PDMS 10:1

Se obtuvo un espesor de $5.77 \pm 0.815 \mu m$ para la membrana fabricada con HBSS y de $5.18 \pm 1.053 \mu m$ para la fabricada con DMEM.

Podemos observar que el espesor de la membrana no depende del medio de cultivo utilizado para su fabricación.

3.2. Microscopía de Fuerza Atómica

La microscopía de fuerza atómica es una técnica que permite obtener información microscópica de la topografía de una muestra. Consiste en una punta sujeta a un brazo flexible o cantilever al cual se le hace incidir un haz que es reflejado hacia un fotodetector. Esta punta recorre la muestra que se medirá con una fuerza de referencia asignada, la fuerza entre la interacción material-punta, y la deformación ocasionada al cantilever debido a ella será de lo que dependa la deflexión del haz. Se pueden tener dos tipos de mediciones: de contacto e intermitente.

En el modo de contacto, la punta recorre horizontalmente a la muestra. Los cambios en la topografía se ven reflejados en cambios en la deflección del haz. En este modo se tiene una mejor resolución de la superficie.

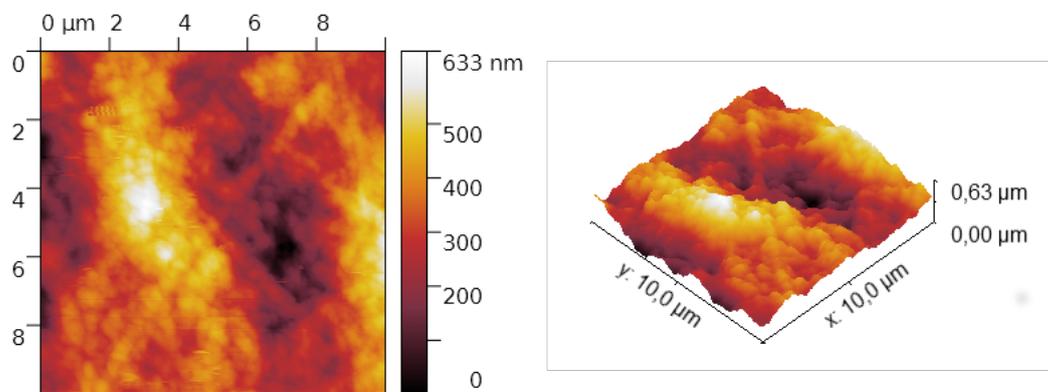
En el modo intermitente, la punta se hace oscilar a su frecuencia de resonancia y se hace recorrer la muestra horizontalmente. La topografía se ve reflejada en cambios en la amplitud de la oscilación del haz que se refleja. A través de este modo se puede obtener una comparación de módulos elásticos.

Para las muestras estandarizadas y con material sacrificial, se realizaron mediciones en modo de contacto, con un área de escaneo cuadrada de 10 μm por lado y un umbral de

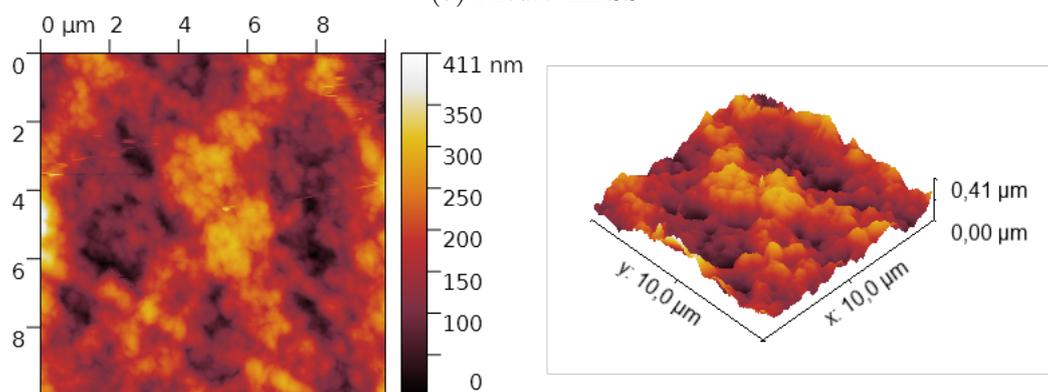
fuerza de 20nN con el equipo NanoSurfNaio AFM utilizando una punta BudgetSensors ContAl-G.

La preparación de las muestras consistió en desprenderlas del bloque de PDMS y recortarlas a un tamaño menor a 18 mm que es el tamaño máximo que se puede colocar en el portamuestras del equipo NanoSurf Naio AFM . Para adherirlas al portamuestras se utiliza una nota adhesiva (post-it) ya que el adhesivo con el que cuentan no llega a dañar a las muestras al momento de desprenderlas. A su vez, el post-it se adhiere al portamuestras usando cinta doble cara. Se debe cuidar que las muestras queden planas sobre el sustrato.

Los datos obtenidos tras las mediciones; los mapas de color y vista 3D fueron analizados y generados, respectivamente, con el software Gwyddion. Después de estos resultados se mostrará la rugosidad RMS obtenida para cada tipo de muestra.



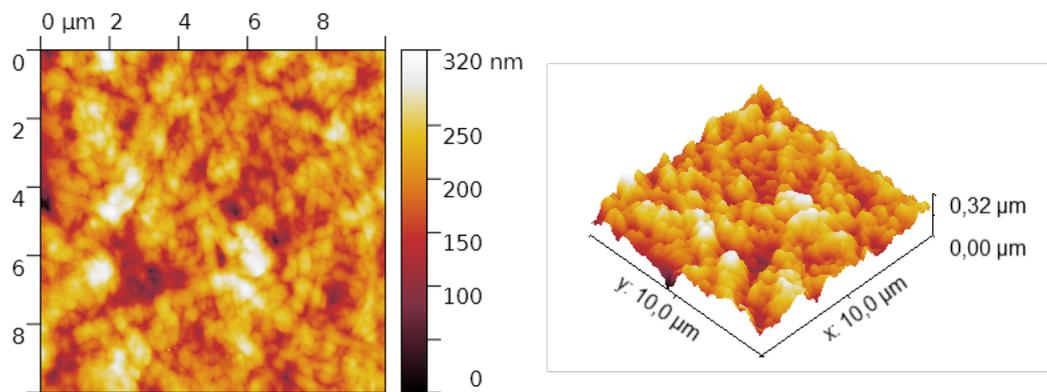
(a) Medio HBSS



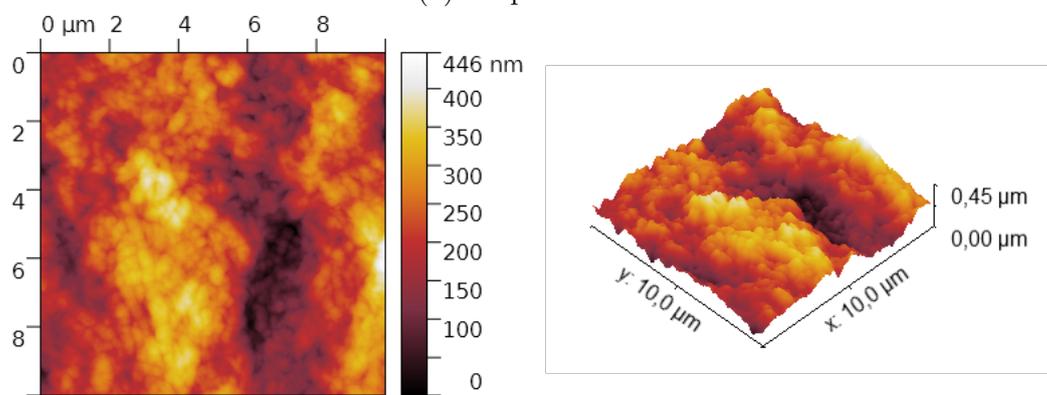
(b) Medio DMEM

Figura 3.2: Mapa de color y vista 3D de la topografía de membranas de Colágena tipo I

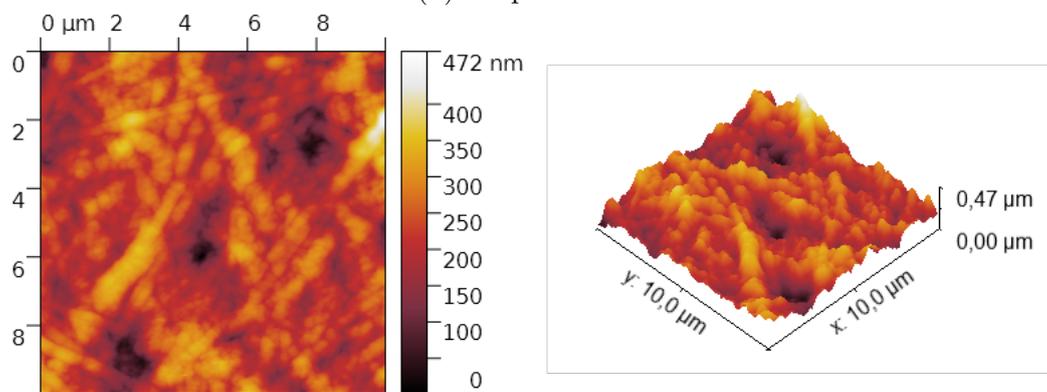
	$Rugosidad_{(RMS)}$
HBSS	105 nm
DMEM	57.72 nm



(a) Proporción 1:1



(b) Proporción 1:2



(c) Proporción 2:1

Figura 3.3: Mapa de color y vista 3D de la topografía de membranas de Colágena tipo I con alginato de sodio como material sacrificial en diferentes proporciones

Las membranas de Colágena con material sacrificial fueron fabricadas con HBSS. De las mediciones de estas membranas se obtiene la rugosidad RMS de cada muestra. Que se muestra a continuación.

	<i>Rugosidad</i> _(RMS)
1:1	39.53 nm
1:2	70.27 nm
2:1	44.97 nm

Podemos notar que al agregar el material sacrificial, la rugosidad de la membrana disminuye respecto al valor obtenido para membranas de sólo Colágena tipo I. Ésto puede indicar que restos del material sacrificial queden embebidos en la membrana, o bien que la distribución de las fibras es modificado respecto a las membranas sin material.

3.3. Microscopía Electrónica de Barrido

Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de electrones enfocado, con un movimiento de barrido, a una muestra con propiedades conductoras, ya sea nativa o a través de un recubrimiento de un material conductor.

Los electrones incidentes interactúan con los átomos de la muestra a través de procesos conocidos como eventos de dispersión en los cuales hay una transferencia de energía que puede frenar el camino de los electrones o bien cambiar su dirección de la trayectoria que seguían. De estos eventos se producen electrones retrodispersados (BS por sus siglas en inglés), electrones secundarios (SE) y rayos X. Estas partículas, al ser detectadas, dan información sobre propiedades topográficas fina y gruesa, composición, estructuración y de campos eléctricos y magnéticos locales.

En particular, los electrones secundarios son aquellos detectados y procesados para la obtención de imágenes de alta resolución. Surgen por interacción inelástica del haz de electrones que desprende electrones de valencia levemente unidos, en el caso de materiales con enlace iónico o covalente, o electrones de la banda de conducción, en el caso de metales con energías de enlace entre 1 y 15 eV. Los electrones secundarios son cuantificados como la razón entre electrones emitidos por la muestra entre los electrones del haz incidente [22].

Para las muestras sin y con material sacrificial fabricadas sobre sustratos de PDMS 10:1, nos interesa observar la estructura de la membrana humedecida, para simular un ambiente donde se encuentre sumergida en medio de cultivo, así que las muestras fueron fijadas sin permitir que secan tras haber permanecido en Buffer de Fosfato Salino (PBS) no estéril durante tres horas.

Para fijar las muestras, se preparó una solución de glutaraldehído al 2.5 % y paraformaldehído al 2 %. Partiendo de soluciones stock al 25 % y 4 % respectivamente, se preparan 30 ml de solución donde, 3 ml son de glutaraldehído, 15 ml son de paraformaldehído y 12 ml son de PBS no estéril. Estos valores se obtuvieron a partir de la ecuación 2.1.

Se colocaron 5 ml de solución en cada división de la caja de Petri donde se encontraban las muestras de membrana de Colágena aún sin desprender del bloque de PDMS. Las muestras permanecieron sumergidas en la solución durante 17 horas. Al pasar este tiempo,

se retiró la solución para fijar y se hicieron 3 lavados con PBS no estéril. En cada lavado se colocaron 5 ml de PBS no estéril y se colocaron las cajas de Petri 5 minutos sobre el agitador de balanceo con una velocidad de 50 vueltas/minuto. Para el tercer lavado, se dejó 10 minutos sobre el agitador a la misma velocidad. Finalmente se retiró el PBS no estéril y se colocaron las cajas de Petri con las muestras, destapadas, en la campana con UV para PCR. La campana había sido esterilizada tras una exposición de 15 minutos de UV antes de colocar las muestras.

Cuando las membranas se observaron secas, se procedió a la preparación de las muestras para observarlas en el microscopio electrónico de barrido. Se desprendieron fragmentos de la membrana del bloque de PDMS y se colocaron sobre la parte adhesiva de un post-it, que a su vez se encontraba adherido a un portaobjetos de vidrio. Posteriormente, se hizo el recubrimiento de Oro en Argón a través un mini sputterer Quorum.. Esto se realiza siguiendo el procedimiento descrito en el manual del equipo.

Usando la ecuación $d = KIVt$ se puede obtener el grosor del depósito. Donde K es una constante determinada experimentalmente que depende del metal que se depositará, el gas utilizado y la distancia al objetivo. Para la combinación oro argón este valor es aproximado a 0.17, I es la corriente del plasma en mA, V el voltaje aplicado en kV y t el tiempo del depósito en segundos [23]. Para este experimento, los valores fueron $t = 90$ seg, $I = 17$ mA, $V=1$ kV. Así que el grosor del depósito será $d = 260.1 \text{ \AA}$.

Tras hacer el depósito, se colocaron las muestras sobre el porta muestras del equipo SEM Jeol JCM6000PLUS. Para adherir las muestras al portamuestras se utilizó cinta de carbón que permite la interacción con el haz de electrones.

Tras obtener las microfotografías de cada caso, se analizaron a través del programa Image J. Donde el diámetro de las fibras que se observaban en primer plano fueron medidos. De cada condición se obtuvieron 3 microfotografías que fueron analizadas para obtener el promedio y desviación estándar.

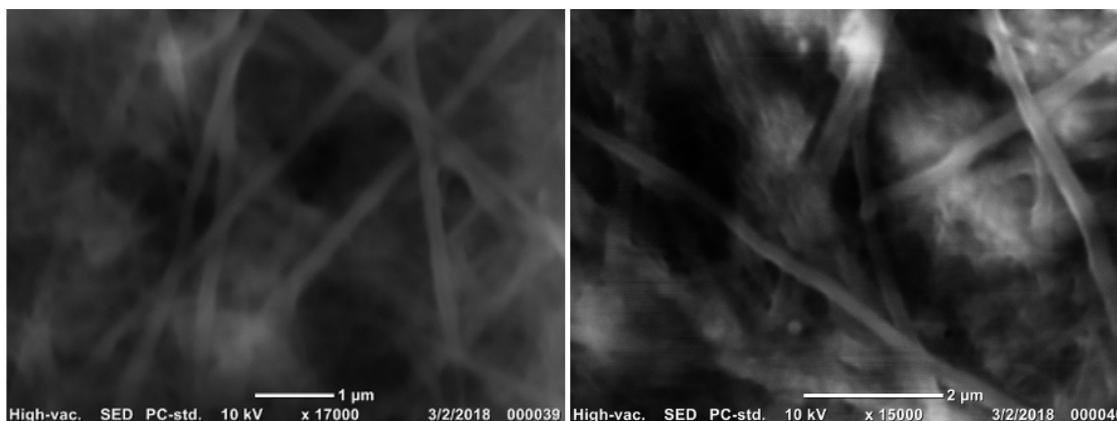


Figura 3.4: Microfotografías representativas de membranas de Colagena tipo I obtenidas a través de SEM.

En la muestra de membrana de Colágena tipo I se aprecian espacios sin fibras de hasta $1.6 \mu\text{m}$ de largo, estos espacios son los que llamamos poros de la muestra. Pero es imposible apreciar si debajo se encuentran más fibras, es decir que el poro se encuentre o no bloqueado por la presencia de estructuras fibrosas bajo él. En esta muestra los rangos de diámetros de las fibras más frecuentes son entre $0.12 \mu\text{m}$ y $0.35 \mu\text{m}$ y el diámetro de cada fibra no parece cambiar a lo largo de su estructura.

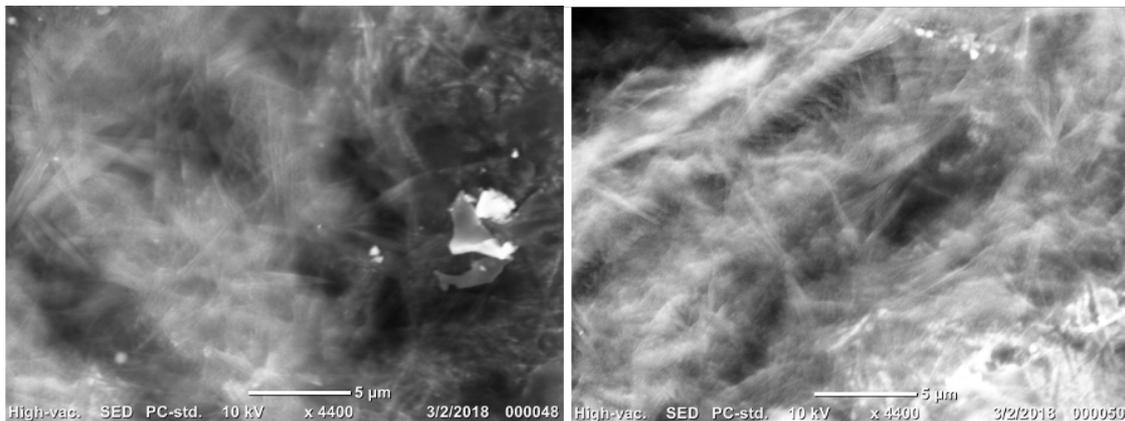


Figura 3.5: Microfotografías representativas de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 2:1 obtenidas a través de SEM.

En la muestra de membrana de Colágena tipo I con Alginato de Sodio en proporción 2:1, se observan zonas oscuras en la microfotografía que pueden asociarse a poros pero no se asegura que estén presentes al solo estar observando la capa superficial. Además de que se observa la presencia de estructuras grumosas que se pueden asociar a cúmulos de material que dificultan la visibilidad. En esta muestra se aprecian grupos de fibras que tienen la misma dirección y parecen ir formando fibras de mayor diámetro. El rango más frecuente de diámetro es entre $0.2 \mu\text{m}$ y $0.5 \mu\text{m}$, pero las estructuras más gruesas presentan un diámetro entre $1 \mu\text{m}$ y $1.2 \mu\text{m}$.

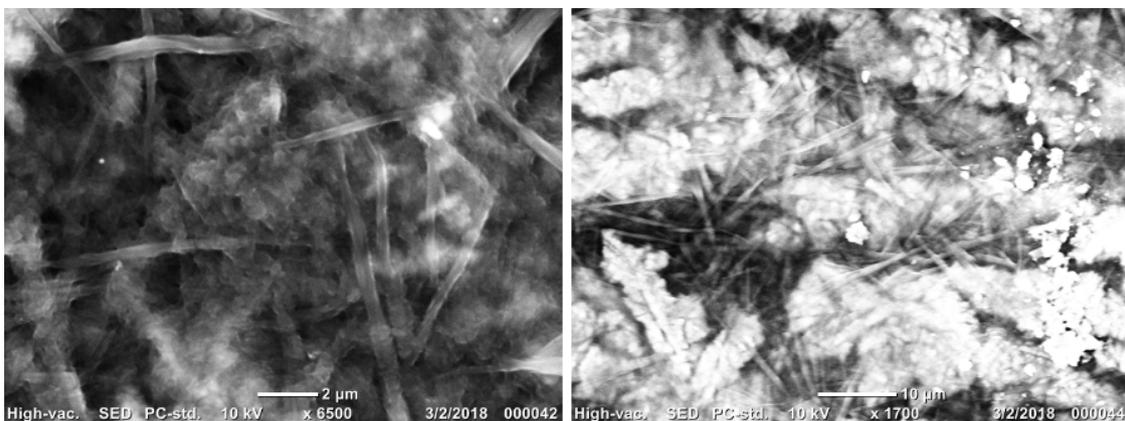


Figura 3.6: Microfotografías representativas de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:1 obtenidas a través de SEM.

En la muestra de membrana de Colágena tipo I con Alginato de Sodio en proporción 1:1, se aprecian poros que, nuevamente, no podemos asegurar que estén presentes ya que solo vemos la cara superior de la muestra. También, las fibras parecen ir cambiando de grosor a lo largo de su estructura, es decir cuentan con una parte más angosta que se va ensanchando. El rango de diámetro de las fibras más frecuentes es entre $0.2 \mu m$ y $0.8 \mu m$. Pero se observa la presencia de fibras de mayor diámetro (entre 0.8 y $1.2 \mu m$) que parecen estar formadas por fibras más angostas que se encuentran juntas.

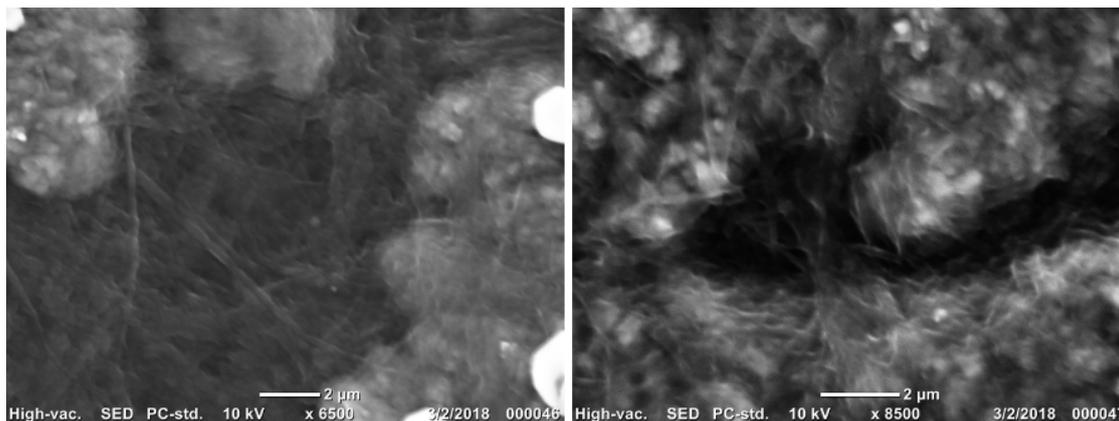


Figura 3.7: Microfotografías representativas de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 obtenidas a través de SEM.

En la muestra de membrana de Colágena tipo I con Alginato de Sodio en proporción 1:2, se observa una superficie homogénea con sólo unas pocas fibras. No es posible observar poros y el rango de grosores más frecuentes es entre $0.2 \mu m$ y $0.3 \mu m$ aunque es posible observar estructuras de menor diámetro llegando hasta $0.1 \mu m$.

Membrana	Diámetro [μm]			Diámetro Bulto [μm]		
	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo
COL I	0.233 ± 0.068	0.101	0.556	-	-	-
COL + ALG 2:1	0.271 ± 0.117	0.086	0.663	0.872 ± 0.154	0.651	1.043
COL + ALG 1:1	0.601 ± 0.227	0.201	1.242	-	-	-
COL + ALG 1:2	0.208 ± 0.072	0.102	0.396	-	-	-

3.3.1. Diferentes sustratos

Como se comentó en el capítulo 2, los materiales sobre los que se deposita la solución de Colágena y donde se almacena durante los demás procesos de fabricación deben ser permeables a gases para permitir que la muestra seque.

Por otro lado, al fabricar PDMS, la razón entre agente curante y base modifica el nivel de entrecruzado de la solución. A una mayor cantidad de base que de agente curante se obtendrá un material menos entrecruzado que se verá reflejado en una rigidez menor y

una porosidad mayor. Mientras que de uno donde haya mayor cantidad de agente curante que de base se obtendrá un material más entrecruzado que se verá reflejado en una rigidez mayor y una porosidad menor.

Para observar si el nivel de entrecruzado del sustrato en que se colocan las gotas de Colágena, en particular su permeabilidad a gases, influye en la formación de fibras se realizó el siguiente experimento.

Se utilizaron tres sustratos diferentes, todos de PDMS Sylgard 184 pero con proporciones de base y agente curante diferentes. Así se colocó una gota de Colágena con Alginato de Sodio en proporción 1:2, sobre:

- PDMS 7:1 envejecido curado a 60°C durante 48 horas
- PDMS 20:1 envejecido curado a 60°C durante 48 horas
- PDMS 10:1 fresco curado a 60°C durante 48 horas

Las muestras fueron desprendidas de cada sustrato pero no tuvieron un tratamiento previo a la prueba de microscopía. Es decir, no fueron fijadas ni se recubrieron con oro. Lo anterior debido a que se había observado un exceso de material sobre las muestras anteriores que se asoció a una capa demasiado gruesa de oro. Las muestras se desprendidas se colocaron en el portamuestras del equipo utilizando cinta de carbón.

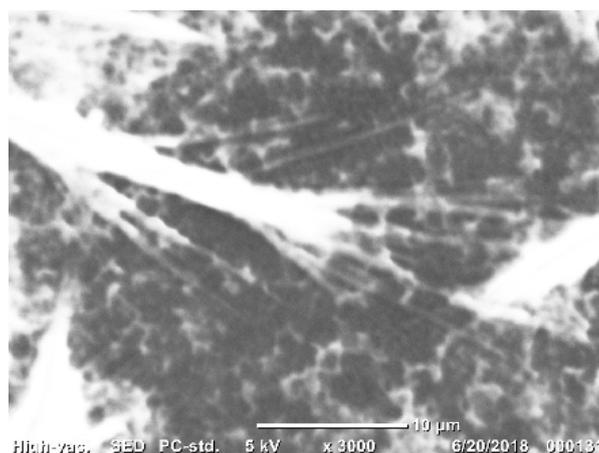


Figura 3.8: Microfotografía representativa obtenida a través de SEM de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 fabricada sobre sustrato de PDMS en proporción 20:1.

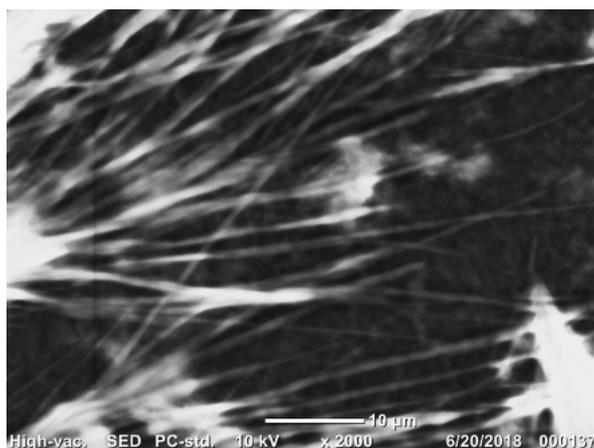


Figura 3.9: Microfotografía representativa obtenida a través de SEM de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 fabricada sobre sustrato de PDMS en proporción 10:1.

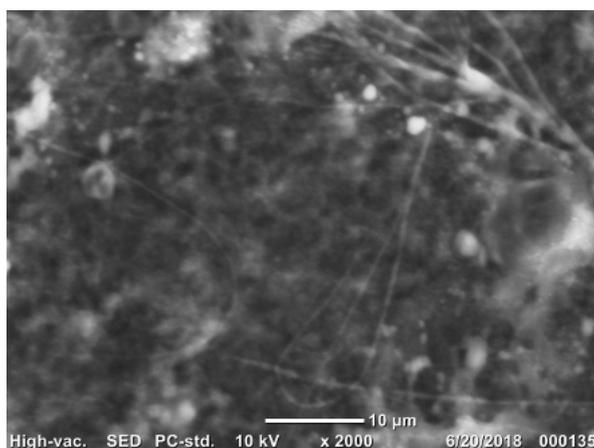


Figura 3.10: Microfotografía representativa obtenida a través de SEM de membranas de Colágena tipo I con material sacrificial en proporción 1:2 fabricada sobre sustrato de PDMS en proporción 7:1.

Sustrato PDMS	Diámetro Fibras [μm]			Diámetro Bulto [μm]		
	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo
20:1	1.151 ± 0.516	0.366	1.9	3.8 ± 0.62	2	4.638
10:1	0.906 ± 0.400	0.22	2.109	4.973 ± 2.624	2.231	8.62
7:1	0.605 ± 0.216	0.253	1.564	-	-	-

3.4. Pruebas Mecánicas a través de Microindentación

Las mediciones se realizaron con el equipo FT-MTA02 de la marca Femto Tools. Con este equipo, se puede caracterizar el Módulo de Young de un material, es decir, la resistencia que ejerce el material a una deformación debido a un esfuerzo externo.

Las muestras se someten a una indentación en dirección normal a su superficie con una punta micrométrica, la fuerza que experimenta la punta es registrada a cada paso.

El análisis de los datos medidos para la obtención del Módulo de Young se basa en la Teoría de Contacto de Hertz. Donde se relacionan factores como la geometría de la punta, la distancia de indentación y la fuerza que experimenta. De tal forma que el módulo de Young combinado del material estará dado por la ecuación

$$E^* = \frac{3}{4}FR^{-\frac{1}{2}}d^{-\frac{3}{2}} \quad (3.1)$$

con

$$E = E^*(1 - \nu^2) \quad (3.2)$$

Donde E es el módulo de Young de la muestra, ν el coeficiente de Poisson, F la fuerza que se experimenta al indentar una cierta distancia d con una punta esférica de radio R . Ver Anexo A para el desarrollo de la ecuación 3.1.

A través de un programa de Mathematica se hace un ajuste a la curva fuerza contra distancia donde se encuentra el valor numérico del parámetro E^* . Posteriormente se obtiene el módulo de Young al tomar el factor del coeficiente de Poisson. Este coeficiente relaciona las deformaciones longitudinales que experimenta un cuerpo en dirección paralela y perpendicular a la fuerza aplicada. En este trabajo se utilizó un valor de $\nu = 0.5$.

3.4.1. Evolución temporal de membranas de Colágena tipo I

Se mostrarán los valores de Módulo de Young obtenidos para membranas de Colágena tipo I durante un periodo de 30 días desde su fabricación. Estas muestras permanecieron deshidratadas y sobre el bloque de PDMS donde fueron fabricadas excepto en las mediciones donde fueron sumergidas en PBS 1x no estéril ó agua desionizada no estéril.

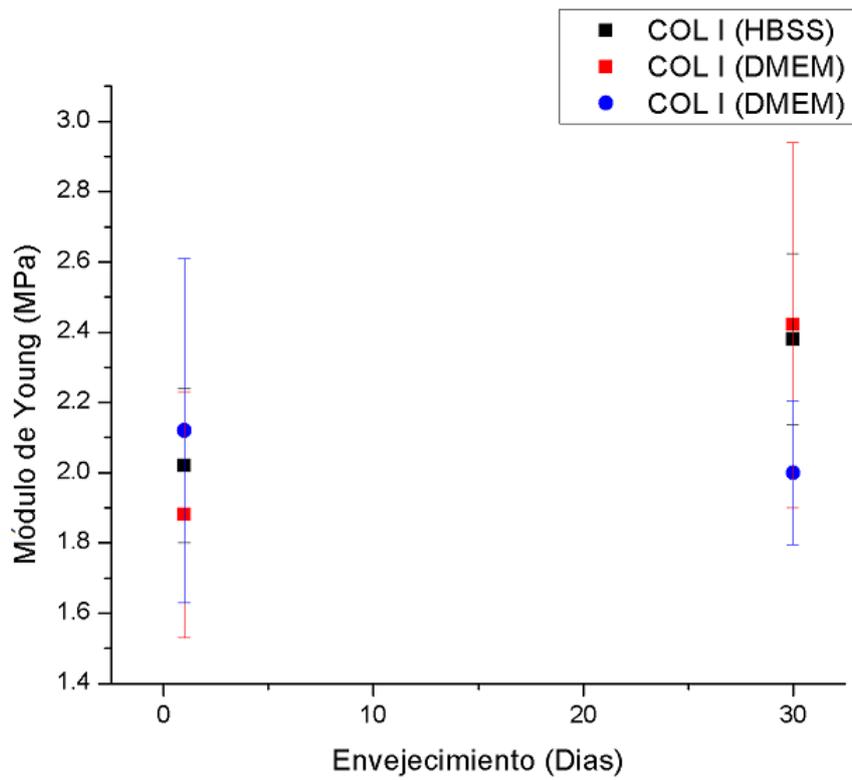


Figura 3.11: Módulo de Young para membranas de Colágena tipo I tras 30 días de envejecimientos. Datos obtenidos de muestra sumergida en PBS.

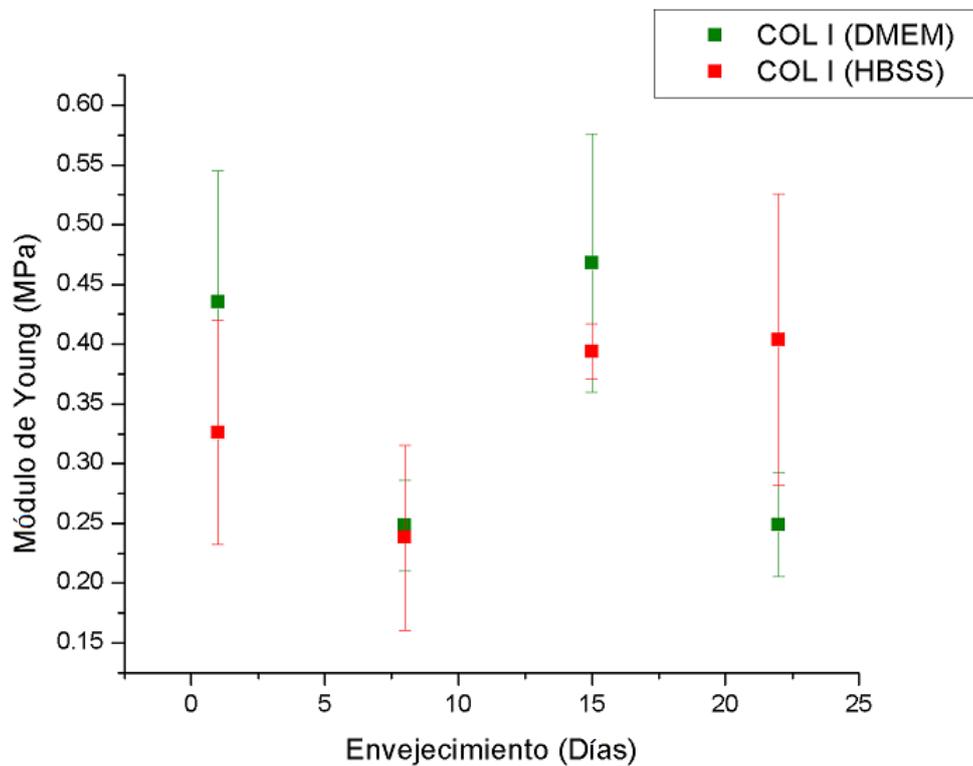


Figura 3.12: Módulo de Young para membranas de Colágena tipo I tras algunos días de envejecimientos. Datos obtenidos de muestra sumergida en agua desionizada.

Se observa que los valores obtenidos entre las figuras 3.11 y 3.12 difieren entre un 6 y 10 por ciento, aún cuando las muestras se fabricaron con el mismo procedimiento. Consideramos entonces el medio en que estuvieron sumergidas las muestras durante las mediciones. El PBS es una solución con sales (iones) que aportan cargas al medio. Mientras que el agua en que se sumergieron el otro par de muestras era desionizada, es decir no había cargas. Estas cargas interactúan también con la punta con que se indenta la muestra, haciendo que indentar una cierta distancia en un medio con cargas requiera más fuerza que en medio sin cargas o bien que con la misma fuerza se indente una distancia menor en un medio con cargas.

Se obtuvo un valor promedio de Módulo de Young de 2.2 ± 0.25 MPa para membrana de Colágena tipo I medido en PBS y un valor de 0.34 ± 0.076 MPa para membrana de Colágena tipo I medido en agua desionizada.

Los siguientes módulo de Young obtenidos para diferentes condiciones de las membranas fueron normalizados en función del promedio obtenido de la prueba de envejecimiento. Se mostrarán entonces como Módulos de Young normalizados.

3.4.2. Diferente pH de las soluciones de Colágena

Durante la estandarización de la fabricación de las membranas de Colágena tipo I, se obtuvieron soluciones de Colágena a 2 mg/ml con diferentes pH. De estas soluciones se fabricaron también membranas que fueron preparadas para medir su módulo de Young al ser sumergidas en un medio líquido. Se muestra a continuación los resultados obtenidos para membranas provenientes de una solución de Colágena tipo I ácida, neutra y alcalina.

Se observa en la figura 3.13 que en una membrana fabricada a partir de una solución con pH ácido el módulo de Young aumenta respecto a las soluciones que tienen un pH neutro y alcalino. Y que la diferencia entre soluciones neutras y alcalinas no es significativa. Se comprueba que diferentes valores de pH de la solución gelificada promueven propiedades diferentes de las fibras de Colágena formada, por lo que se asocian estos cambios a la diferencia de rigidez de las muestras.

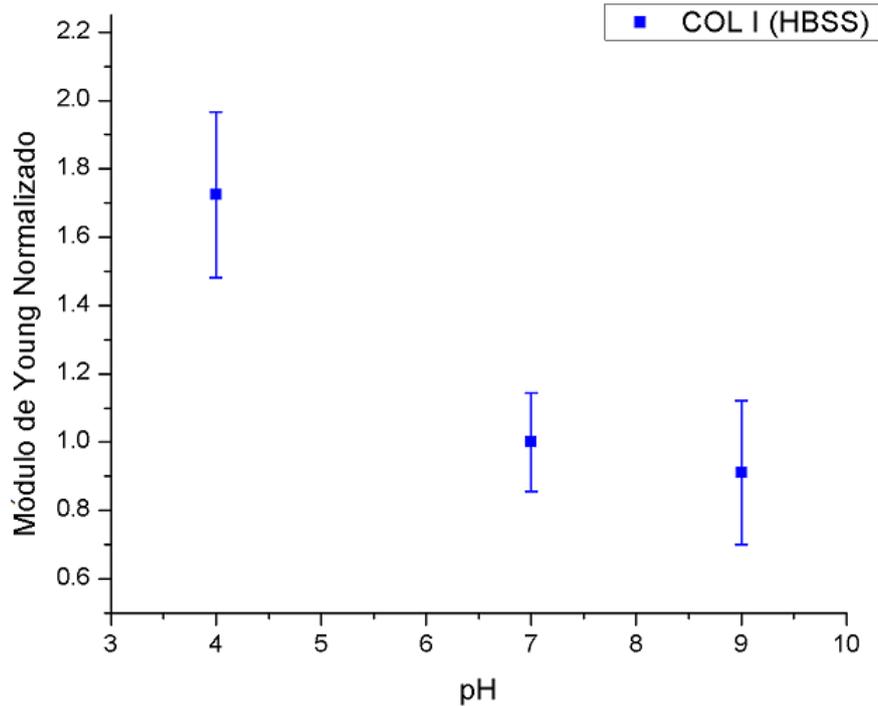


Figura 3.13: Módulo de Young Normalizado para membranas de Colágena tipo I a diferentes pH.

3.4.3. Colágena tipo I con Alginato de Sodio

Se muestran a continuación los resultados obtenidos para la microindentación de membranas de Colágena tipo I agregando Alginato de Sodio como material sacrificial.

En este caso se esperaba que al tener un mayor volumen de Alginato de Sodio (1:2), disminuyera el módulo de Young de las membranas. Esto debido a que al usar un material sacrificial durante la gelificación de la solución, la red de fibras no se encontraría tan entrecruzada como en el caso de membranas de sólo Colágena. Sin embargo, se observa en la figura 3.14 que el comportamiento es al revés. Es decir, en la solución cuya proporción de Colágena es menor a la de Alginato (1:2), el módulo de Young es el mayor de los tres casos. Con un valor igual o mayor que el de membrana de Colágena tipo I.

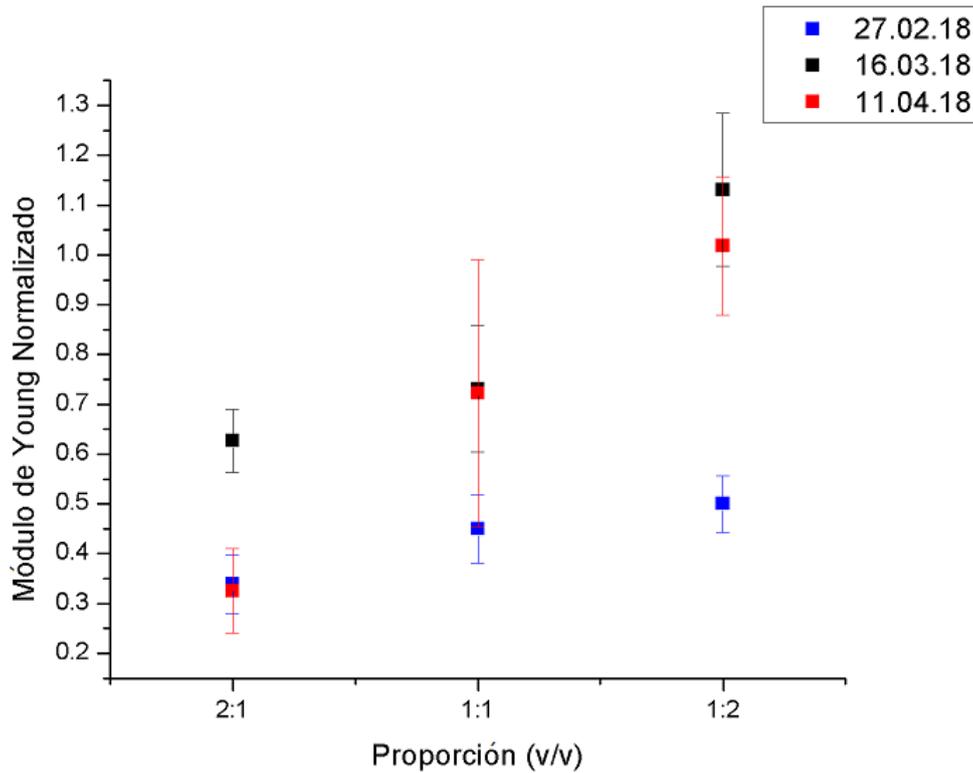


Figura 3.14: Módulo de Young para membranas de Colágena fabricadas con Alginato de Sodio en diferentes proporciones.

3.4.4. Diferentes sustratos

Se observó que la porosidad del sustrato en que se colocan las gotas de Colágena influye en la formación de fibras, por lo que se puede esperar que haya una influencia también en su mecánica, es por eso que se realiza el siguiente experimento:

Se utilizaron tres sustratos diferentes, todos de PDMS pero con proporciones de base y agente curante diferentes. Se colocaron una gota de Colágena tipo I y una de Colágena con Alginato de Sodio en proporción 1:2, sobre:

- PDMS 7:1 envejecido curado a 60°C durante 48 horas
- PDMS 20:1 envejecido curado a 60°C durante 48 horas
- PDMS 10:1 fresco curado a 60°C durante 48 horas

Se siguió el método de fabricación descrito en el capítulo 2. Para las mediciones con el equipo Femto tools se colocaron las muestras en PBS no esteril. Además, se midió el módulo de Young de los bloques de PDMS en que fueron fabricadas.

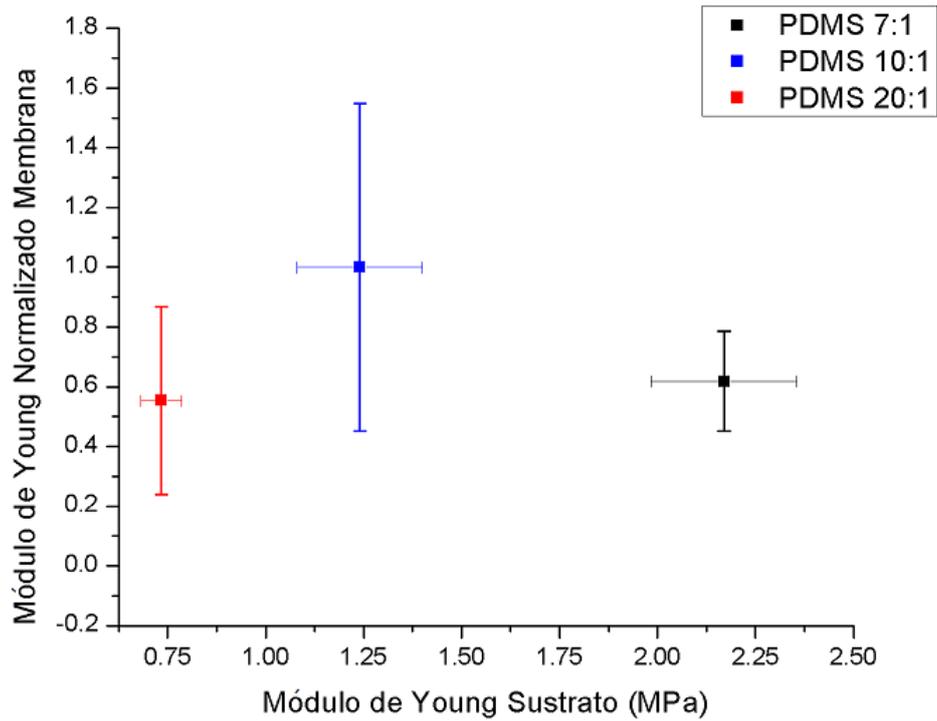


Figura 3.15: Módulo de Young para membranas de Colágena fabricadas sobre diferentes sustratos.

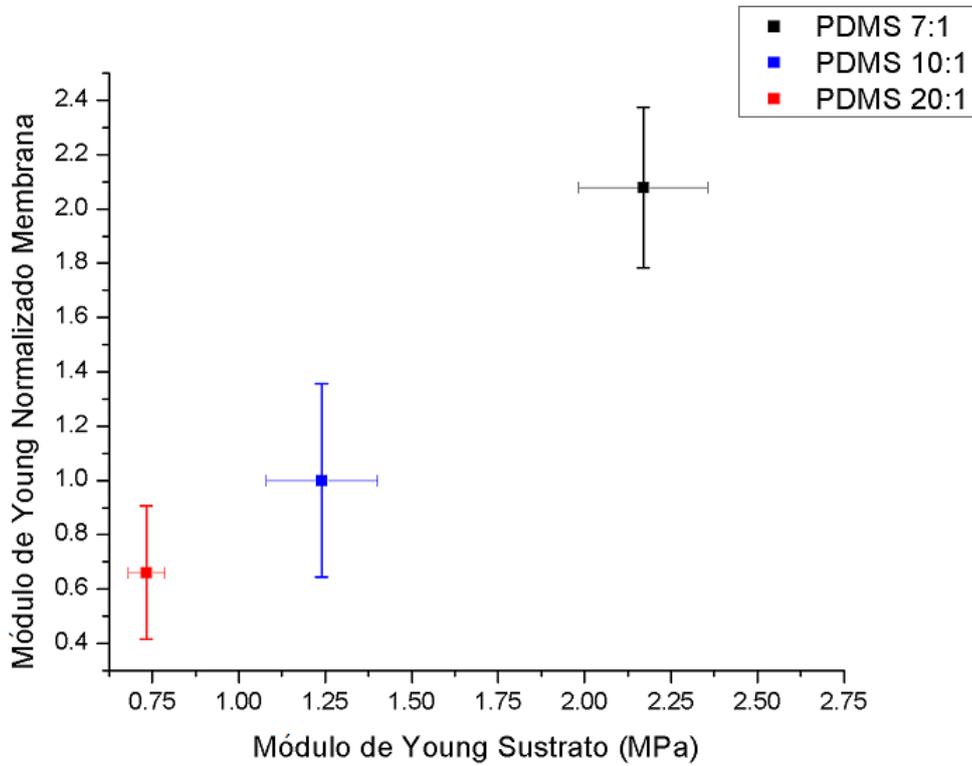


Figura 3.16: Módulo de Young para membranas de Colágena con Alginato de Sodio en proporción 1:2 fabricadas sobre diferentes sustratos.

Se observa en la figura 3.15 que los valores de módulo de Young de las membranas de Colágena tipo I en sustratos diferentes al estandarizado (10:1) entran en su rango de error. Es decir, no parece haber una relación directa de este tipo de muestras con la elasticidad del sustrato.

Mientras que en la figura 3.16 se observa que los valores de módulo de Young de las membranas de Colágena tipo I con un material sacrificial en proporción 1:2 aumenta al aumentar la rigidez de sustrato.

3.5. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier

Es una prueba de espectroscopía vibracional cuyo principio es excitar una muestra con un haz infrarrojo y cuantificar la cantidad que es absorbida o transmitida. Las moléculas, que deben poder tener un cambio en el dipolo, requieren una longitud de onda específica para poder expresar sus modos vibracionales así que esta prueba proporciona una "huella digital" de las muestras.

Los espectros presentados en este trabajo fueron obtenidos por medio del método de Reflectancia Total Atenuada (ATR) donde son medidos cambios que ocurren en un haz infrarrojo que ha sido reflejado internamente tras entrar en contacto con la muestra. El haz es dirigido hacia un cristal con un alto índice de refracción a un cierto ángulo. La reflexión total interna crea una onda evanescente que se extiende de la superficie del cristal hacia la muestra. En la región del espectro infrarrojo donde la muestra absorba energía, la onda evanescente se verá atenuada. Esta onda atenuada regresa al cristal para salir y ser dirigido hacia un detector [24].

El equipo arroja entonces una gráfica que relaciona la respuesta del detector con una función del tiempo. Es a través de la transformada de Fourier que se lleva del dominio temporal a un dominio de frecuencias, al resultado de esta transformación se le llama single beam. Se obtiene entonces un single beam del fondo, es decir del equipo sin muestra, y posteriormente se obtiene el single beam de la muestra. La razón de estas gráficas proporcionará el espectro infrarrojo de la muestra.

En esta técnica, el contacto entre la muestra y el cristal es primordial. Para asegurar este contacto suelen utilizarse brazos mecánicos que aplican una cierta fuerza sobre la muestra.

Esta prueba se realizó con el equipo Spectrum Two de la marca PerkinElmer ubicado en el Laboratorio de Nanopelículas del ICN. Todos los espectros fueron obtenidos en modo ATR a través de 20 barridos. Y se aplicó una fuerza de 50^1 , a menos que se indique lo contrario. Se mostrarán las zonas de interés de cada espectro. Los espectros completos de cada prueba se muestran en el Anexo B.

¹Unidades no indicadas en el equipo.

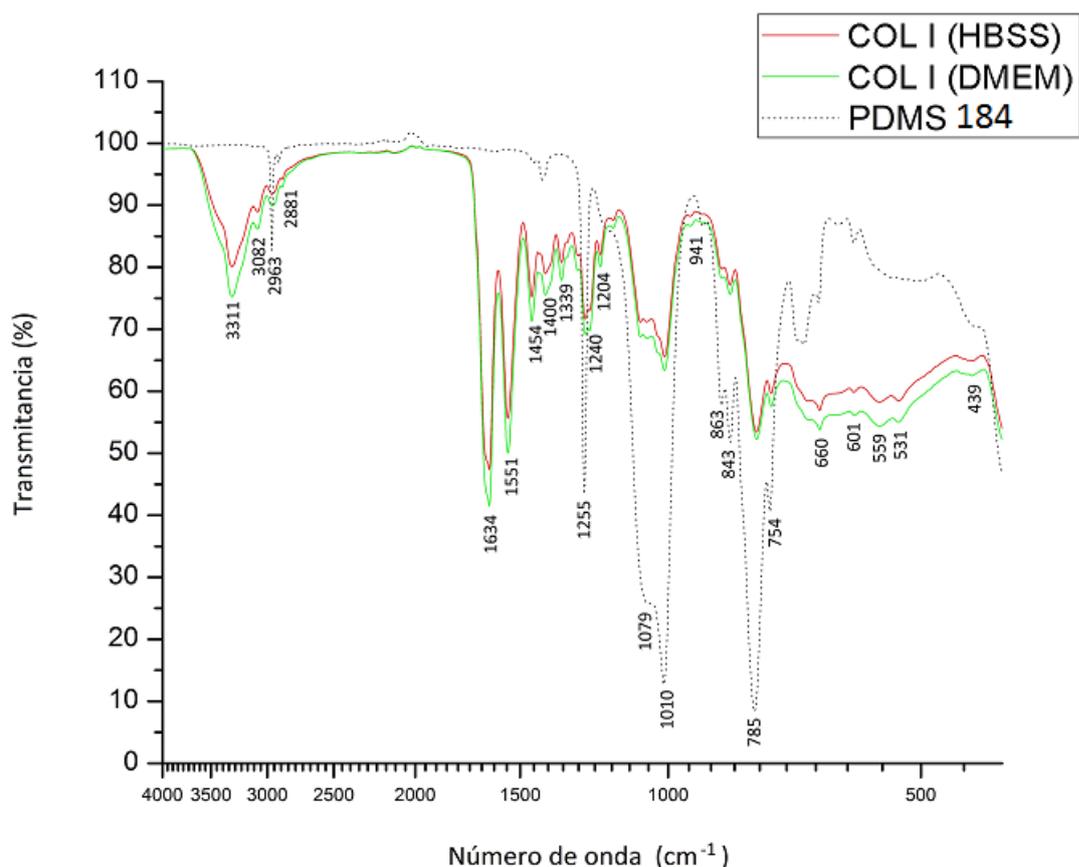


Figura 3.17: Espectro infrarrojo de membranas de Colágena tipo I sobre un bloque de PDMS.

En la figura 3.17 se muestran todas las bandas indentificadas en los espectros de Colágena tipo I y un bloque de PDMS 10:1.

Se ha reportado en la literatura las bandas de FTIR características de la Colágena tipo I, que fueron las bandas en las que se buscaron cambios como desplazamientos en el número de onda y aumento o disminución en ancho y amplitud de la banda. Se enlista a continuación el número de onda con la molécula asociada.

Molécula	Número de onda [cm^{-1}]
Amida A	3400-3100
Amida B	2930
Amida I	1660-1630
Amida II	1564-1550
Anillo Pirilina	1454,1417-1360
Amida III	1250-1232

La Amida A está relacionada con estiramientos de O-H y N-H, Amida I con estiramiento -C-H y C=O, Amida II con la unión N-H y estiramiento C-N, Amida III con

estiramiento C-N y C-C y doblamiento N-H, Anillo pirrolidina con prolina e hidroxiprolina [25–29].

3.5.1. Evolución temporal de membranas de Colágena

Para la prueba de envejecimiento se fabricaron membranas de Colágena tipo I, utilizando dos medios de cultivo diferentes: HBSS y DMEM. Se obtuvieron los espectros de las muestras con uno, quince y treinta días de envejecimiento sin desprenderse del bloque de PDMS.

De los espectros de Colágena en las figuras 3.19 y 3.21 se observan bandas en los número de onda 1454, 1400, 1339, 1240, 1204 cm^{-1} que en la literatura se atribuyen a la absorción de grupos funcionales CH₂, CH₃, C-N y N-H en la Colágena [27]. Así como bandas halladas en 1634, 1551 y 1240 cm^{-1} que se suelen asociar a las bandas de Amida I, II y III encontradas en los números de onda 1650, 1560, 1245 cm^{-1} respectivamente [26,27].

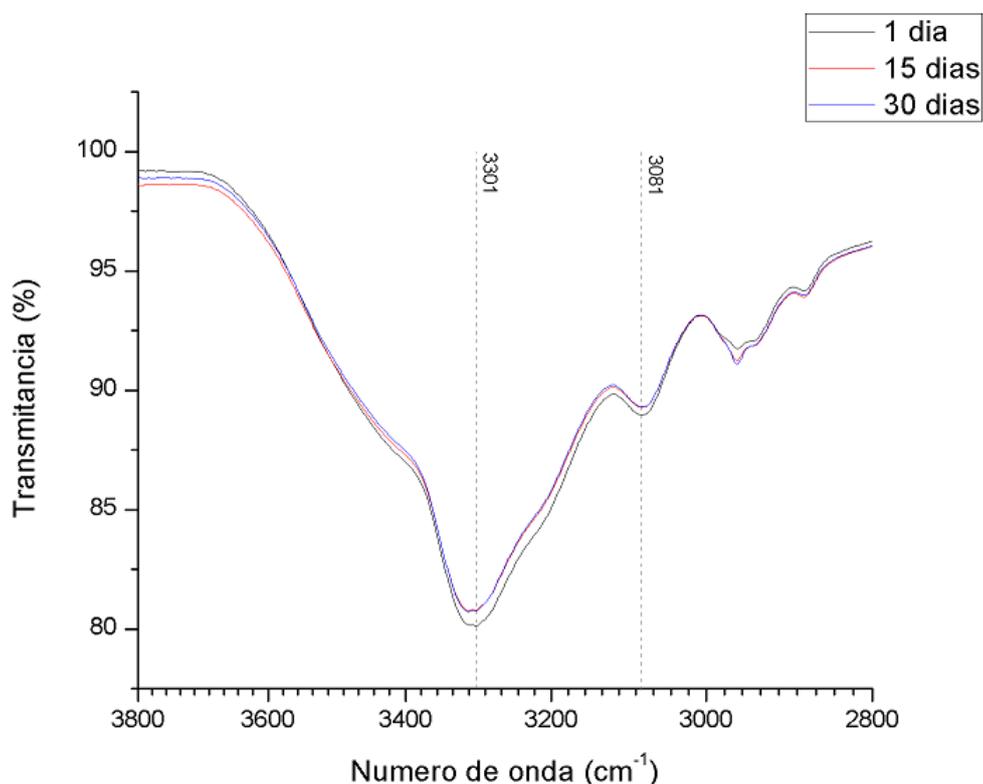


Figura 3.18: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS. 3800 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} .

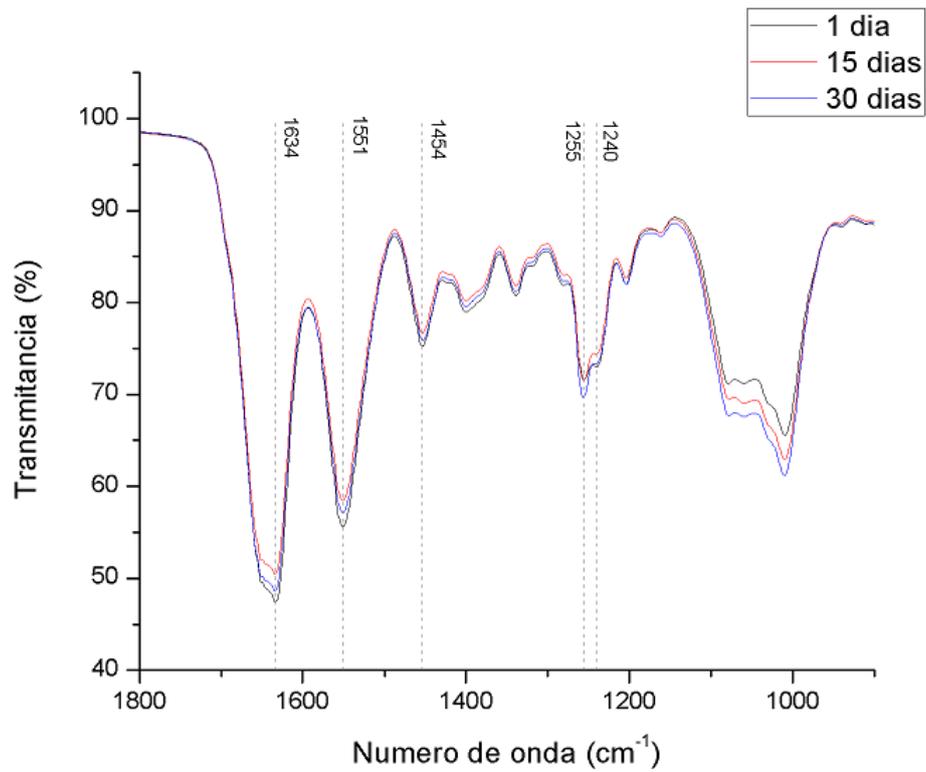


Figura 3.19: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS. 1800 cm^{-1} - 900 cm^{-1} .

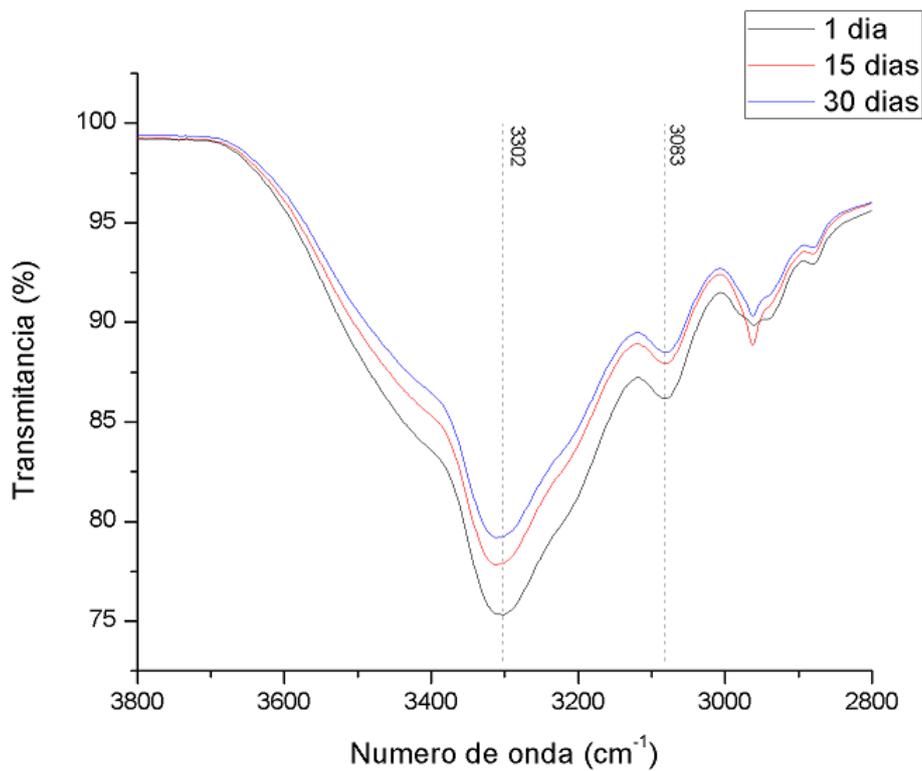


Figura 3.20: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con DMEM. 3800 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} .

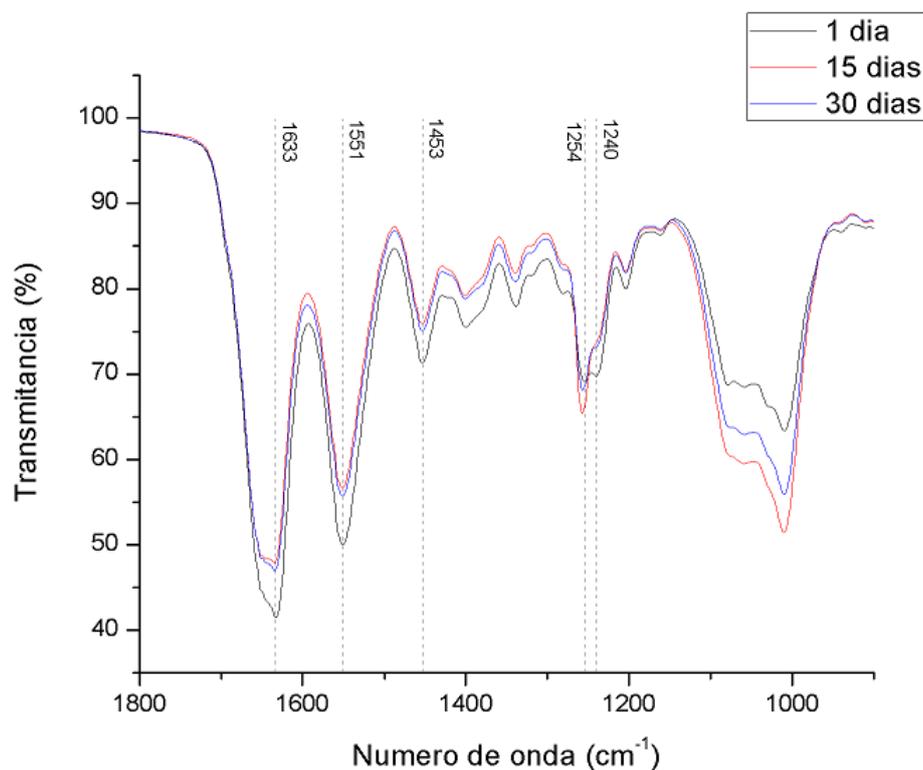


Figura 3.21: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS. 1800 cm^{-1} - 900 cm^{-1} .

3.5.2. Tratamiento térmico

Se fabricó una membrana de Colágena tipo I usando HBSS como medio. De ella se obtuvieron 3 fragmentos que se desprendieron del bloque de PDMS el mismo día que seca-ron, es decir no hubo envejecimiento sobre el bloque de PDMS. De estos tres fragmentos, a un fragmento no se le realizó ningún tratamiento, otro permaneció dos horas dentro de un horno a 60°C, y el otro permaneció cuatro horas dentro de un horno a 60°C. Para calentar las muestras, se aseguraron entre dos bloques de PDMS, que sólo sostenían dos orillas de la membrana y se colocaron después sobre un portaobjetos de vidrio.

Esta prueba se llevó acabo para verificar si exponer un chip con membrana a un proceso térmico, para acelerar la polimerización del PDMS y con ello su pegado, tenía influencia en la composición de la membrana.

Se muestran a continuación los resultados de la prueba de tratamientos térmicos.

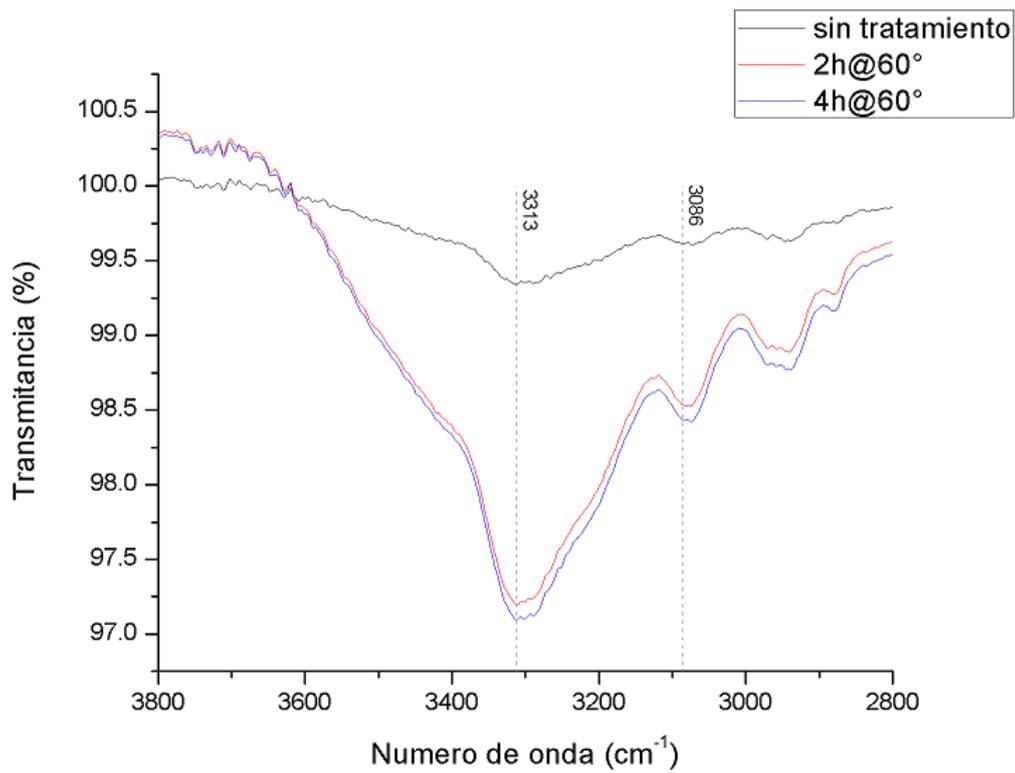


Figura 3.22: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS tras tratamientos térmicos. 3800 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} .

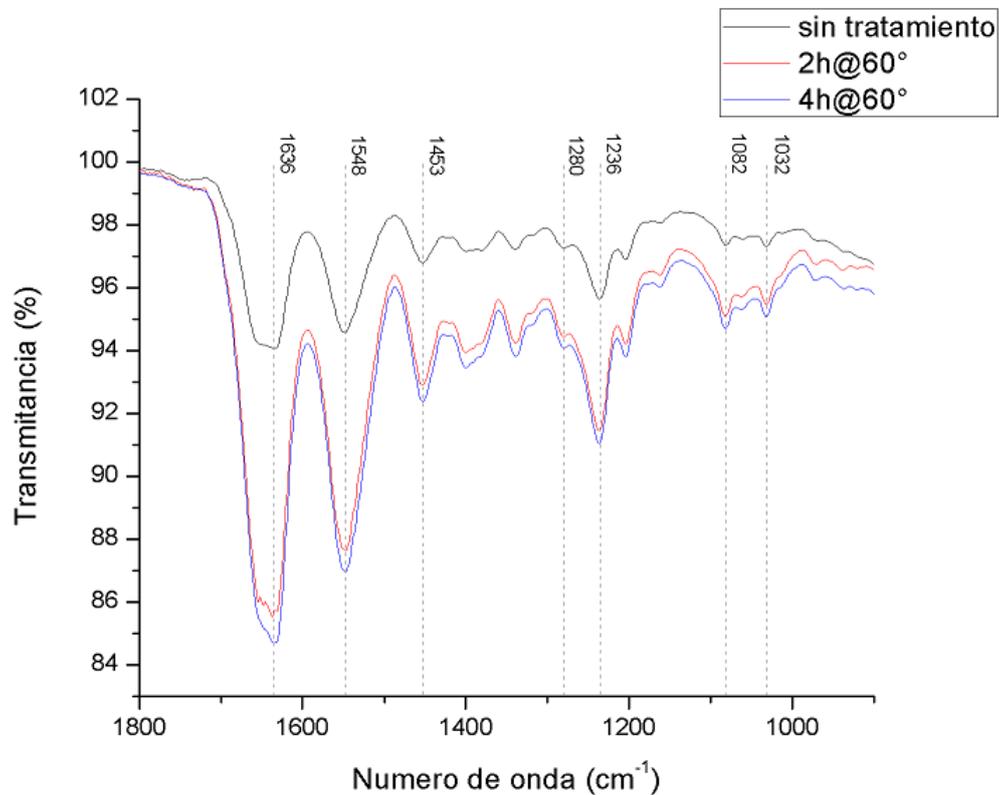


Figura 3.23: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS tras tratamientos térmicos. 1800 cm^{-1} - 900 cm^{-1} .

3.5.3. Colágena con Alginato de Sodio

Además de las bandas características de la Colágena tipo I especificadas en la sección anterior, en esta sección se buscan bandas características del Alginato de Sodio [30–32].

Molécula	Número de onda [cm^{-1}]
OH	3400-3200
CH ₂	2928
Ácido urónico	939
Ácido manurónico	884

Se obtuvo el espectro de la solución utilizada como material sacrificial y se identificaron las bandas como control para el resto de las muestras.

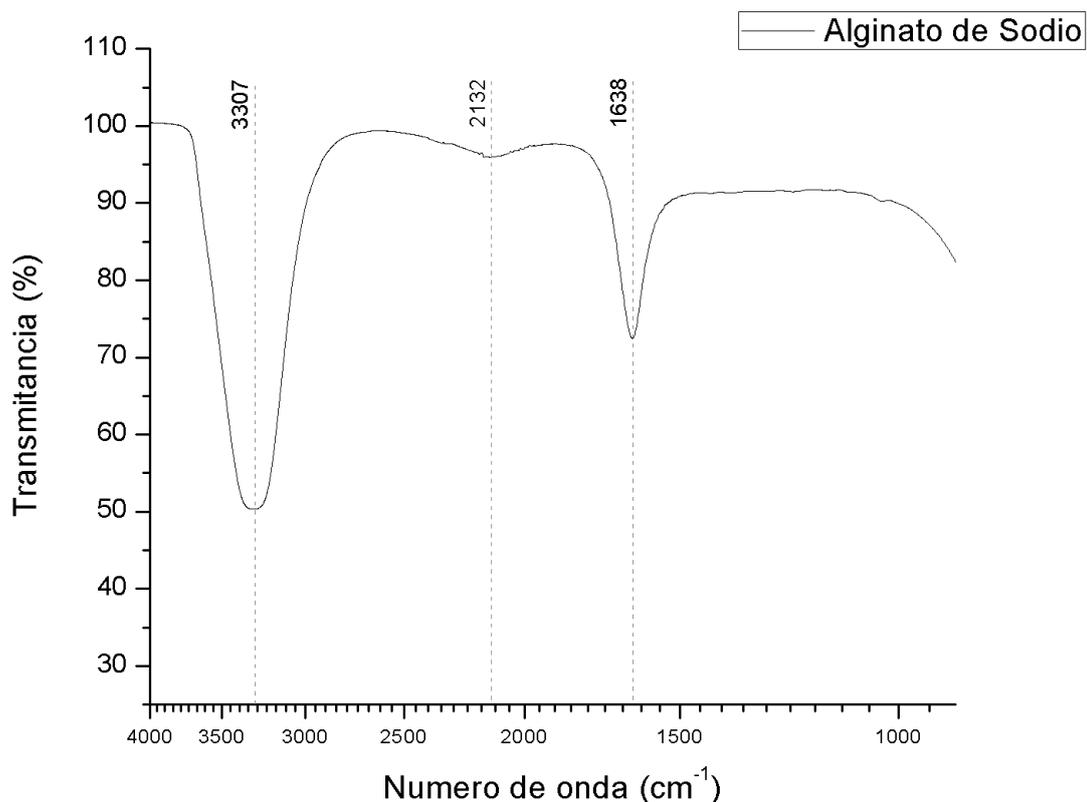


Figura 3.24: Espectro infrarrojo de solución de Alginato de Sodio utilizado como material sacrificial.

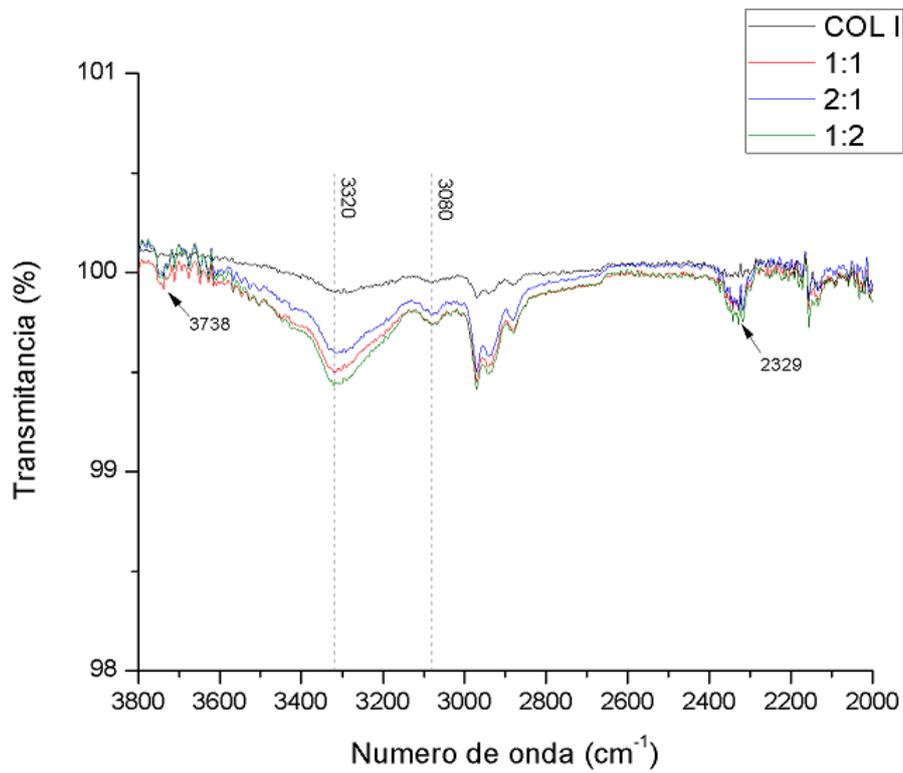


Figura 3.25: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS agregando material sacrificial en diferentes proporciones. 3800 cm^{-1} - 2000 cm^{-1} .

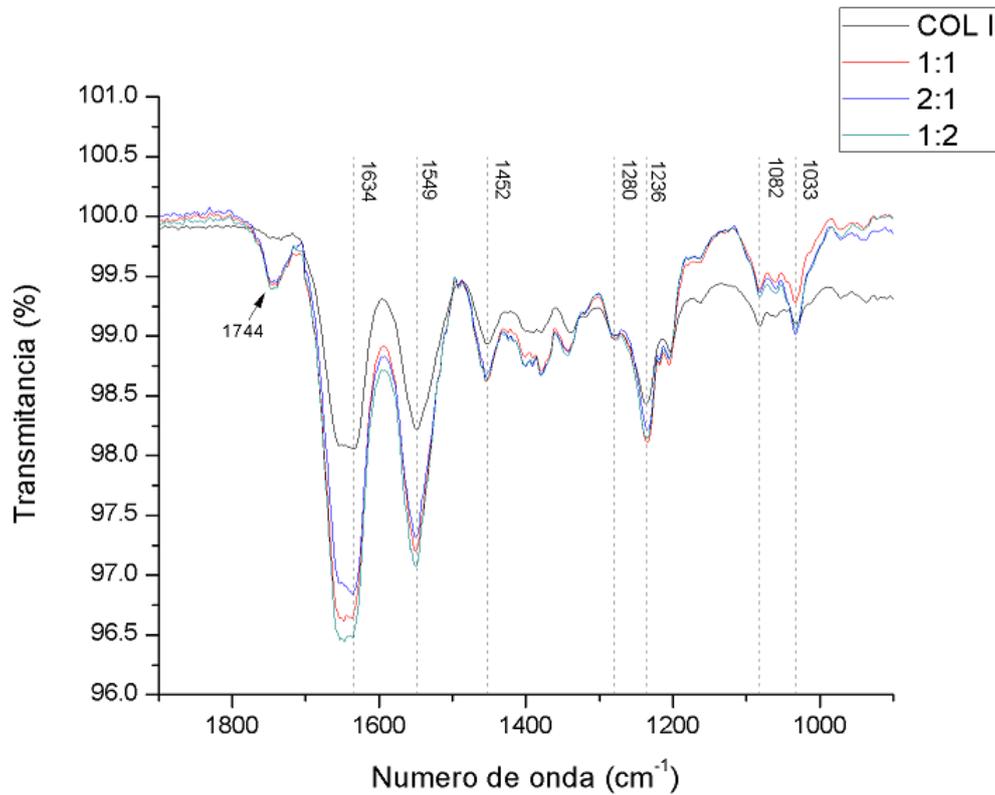


Figura 3.26: Espectro infrarrojo de membrana de Colágena fabricada con HBSS agregando material sacrificial en diferentes proporciones. 1900 cm^{-1} - 900 cm^{-1} .

3.6. Pruebas de Permeabilidad

Recordemos que un objetivo de la membrana de Colágena es separar espacialmente diferentes canales microfluídicos pero permitiendo el paso de factores solubles de un canal al otro a través de ella por procesos de difusión. Es decir, la membrana debe ser permeable a partículas de cierta dimensión.

Como prueba de concepto, para comprobar que la membrana es permeable, se utilizaron dispositivos que consisten en dos marcos de PDMS con membrana de Colágena entre ellos. Como solución marcada se utilizó agua desionizada con colorante rojo.

Se utilizó un dispositivo cuya “ventana” de membrana es de 5 mm de lado. Se colocó una gota de 60 μl de la solución de un lado de la membrana para que esta se humedeciera, después el dispositivo se colocó en un pozo de una caja de Petri donde se había cubierto el fondo con la solución marcada. Finalmente se colocó una gota de 60 μl de agua desionizada del lado superior de la membrana. Esta gota se dejó un cierto tiempo para observar cómo cambiaba su coloración, por proceso de difusión a través de la membrana. Se retiró esa gota con una micropipeta y se separó en otro pozo de la placa. Esto se repitió 5 veces para 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. En cada tiempo se colocó una gota de agua desionizada limpia.

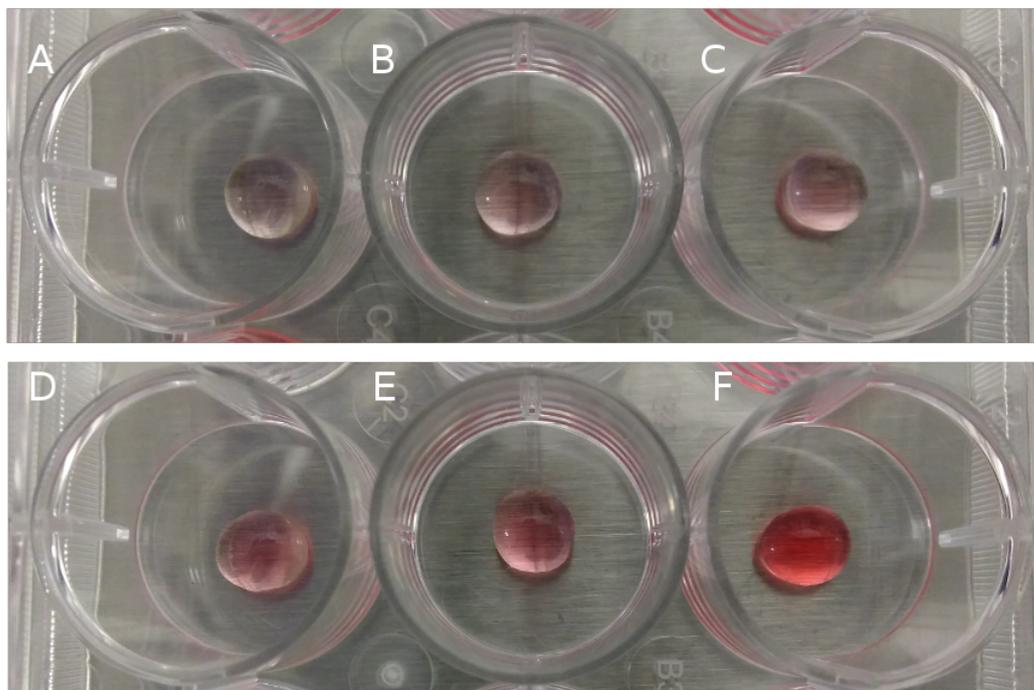


Figura 3.27: Comparativo de gotas obtenidas tras cierto tiempo en contacto con una membrana que separaba a la solución marcada del agua sin marcar. A) 5 minutos, B) 10 minutos, C) 15 minutos, D) 20 minutos, E) 25 minutos, F) gota control proveniente de la solución marcada.

Para obtener un análisis cualitativo de este comportamiento, se preparó una solución de

Isotiocinato de fluoresceína (FITC) Dextran FD20S en medio de cultivo DMEM. Las longitudes de onda de excitación y emisión del FITC Dextran son $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 490nm/520nm$ y se conoce que su tamaño corresponde a una partícula de 20 kDa.

Se preparó 1 ml de solución con concentración $25 \mu g/ml$. Se pesó el reactivo en polvo dentro de un microtubo y después se agregó el medio de cultivo en varios pasos. Para mezclar la solución, se colocó en el vortex. La fluorescencia del reactivo es máxima en un pH entre 7 y 8 así que se midió el pH del medio para conocer dicho valor.

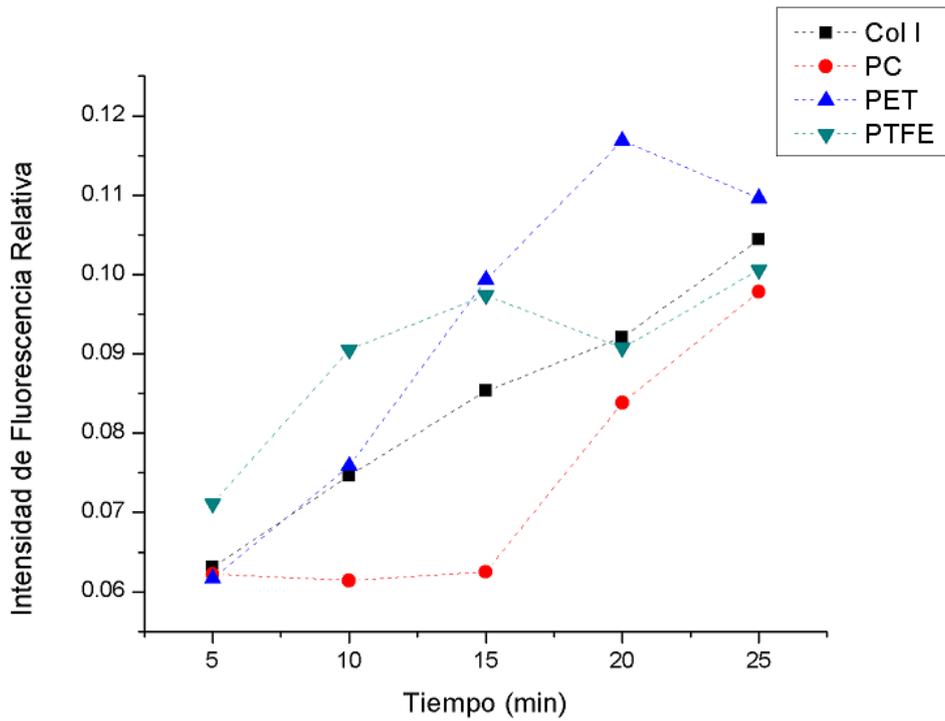
Se utiliza el mismo dispositivo de marco de PDMS con membrana porosa de la prueba concepto. Se utilizaron las siguientes membranas porosas:

- Colágena tipo I
- Colágena tipo I + Alginato de Sodio en proporción 1:2
- Colágena tipo I + Alginato de Sodio en proporción 2:1
- Policarbonato ²(PC)
 - Tamaño de poro: $5 \mu m$
 - Densidad de poro: $1 \times 10^5 cm^{-2}$
 - Espesor: $21 \mu m$
- Tereftalato de polietileno ² (PET)
 - Tamaño de poro: $5 \mu m$
 - Densidad de poro: $4 \times 10^5 cm^{-2}$
 - Espesor: $46 \mu m$
- Politetrafluoroetileno hidrofílica ² (PTFE) [Millipore Biopore TM]
 - Tamaño de poro: $0.4 \mu m$

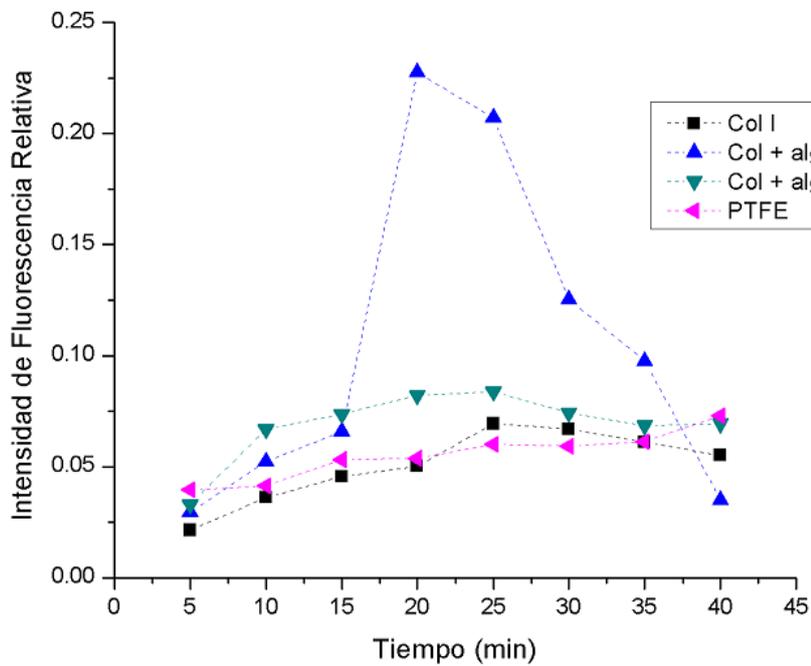
Se colocaron $40 \mu l$ de solución marcada de un lado de la membrana y $40 \mu l$ de medio limpio del otro lado. Se dejó que ambas gotas estuvieran en contacto durante diferentes tiempos que abarcaron de 5 a 45 minutos. Se recuperó la gota de la cara superior del dispositivo (inicialmente sin marcar) y se colocó en un pozo de una caja de 96 pozos.

Se utilizó el Lector Híbrido Multi-Modal Synergy H1 en modo intensidad de fluorescencia para obtener las intensidades de cada pozo para compararlos entre sí posteriormente.

²Valores de fabricante.

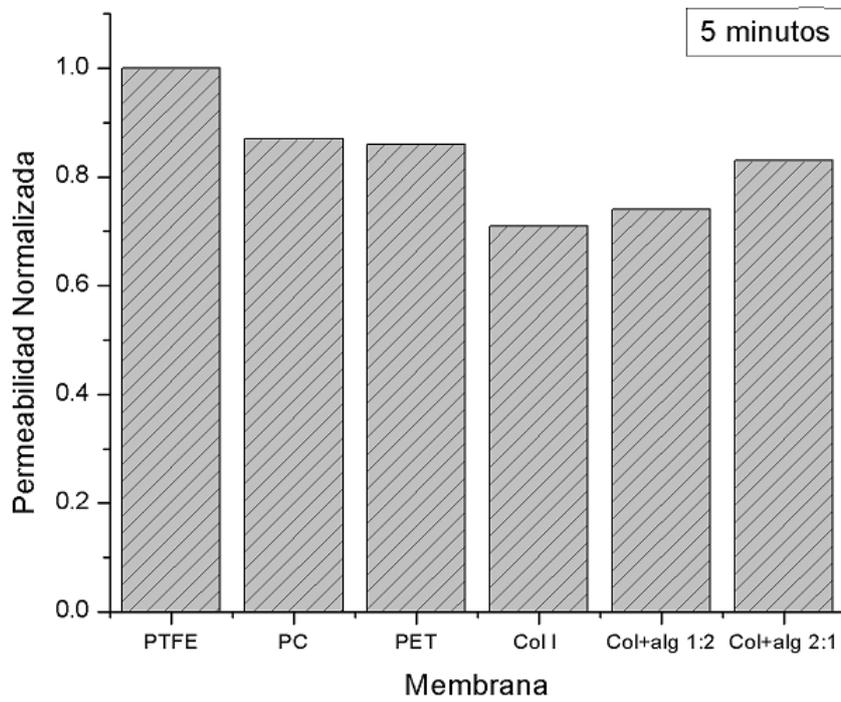


(a)

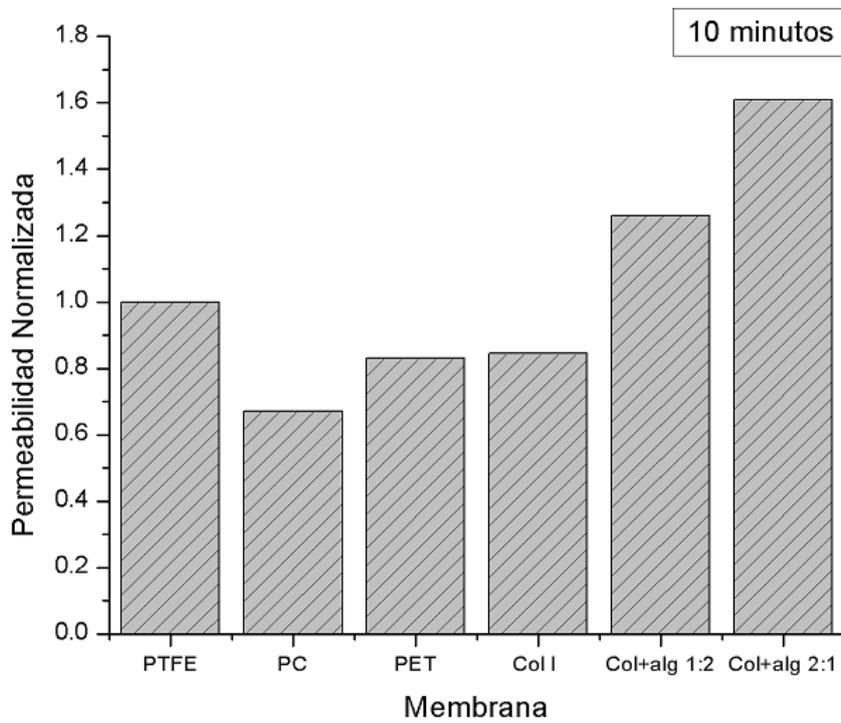


(b)

Figura 3.28: Gráfica de intensidad de Fluorescencia Relativa contra tiempo de contacto entre solución marcada y sin marcar separadas por diferentes membranas porosas: a) membranas de Colágena tipo I y membranas porosas comerciales, b) membranas de Colágena tipo I con y sin material sacrificial.



(a)



(b)

Figura 3.29: Permeabilidad Relativa de diferentes membranas porosas tras diferentes tiempos en contacto (a)5 minutos (b)10 minutos.

La permeabilidad de un soluto a través de una membrana porosa se ha estudiado para membranas con cultivos celulares endoteliales en monocapa, sistemas sin flujo convectivo donde el flujo del soluto es determinado sólo por fuerzas difusivas. En un sistema de dos compartimentos separados por membrana porosa, se coloca una molécula marcada en uno de los compartimentos con una concentración inicial. Los cambios de concentración de la molécula marcada en la solución sin marcar, a varios intervalos de tiempo, son utilizados para determinar la permeabilidad del marcador a través de la membrana porosa.

$$P = \frac{C_f V}{t C_i A} \quad (3.3)$$

donde P es el coeficiente de permeabilidad, C_f es la concentración de la gota recuperada, v el volumen recuperado, t el intervalo de tiempo C_i la concentración de la solución marcada y A el área de difusión [33–35].

Desconocemos el valor de la concentración de la solución recuperada. Por lo que se realizó una curva de calibración colocando solución marcada en diferentes concentraciones de FITC Dextran y midiendo la intensidad de fluorescencia. Con lo que se obtuvo:

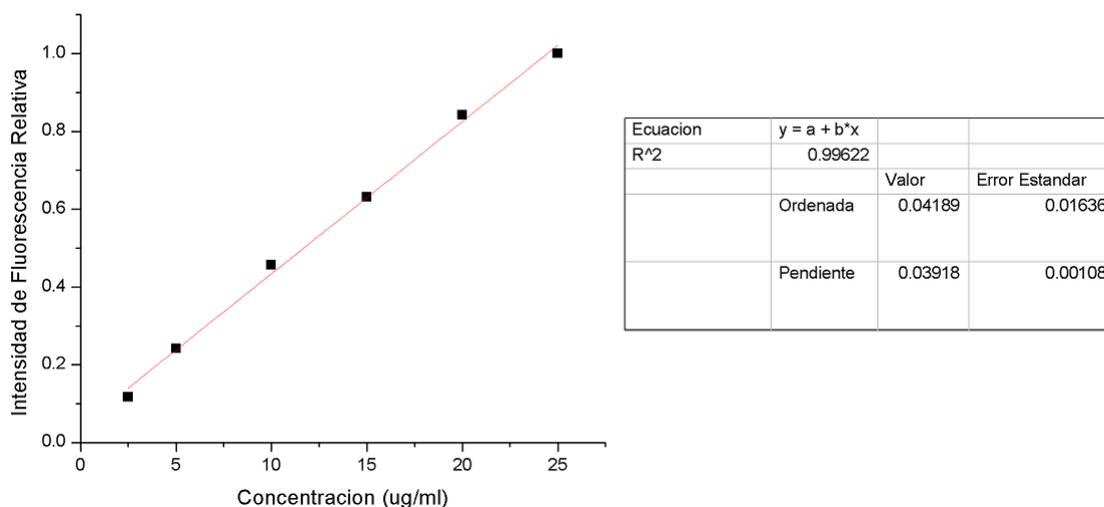


Figura 3.30: Gráfica y ajuste lineal de Concentración de FITC Dextran vs Intensidad de Fluorescencia Relativa.

Así, utilizando la ecuación

$$C_f = \frac{I_f - 0,04189}{0,03918}$$

obtendremos la concentración de cada gota recuperada en el experimento. Se sustituye en la ecuación 3.3 los valores $V = 40\mu l$, $C_i = 25\mu g/ml$ y $A = 16mm^2$ para cada tiempo t y concentración C_f . Promediando se obtiene una permeabilidad del marcador a través de cada membrana.

Membrana	Coefficiente de Permeabilidad	Desviación Estándar
Colágena tipo I	2.45×10^{-6} cm/s	1.39×10^{-6}
Millipore	2.82×10^{-6} cm/s	0.41×10^{-6}
Colágena tipo I con Alginato (1:2)	5.60×10^{-6} cm/s	1.65×10^{-6}
Colágena tipo I con Alginato (2:1)	8.83×10^{-6} cm/s	1.44×10^{-6}

Capítulo 4

Aplicaciones

Se han caracterizado las propiedades de la membrana de Colágena tipo I para garantizar su uso como sustrato para cultivo celular donde las células puedan adherirse, no puedan migrar a través de ella pero reciban nutrientes a través de procesos de difusión de un lado al otro . Ahora se reportarán los procedimientos estandarizados para fabricar un chip microfluídico donde la membrana pueda ser integrada, el procedimiento para sembrar en él dos diferentes tipos celulares, así como los resultados obtenidos en cuanto a la adhesión celular, viabilidad del cultivo y restricción espacial al usar la membrana como sustrato para cultivo celular.

4.1. Cultivo Celular: Antecedentes

Se llama cultivo celular al conjunto de técnicas que permite el mantenimiento de células *in vitro*. Las células pueden ser primarias: provienen directamente de un tejido u órgano ; o secundarias: donde se incluyen las líneas celulares de un tipo único que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio. En particular, las líneas celulares pueden ser inmortalizadas, donde su división depende de anclaje y existe inhibición por contacto; transformadas, donde la proliferación es independiente de anclaje y no hay inhibición por contacto; o tumorales que al ser inyectadas a un hospedero, invaden, forman tumores y sufren metástasis.

El cultivo celular permite controlar factores del medio en que se encuentren las células como la composición (sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas), el pH, temperatura, niveles de O_2 y CO_2 , entre otros [36].

A grandes rasgos, lo que se busca en el cultivo celular es mantener el ambiente controlado para promover la adhesión y proliferación de células, lo cuál incluye cambiar el medio de cultivo constantemente. Al llegar a un estado de confluencia, es decir que han ocupado todo o casi todo el espacio disponible, se debe hacer una resiembra. Para este proceso se agrega una enzima como la tripsina que degrada enlaces peptídicos rompiendo las adhesiones que se han formado entre célula-sustrato y célula-célula. Estas células son levantadas y colocadas en un nuevo sustrato con medio de cultivo nuevo que inhibe la acción de la tripsina permitiendo que se adherían al nuevo sustrato. Este ciclo se repite

hasta que se utilizan dichas células en un experimento.

Para este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- HepG2: Línea celular inmortalizada que deriva de un tejido extraído del hígado de un varón caucásico americano de 15 años diagnosticado con hepatocarcinoma.
- PAE: Línea celular endotelial derivada de aorta porcina.
- 3T3-L1: Línea celular inmortalizada derivada de un embrión de ratón.

Para observar a las células pueden utilizarse técnicas como la epifluorescencia donde las células son marcadas a través de moléculas que expresan fluorescencia al ser excitadas con una longitud de onda específica. Para esta técnica se utiliza un microscopio óptico Nikon D750 y una lámpara de mercurio que provee la luz con que es excitada la muestra.

Los marcadores utilizados en este trabajo fueron Calceína AM y Mitotracker Red CMXRos.

Calceína AM. Es un colorante que penetra la célula y puede utilizarse para determinar viabilidad celular en la mayoría de las células eucariotas. En células vivas, la Calceína AM no fluorescente se convierte en calceína con fluorescencia verde tras la hidrólisis (degradación de sustancias orgánicas por acción del agua) del acetoximetil éster por parte de las esterasas intracelulares. Las longitudes de excitación y emisión son $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 495nm/515nm$ [37]. La proporción en que se prepara la calceína AM es de $1 \mu l$ en 1 ml de medio de cultivo.

Mitotracker Red CMXRos. Es un colorante rojo fluorescente que tiñe las mitocondrias de células vivas. Su acumulación depende del potencial de la membrana. La molécula no fluorescente, al entrar a una célula viva, es oxidada por las mitocondrias convirtiéndola en una molécula fluorescente. La longitud de onda de excitación y emisión es $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 579nm/599nm$ [38].

Este último marcador se encontraba liofilizado, es decir deshidratado. Se fabricó una solución stock al disolverlo en Dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 1 mM. Como el peso molecular del MitoTracker es de 531.52 g/mol, se disuelve en 94.1 μl de DMSO. La concentración utilizada de MitoTracker en el cultivo es de 500 nM se utiliza la ecuación 2.1 para determinar el volumen de solución stock a utilizar.

4.2. Cultivo Celular sobre membrana de Colágena

Se hizo cultivo celular de la línea HepG2, células provenientes de un hepatocarcinoma humano. Al tener cajas de Petri con un porcentaje de confluencia adecuado, es decir que las células hayan proliferado hasta cubrir un 70 %-90 % aproximado de la superficie

de la caja, las células son levantadas colocando tripsina e incubando por 2 minutos. Para inhibir la función de la tripsina, se coloca un nuevo volumen de medio de cultivo HBSS.

Para observar a las células, estas son marcadas con Calceína AM. Para esto se retira el medio en que se encontraban y se coloca medio de ayuno con Calceína AM en la proporción indicada. Se incuban las células en esta solución durante 5 minutos. Tras este periodo, se retira el medio de ayuno y se coloca medio MEM limpio. Y es esta solución con células la que se coloca en el recipiente donde se encontraba la membrana de Colágena. Se observó en el microscopio de epifluorescencia, encontrando células adheridas al fondo de la caja de Petri y células adheridas a la membrana. Es importante mencionar que durante el proceso de resiembra, la membrana se encontraba flotando en el medio de cultivo.

Las células se dejan incubando sobre la membrana durante una noche. Posteriormente se fijan las células. Para ello se realizó un lavado con PBS y se colocó Paraformaldehído. Se deja incubar a 37°C durante 20 minutos. Se sacó la membrana de la solución y se coloca entre dos cubreobjetos con una resina Mowiol que permite su preservación.

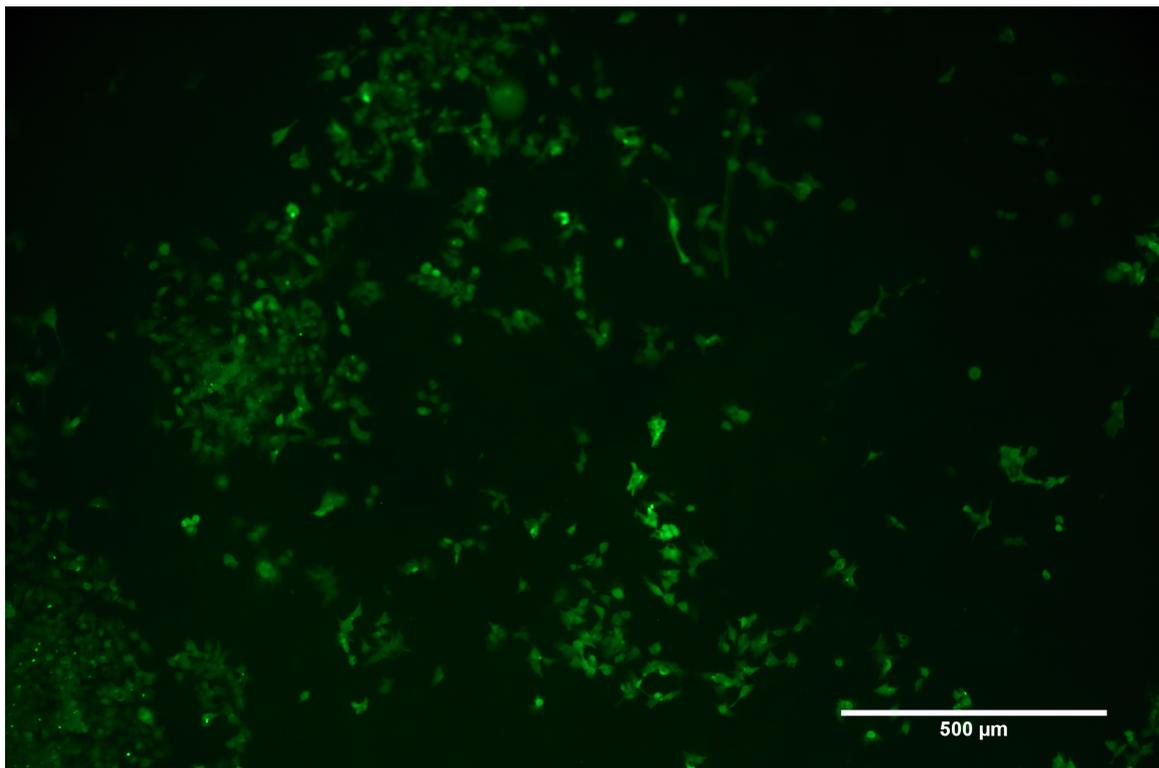


Figura 4.1: Fotografía de cultivo de 24 horas de HepG2 marcadas con Calceína sobre membrana de Colágena tipo I. Objetivo 10x

Se observan células marcadas en verde, por el funcionamiento del marcador, se puede asociar que estas células se encontraban vivas al ser fijadas.

4.3. Integración en un Chip con Cocultivo celular separado por membrana de Colágena

Uno de los elementos a mimetizar en los dispositivos organ-on-chip es la arquitectura del tejido. Esta arquitectura no sólo se refiere a la localización de las células en él sino que también incluye la presencia de los diferentes tipos celulares que conforman al tejido. Estos tipos celulares pueden enviar señales bioquímicas entre ellos a través de comunicación parácrina, es decir, que no necesariamente se encuentran en contacto directo.

Es por eso la importancia de poder contar con un dispositivo con cocultivo, donde dos o más tipos celulares puedan ser sembrados, manteniéndolos sin contacto directo pero donde exista una vía de comunicación por difusión.

El diseño del dispositivo microfluídico que fue fabricado para los posteriores experimentos se basó en [39]. Tras obtener el diseño, se estructuró un bloque de PMMA a través de ablación láser y un bloque más por microfresado a través de un CNC. Posteriormente se realizó la réplica en PDMS 184 de ambos canales, superior e inferior. Una membrana de Colágena previamente fabricada fue adherida a ambos canales y se probó su sellado. Todo lo anterior como se describió en el capítulo 2. Posteriormente se realizó el cultivo celular como se describe a continuación.

4.3.1. HepG2 - PAE

Se utiliza un chip de dos canales paralelos separados por membrana de Colágena, a partir de un molde de PMMA estructurado por ablación láser con un equipo láser. Se puede observar en la figura 4.2 que al integrar el chip, el PDMS utilizado como adhesivo llegó hasta los canales, dificultando así el paso de flujo a través de ellos. En este chip, las entradas y salidas de ambos canales se encuentran en un mismo lado del chip.

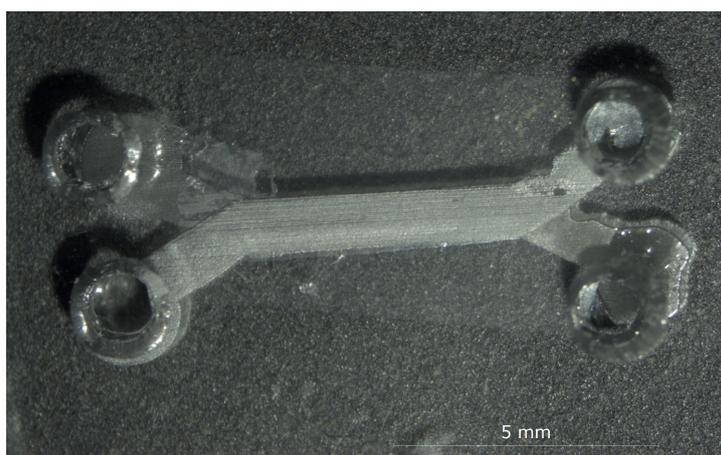


Figura 4.2: Chip de dos canales separados por membrana de Colágena tipo I.

Para hacer el cultivo en el chip, primero se purgó una jeringa Hamilton con la que se realizaron dos lavados de los canales con etanol al 70 % estéril. Se colocaron 200 μ l en

la jeringa y después con un adaptador, se hicieron pasar por cada canal. Después de los dos lavados con etanol, se hicieron dos lavados más con PBS con antibiótico (Penicilina-Estreptomicina). Para retirar el sobrante de las soluciones, se utilizó una pipeta Pasteur conectada a la línea de vacío. Finalmente se purgó el chip con medio de cultivo (DMEM).

Se hizo cultivo celular de PAE (Porcine Aortic Endothelial) hasta obtener cuatro cajas de Petri de 10 cm a un 95 % de confluencia. A su vez se hizo cultivo de HepG2 hasta obtener cinco cajas de Petri del 10 cm a un 60 % de confluencia. El tratamiento de las células consistió en desprenderlas de las cajas de Petri utilizando Tripsina. Se coloca un volumen inicial de tripsina para hacer un lavado, que se colecta para colocar un segundo volumen de tripsina dentro de las cajas de cultivo que se incubaron durante 5 minutos. Posterior a esto se coloca un volumen de DMEM en las cajas de Petri. Con ayuda de una pipeta, se recolectan las células inclinando las cajas de cultivo y después el volumen colectado es colocado en forma circular en la parte superior de la caja, permitiendo que se vuelva a concentrar en la parte inferior, esto para asegurar que no haya cúmulos de células y que se hayan desprendido de la caja. Este proceso se repite en todas las cajas de Petri y el volumen con las células es concentrado en un tubo cónico.

Se tomaron 10 μl de la solución para realizar el conteo de células. Para esto la gota es colocada sobre una cámara de Neubauer y sobre ella un cubreobjetos. Se contaron las células presentes en los cuadrantes de las esquinas superior e inferior derecha e izquierda observados en la figura 4.3. De estos valores se obtuvo el promedio de células contadas y se multiplica por 10 000, obteniendo así la concentración por mililitro. Al multiplicar por el volumen en el tubo cónico, se obtiene el número de células total.

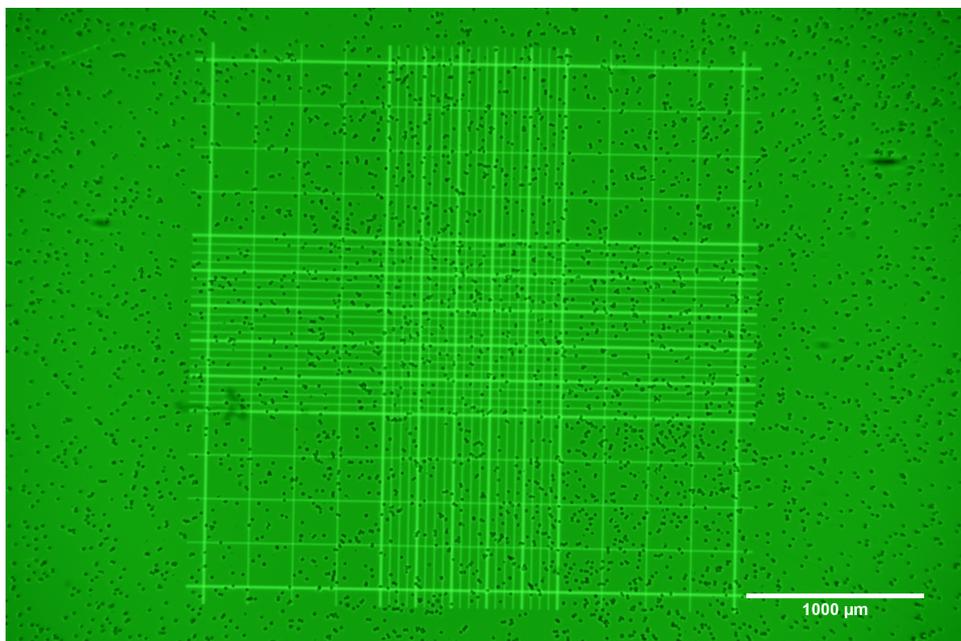


Figura 4.3: Fotografía de la cámara de Neubauer con células PAE. Objetivo 4x

Paralelamente, se centrifugó el tubo cónico durante 1 minuto a 1000 rpm para concentrar las células en una pastilla o pellet. Se retira el medio sobrante y se coloca medio de

cultivo (DMEM) nuevo para llevar la solución a una concentración de células establecido. A continuación se muestra una tabla con los valores utilizados para ambos tipos celulares.

	HepG2	PAE
Concentración [células/ml]	2,260,000	2,620,000
Número de células en volumen colectado	27,120,000	62,880,000
Concentración de células sembradas [células/ml]	10,000,000	8,900,000

Utilizando nuevamente la jeringa de Hamilton, se colocaron $200 \mu\text{l}$ de medio de cultivo con células en los canales. Se identificó la entrada y salida de cada canal para colocar cada tipo celular en uno diferente. Se muestra en la figura 4.4 con un círculo verde el inlet y outlet del canal donde se sembraron las células endoteliales mientras que en rojo el inlet y outlet del canal donde se sembraron las células HepG2.

Primero se sembraron las células endoteliales (PAE). Se colocó el chip dentro de una caja de Petri con división, donde se colocó agua estéril para evitar que el medio de cultivo dentro del canal se evaporara al colocarse dentro de la incubadora. Después de permanecer ahí unas horas, se hizo el marcaje de las células con Calceína AM. Se mezcla $1 \mu\text{l}$ de Calceína en 1 ml de medio de cultivo. Se colocó en el canal y se dejó durante 5 minutos dentro de la incubadora.

Se utiliza el microscopio Nikon D750 y la lámpara de fluorescencia para iluminar a la muestra con luz azul y observar la fluorescencia de la calceína en verde. Al comprobar la presencia de células marcadas en los canales, se hace un lavado final con nuevo medio de cultivo DMEM dejando una gota de medio sobre los canales.

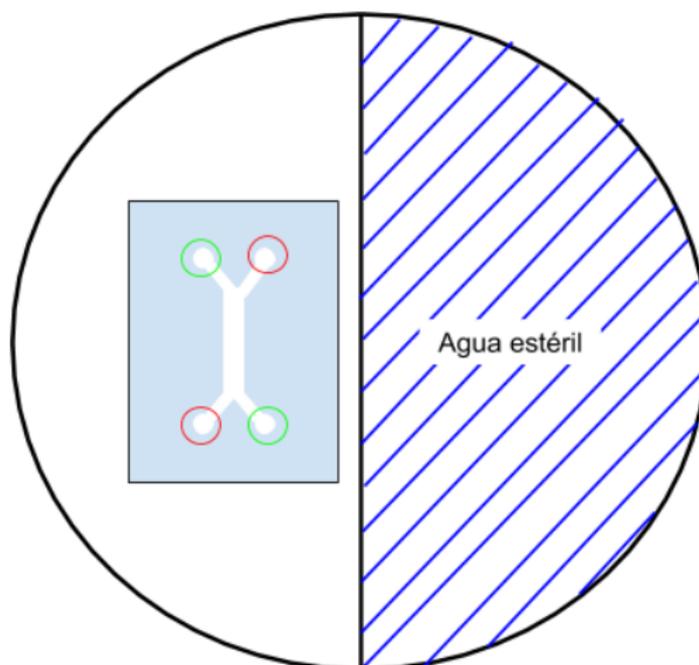


Figura 4.4: Esquema de una caja de Petri donde se coloca el chip así como las entradas y salidas del chip identificadas por el color del fluorocromo utilizado.

Las células HepG2 fueron sembradas el día siguiente. Antes de sembrarse, fueron marcadas con MitoTracker Red CMXRos con longitud de onda de excitación y emisión de 579 nm (verde) y 599 nm (rojo) respectivamente. El marcador se encontraba liofilizado y fue preparado como se indica en la sección 4.1.

Se agrega 3.5 ml de MitoTracker a la solución con células y se coloca en la incubadora durante 45 minutos.

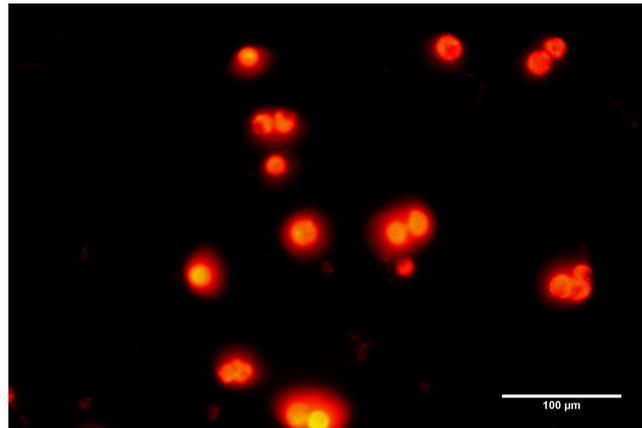


Figura 4.5: Microfotografía de células HepG2 no adheridas marcadas con MitoTracker. Objetivo 40x

De la figura 4.5 se obtienen los diámetros de las células con lo que se obtiene un diámetro promedio de $21.76 \pm 3.64 \mu m$.

Después se colocan con la jeringa Hamilton y el adaptador en el canal correspondiente. Se verifica con el microscopio de epifluorescencia si se observan células en el canal y ya que se encontraban en el canal inferior, se coloca el chip boca abajo. Así, debido a la gravedad, las células decantarán hacia la membrana de Colágena.

Se verificó el cultivo a las 24 horas de sembrar las células HepG2.

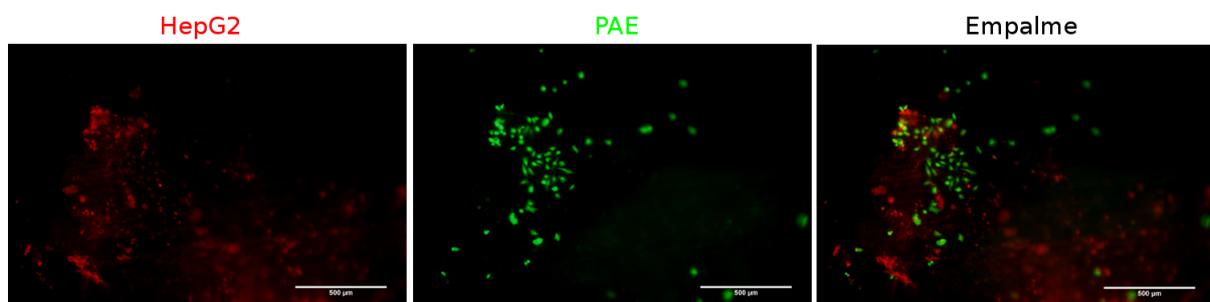


Figura 4.6: Microfotografía de células HepG2 24 horas de cultivo (izq) células PAE 48 horas de cultivo (centro) y unión de ambos marcadores (der). Objetivo 10x. Barra de escala correspondiente a $500 \mu m$

Es importante recalcar que los marcadores utilizados en este experimento hacen marcaje sobre células vivas. Así que se observa que las células tras ser sembradas en el chip, crearon adhesión a la membrana de Colágena y permanecieron con vida. Fueron revisados ambos canales hasta una semana después y aún se observaban algunas células marcadas.

Aun así, se observó que el marcador Calceína AM perdía la intensidad de fluorescencia con el paso de los días por lo que se debió colocar en más de una ocasión.

Es posible observar también diferentes geometrías en los dos tipos celulares (morfolo-
logía) mientras que las células endoteliales son más alargadas, las células HepG2 presentan una forma redonda.

Sobre el dispositivo, se pudo apreciar durante el experimento que hubo zonas del canal que no estaban bien selladas, por lo que las células pudieron adherirse a material fuera del canal.

4.3.2. HepG2 - 3T3-L1

Para este experimento se utilizaron chips obtenidos de réplicas de un molde de PMMA estructurado en CNC. Los inlets y outlets de cada canal se perforaron en el mismo bloque de PDMS donde se encontraba el canal. Es decir en el bloque superior se encuentra la entrada y salida del canal superior y en el bloque inferior la entrada y salida del canal inferior.

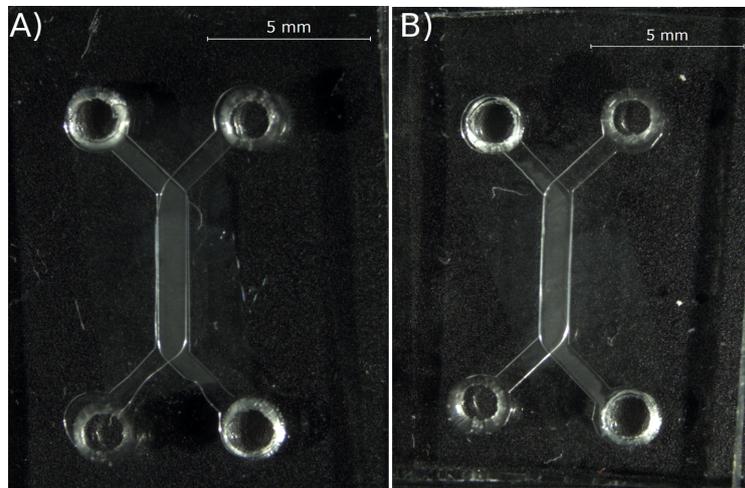


Figura 4.7: Chips fabricados a partir de un molde de CNC. A) Chip 05. B) Chip 06.

Tras tener los chips fabricados, estos se lavaron. Se utiliza una jeringa Hamilton y un adaptador para hacer pasar en cada canal $200\mu\text{l}$ de etanol al 70 % estéril y $200\mu\text{l}$ de PBS con antibiótico (Penicilina-Estreptomicina). El restante se retira con una pipeta Pasteur conectada a la línea de vacío. Finalmente se dio un lavado más de los canales con medio de cultivo, antes de sembrar las células. Se debe mencionar que los diferentes tipos celulares son sembrados con 24 horas de diferencia, para permitir la adhesión de cada tipo celular. Además al sembrar el segundo tipo celular, el chip debe ser volteado ya que las entradas

y salidas de cada canal se encuentran a cada lado del chip.

Para ambos tipos celulares, se levantaron las células y se colectó el volumen final proveniente de cuatro cajas Petri de 10 cm por tipo celular.

Se colecta 10 μl de la solución con células y son contadas con una cámara de Neubauer.

	HepG2	3T3-L1
Concentración [células/ml]	2,287,500	1,282,500
Células en 16 ml	36,600,000	20,520,000

Cada solución es centrifugada a 1000 rpm durante un minuto para obtener un pellet en el fondo del tubo cónico. Se retira el volumen de medio y se coloca un nuevo volumen. Este volumen dependerá de la concentración que se busca tener. Al colocar el volumen, se resuspenden las células.

	HepG2	3T3-L1
Concentración buscada [células/ml]	8,000,000	10,000,000
Volumen de medio [ml]	4.6	2.05

Sobre el marcaje de las células: Para las HepG2 se utiliza Mitotracker y para las 3T3-L1 se utiliza calceína AM.

HepG2: La concentración utilizada de MitoTracker es de 500 nM. Tras haber centrifugado la solución de 16 ml se retiró el medio de cultivo MEM y se colocó el nuevo volumen de 4.6 ml para la concentración buscada. Pero dicho volumen (4.6 ml) fue de medio de ayuno. Este medio no contiene suero y en él se colocará el marcador ya que de lo contrario, el marcaje se vería inhibido. Para la concentración deseada de MitoTracker, se colocan 2.3 μl de marcador a la solución con células y se dejó incubando durante 55 minutos. Se centrifuga nuevamente y se retira el medio marcado, para volver a colocar los 4.6 ml de MEM y resuspender las células. Es esta solución la que se inyectará al canal.

3T3-L1: De los 16 ml colectados tras desprender las células, se colocan 1.6 μl de calceína AM. Ya que se conoce que la relación entre medio de cultivo y calceína es de 1 μl de calceína por 1 ml de medio. Se incubaron durante 8 minutos y después se continúa al paso de centrifugar para obtener el pellet y resuspender en el volumen adecuado.

Chip 05. El chip 05 se sembró con concentraciones diferentes de células. Para las HepG2 se probó sembrar concentraciones de 16 millones de células/mililitro, 32 millones de células/mililitro hasta 64 millones de células/mililitro. En esta ocasión, para sembrar las células se había dejado el canal con medio limpio y se buscó desplazar ese volumen con el medio con células y no colocar más volumen que éste. Cada concentración se sembró en el canal y se observó posteriormente en el microscopio de fluorescencia para observar si el canal era cubierto completamente con las diferentes concentraciones. Entre cada intento se lavó el canal colocando medio de cultivo limpio en el canal, retirando el exceso

pero dejando medio en el canal para repetir el método de sembrado descrito anteriormente.

Para las 3T3-L1, se llevó a una concentración de 40 millones de células/mililitro. Al voltear el chip para hacer el sembrado, se observó que el chip no se adhería a la caja de Petri, lo que da información de que el chip parece haberse pandeado pero aún con este defecto, sólo hay flujo por el canal deseado. En este caso no se colocó medio limpio antes de sembrar sino que sólo se buscó llenar el aforo del canal con medio con células. Esto para evitar la presencia de flujo dentro del chip que promoviera que células previamente adheridas se desprendieran del sustrato.

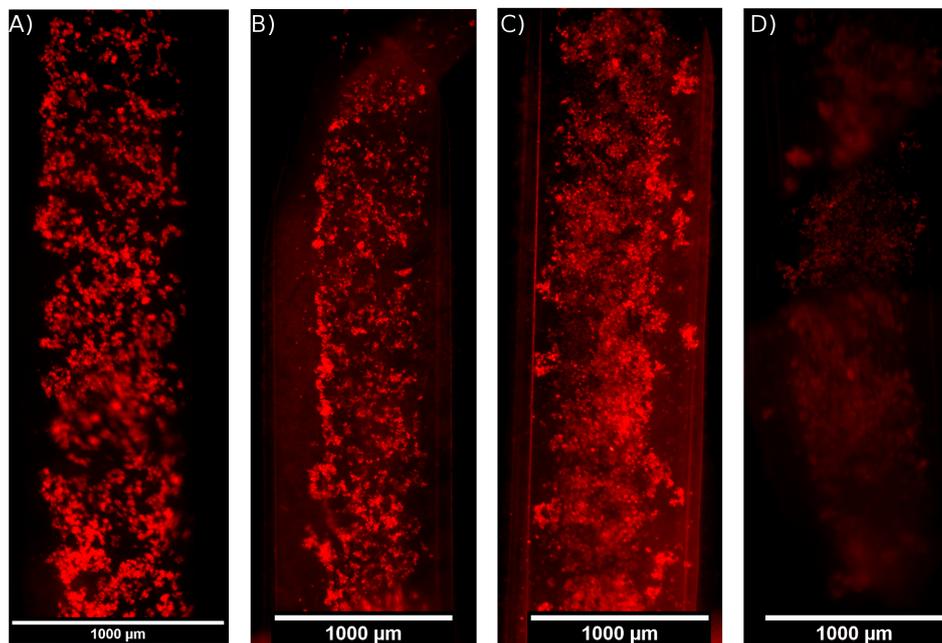


Figura 4.8: Evolución del cultivo de hepatocitos HepG2 en una membrana de Colágena contenido en un chip microfluídico. A) Microfotografía tras inyectar las células en el canal. B) Microfotografía del cultivo de 24 horas de HepG2. C) Microfotografía del cultivo de 24 horas de HepG2 ,tras haber inyectado en el otro canal células 3T3-L1. D) Microfotografía del cultivo de HepG2 con 48 horas de sembradas. Se sembraron células a una concentración de 64 millones/mililitro y están marcadas con MitoTracker las fotografías están enfocadas en el plano de las HepG2. Objetivo 4x.

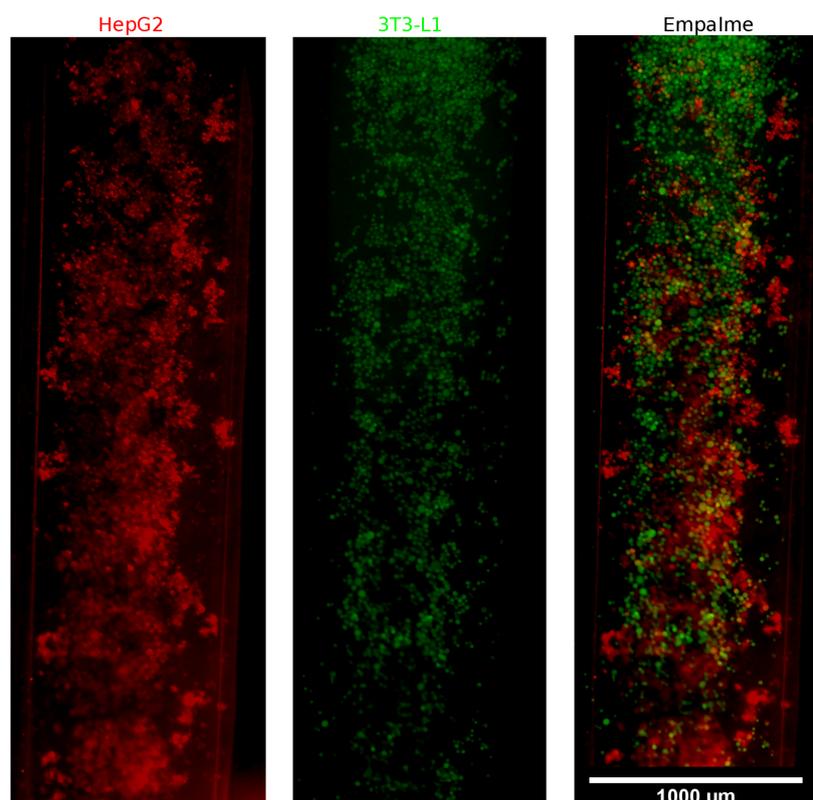


Figura 4.9: Canal del chip 05 enfocado en el plano de las células 3T3-L1. Objetivo 4x . Izquierda: Cultivo de 24 horas de células HepG2 marcadas con MitoTracker Centro: Cultivo recién sembrado de células 3T3-L1 marcadas con calceína AM Derecha: Sobreposición de ambas fotos anteriores mostrando el cocultivo.

En la figura 4.8, referente al chip 05, donde se muestra la evolución del cultivo de HepG2 en su canal podemos apreciar un mayor número de células, en comparación con el cultivo de la sección anterior, por lo que vemos que sí es requerida una mayor concentración para cubrir la superficie de la membrana. Recordemos que pasó de 8 millones de células/ mililitro a 64 millones de células/mililitro. Es importante mencionar también que la fotografía del centro derecha, se encuentra “en espejo” a las de la izquierda. Debido a que los chips fueron volteados al sembrar el segundo tipo celular. Notemos que al pasar de la fotografía central izquierda a la central derecha, las células se encuentran en posiciones diferentes, sobre todo hacia los bordes del canal. Por la forma en que fueron sembradas las células, en la fotografía el flujo inyectado va de abajo hacia arriba. Por lo que podemos identificar dos fenómenos: 1. que hacer pasar un flujo por uno de los canales, tiene influencia en el otro canal al ya tener un fluido en él; 2. aún después de 24 horas de haber sido cultivadas, no todas las células HepG2 se habían adherido a la membrana de Colágena. En la última fotografía, de la extrema derecha, no es posible apreciar todo el canal ya que la fotografía se tomó sin haber retirado el exceso de medio de cultivo nuevo que se colocó al canal. Para evitar que las células se desplazaran. Aunque después de tanto tiempo de cultivo, las células ya adheridas no deberían verse afectadas por retirar el medio.

En la figura 4.9, referente al chip 05, se observa una cantidad mayor de células en ambos

canales en comparación con el cultivo de la sección anterior. Aún así, el volumen colocado no es suficiente para cubrir toda la superficie de la membrana (como se esperaría de una monocapa). Nuevamente, para los fibroblastos marcados con calceína AM (fotografía central) se observan algunas células más extendidas que el resto. Es decir células ya adheridas a la membrana de Colágena.

Chip 06 Para el chip 06, primero se hicieron pasar 200 μl de medio con células HepG2 en una concentración de 8 millones de células/mililitro. El excedente no se retiró de la salida. Se observaron las células en el microscopio de fluorescencia y después sí se retiró el medio de cultivo excedente de la salida y se colocó nuevo medio con células. Tras realizar ésto se volvieron a observar las células en el microscopio encontrando que el retirar el excedente provocó que las células empezaran a desplazarse. Por lo que se intentó retirar el exceso con papel absorbente (kimwipe). Hacer eso sólo causó que las células más cercanas al outlet se desplazaran. Antes de voltear el chip, se colocaron gotas de medio nuevo en el inlet y outlet del canal donde se sembraron HepG2. Se voltea el chip y se presiona contra la caja de Petri para evitar que haya burbujas entre ellos.

Al sembrar las células 3T3-L1 , se hicieron primero dos lavados con medio de cultivo sin células en el canal vacío que se retiró con la pipeta Pasteur. Se hace pasar 200 μl de solución con células con una concentración de 10 millones de células/mililitro. Se retiró el exceso de medio a la salida utilizando una pipeta pasteur que no estaba conectada a la línea de vacío, es decir, sólo por capilaridad del medio en la pipeta fue que se retiró el exceso.

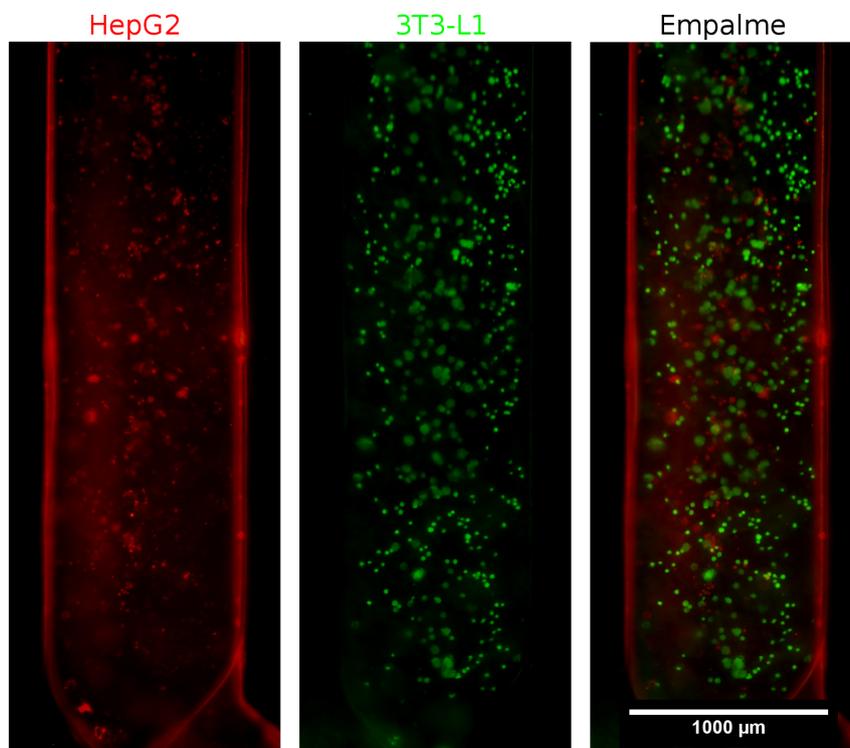


Figura 4.10: Canal del chip 06 enfocado en el plano de las células 3T3-L1 objetivo 4x .

En la figura 4.10, referente al chip 06, se observa un mayor número de células en ambos canales a diferencia del caso de HepG2 y PAE (figura 4.6) donde la concentración inyectada de ambos tipos celulares fue la misma. Así que podemos observar que la calidad de este chip es mejor ya que evita la formación de flujos que arrastren a las células lejos de la membrana. Recordemos que la diferencia entre los chips se encuentra en el molde del que fueron fabricados, donde la topografía del molde, resultado de la ablación láser, dificulta el sellado del chip y promueve que se inunden de PDMS durante el ensamblaje.

De la columna central, fibroblastos 3T3-L1 marcadas con calceína AM, se puede observar que hay ciertas células fuera de foco que se observan con una morfología diferente, con una forma extendida, a las que se encuentran enfocadas, que se observan redondas. Al mover el foco del microscopio se observó que las células más extendidas se encontraban más abajo que las células redondas. Esto indicaría que las células más cerca a la membrana de Colágena son aquellas cuya forma cambia hacia una más extendida, es decir que ya se han adherido a la membrana.

Por la forma en que funcionan los marcadores utilizados (degradación por hidrólisis para la calceína y oxidación en la mitocondria para el MitoTracker) se puede pensar que las células marcadas se encuentran vivas. Pero no se puede asegurar nada ya que no se ha realizado un ensayo de vida/muerte o viabilidad. Así como tampoco se puede asegurar que las células que se encuentran tras varias horas de cultivo sean las mismas que las inyectadas ya que no se ha hecho un ensayo de proliferación.

Se siguió revisando el cultivo. A una semana, se tomaron fotografías del canal 06 donde el marcaje aún permanecía. Este mismo chip fue observando en microscopía confocal. Ambos resultados se muestran a continuación.

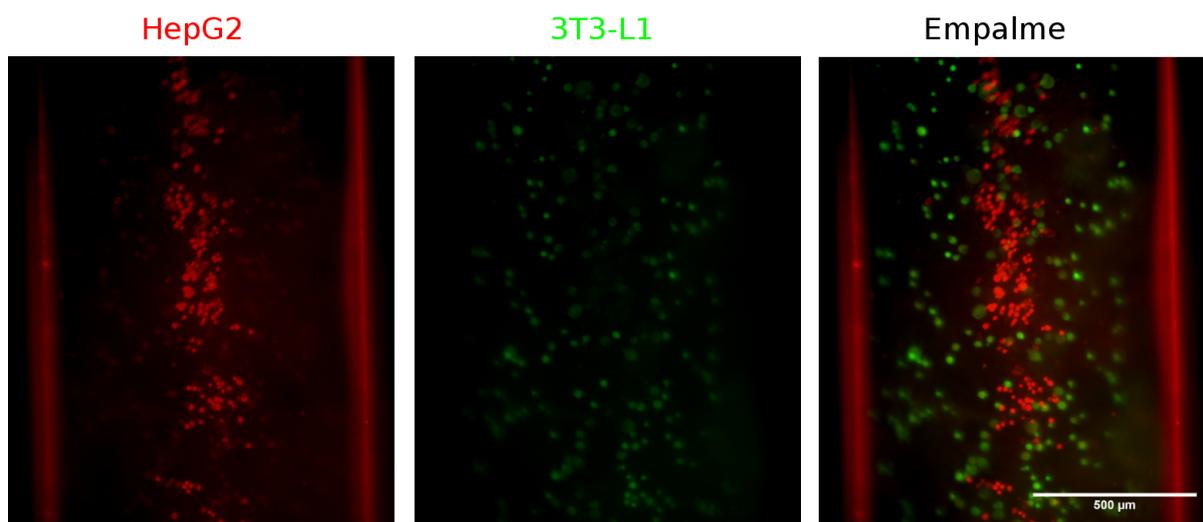


Figura 4.11: Canal del chip 06 enfocado en el plano de los HepG2 con una semana de cultivo. Objetivo 10x

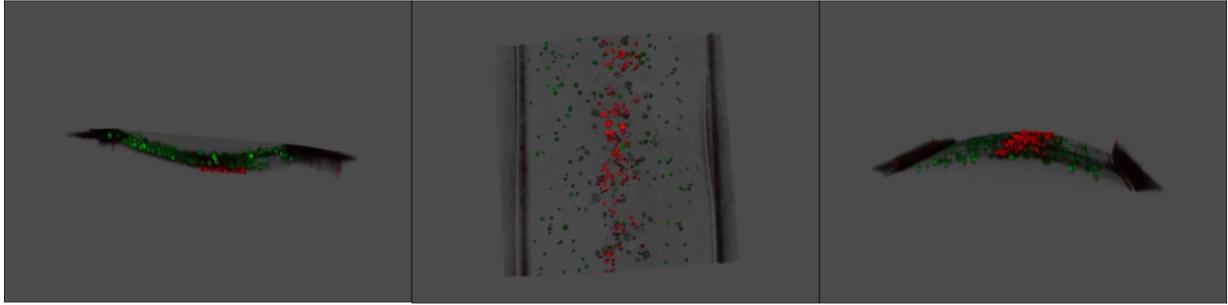


Figura 4.12: Construcción 3D del chip 06 obtenida de las imágenes de confocal.

Se puede comprobar a través de la microscopía confocal que las células no migraron de un canal al otro, cumpliendo así con uno de los objetivos de la fabricación de la membrana. Además de que se confirma que el sustrato se encontraba un poco pandeado lo que clarifica el por qué se observaban células en diferentes planos en la microscopía epifluorescente.

Capítulo 5

Discusión

A continuación se sintetizan y revisan los resultados obtenidos tras estandarizar la fabricación de membranas de Colágena tipo I que fueron utilizadas como sustratos para cultivo celular, dentro y fuera de un dispositivo microfluídico. Se hace también una revisión de las propiedades de estas membranas que pueden ser moduladas al agregar un material sacrificial.

Membrana de Colágena tipo I.

Espesor. Se comprobó que el espesor de la membrana de Colágena tipo I no depende del medio de cultivo utilizado en el proceso de fabricación. Esta propiedad depende de la forma en que se coloca la gota de solución sobre el bloque de PDMS, ya que no sólo se deposita la solución sino que es extendida por el usuario. Aunque, debido a las propiedades hidrofóbicas del sustrato, la gota sólo se puede extender una cierta distancia limitando así el espesor final.

Si la aplicación para la que será usada la membrana requiere un espesor mayor, se reporta en [13] que éste puede aumentarse al colocar una gota nueva de solución sobre una membrana de Colágena ya seca. Es decir, que se pueden apilar membranas.

Rugosidad. Los resultados de la microscopía de fuerza atómica muestran que hay una diferencia del 55 % en la rugosidad al usar diferentes medios de cultivo en la fabricación. No se puede asegurar que este resultado sea propio del arreglo de las fibras de Colágena, ya que en los mapas de color se pueden apreciar grumos en la muestra. Estos grumos están asociados a residuos del medio de cultivo que pudieron no haberse retiraron durante los lavados.

Mecánica del sustrato. Para las mediciones a partir de microindentación, se observó que el módulo de Young de membranas fabricadas con soluciones alcalinas o neutras no presenta diferencia pero que este valor aumenta a casi el doble al fabricar una membrana a partir de una solución ácida. Cómo un cambio en la rigidez da pie a suponer un

cambio en la distribución de las fibras de Colágena, se apoya lo reportado en [21], donde dependiendo del pH de la solución de Colágena será la geometría y cantidad de fibras de formadas.

Las pruebas mecánicas de envejecimiento de las membranas de Colágena tipo I muestran que el módulo de Young de cada membrana medido en agua desionizada ó en PBS no presentan diferencias representativas al envejecer sobre el bloque de PDMS en el que fueron fabricadas. Pero hemos de notar que el medio en que fueron medidos sí tienen influencia en la medición obtenida. Lo anterior debido a la presencia o ausencia de sales que modifican la carga del medio, y con ello la interacción con el indentador del equipo.

Recordemos que se obtuvieron valores de 2.2 ± 0.25 MPa y 0.34 ± 0.076 MPa para membranas de Colágena tipo I humedecidas con PBS y con agua desionizada respectivamente. Se reportaba en [13] un valor de 660 kPa para membranas de Colágena humedecida. El valor reportado fue obtenido a través de nanoindentación por AFM. Notemos que el valor de la literatura se encuentra entre los dos obtenidos en este trabajo, la diferencia puede deberse a la solución con que haya sido humectada la membrana, o bien la diferencia en distancia de indentación, y geometría de la punta entre el equipo Femto Tools y un AFM.

Por otro lado, tomando en cuenta que las células HepG2 fueron el tipo celular presente en todos los experimentos de validación biológica, y que estas células se cree provienen de un hepatocito, se ha reportado el módulo de Young de hígado sano entre 0.642 kPa y 2 kPa en [40] y de 10.5 kPa en [41], lo cuál es cerca de dos órdenes de magnitud menor. Pero esto no evitó que las células se adhirieran y permanecieran viables durante dos semanas aunque su comportamiento y morfología debe ser estudiada a fondo para observar si hay cambios debido a este módulo de Young mayor.

Para las membranas fabricadas en diferentes sustratos se observó que aunque el módulo de Young de membranas en sustratos 20:1 y 7:1 es menor, siguen estando dentro del rango de error de la muestra fabricada en el bloque 10:1, con lo que la diferencia no es representativa. Es decir, el módulo elástico del sustrato no tiene influencia en el módulo elástico de las muestras por lo que se puede pensar que tampoco hay una diferencia en la distribución de las fibras de Colágena.

Grado de desnaturalización de la proteína. Las pruebas de envejecimiento de las membranas sobre PDMS, realizado por FTIR, muestran que las bandas características de la Colágena tipo I establecidas en la literatura no presentan corrimiento a otros número de onda. Y aunque, a diferentes tiempos de envejecimiento se tiene que las bandas aumentan en el porcentaje de transmitancia, el espectro completo es desplazado respecto a los otros en la misma proporción. Es decir, no hay una zona específica donde sea claro dicho aumento en transmitancia en particular que nos indique una disminución de la presencia de enlaces.

La prueba de tratamiento térmico sí presenta un corrimiento de la banda encontrada en 3001 cm^{-1} asociada a la amida A, debida a estiramiento de grupos O-H y N-H, en esta prueba aparece en 3013 cm^{-1} , pero las demás bandas permanecen sin cambio. La diferencia clara es el porcentaje de transmitancia entre la muestra que no tuvo tratamiento térmico y aquellas que sí lo tuvieron. Esa diferencia puede deberse a haber tomado una sección de la membrana que fuera frontera, cambiando así la composición, ya que esta condición de no tener tratamiento térmico se repitió en otros experimentos y no se observó tan alta transmitancia en ningún otro.

Permeabilidad. En la prueba concepto de permeabilidad, se observó que la membrana permitía el paso de colorante hacia la gota de agua limpia gradualmente. Este fenómeno fue caracterizado cualitativamente, encontrando que, a los cinco minutos de estar en contacto la gota marcada y la no marcada separados por la membrana, aquella fabricada con Colágena tipo I tiene una permeabilidad menor a la medida para membranas comerciales con tamaño de poros definidos, como es el caso de la membrana Millipore con un poro de $0.4\ \mu\text{m}$. Esta diferencia se hace menor en un tiempo de contacto de 10 minutos lo cual puede indicar que la membrana de Colágena necesite un tiempo de humectación para estabilizar la permeabilidad. O bien, que la membrana Millipore vaya tapándose al aumentar el tiempo de contacto.

Membrana de Colágena tipo I agregando material sacrificial

Rugosidad y microestructuración. Para las muestras a las que se agregó Alginato, es posible identificar, en la proporción 2:1 la distribución de las fibras de Colágena, las cuales llegan a formar una estructura de mayor diámetro. Mientras que para la proporción 1:1, las fibras identificadas no parecen cambiar en diámetro. Los resultados de rugosidad entre las proporciones 1:1 y 1:2 es mínima, mientras que con la proporción 2:1 la rugosidad es mayor. Aún con la presencia de estructuras grumosas en estas muestras, asociadas a residuos de Alginato de Sodio, la rugosidad en estas muestras es menor que el resultado obtenido en la membrana de colágena fabricada con HBSS lo cual puede indicar que el material sacrificial quedó enbebido.

De las microfotografías obtenidas, a través de SEM, se puede comprobar la microestructura fibrilar de las membranas. Además, podemos hacer un comparativo de las fibras, su diámetro y su distribución al agregar material sacrificial. Donde, para muestras con sustrato de PDMS 10:1, sólo la muestra con Alginato en proporción 2:1 presenta estructuras "Bulto" que consisten de una fibra de mayor diámetro que se observa formada por fibras más angostas. Aunque en la muestra de proporción 1:1 es donde encontramos fibras de mayor diámetro llegando hasta $1.242\ \mu\text{m}$.

La diferencia entre resultados nos indican que el Alginato de Sodio no sólo tiene in-

fluencia en la distribución de las fibras sino en el propio diámetro de las fibras.

Mecánica del sustrato Se puede explicar el comportamiento del módulo de Young de las membranas de Colágena tipo I con material sacrificial basándonos en los resultados de las microfotografías de SEM para estas membranas.

La muestra que en ambos experimentos presenta el menor módulo de Young es la que tiene proporción 2:1, es decir, menor cantidad de Alginato que de Colágena. De las microfotografías se pudo observar una alta presencia de fibras de grosor mayor a $0.5 \mu m$ hasta $1.2 \mu m$ formadas por fibras más angostas. Pero se observa que estas fibras de mayor grosor están separadas entre sí, lo que daría pie a una red con menor entrecruzamiento y por tanto menor resistencia a ser deformada.

La siguiente muestra es la que tiene proporción 1:1, con volúmenes iguales en la solución a gelificar. En esta muestra, la mayoría de las fibras son de un grosor entre 0.2 y $0.8 \mu m$, es decir son más angostas pero se encuentran más juntas en diferentes direcciones. Es decir la red parece estar más entrecruzada, aumentando así el valor de módulo de elasticidad de la muestra.

Finalmente, la muestra con el mayor módulo de Young es la de proporción 1:2. En las microfotografías se observa una capa casi homogénea con sólo algunas fibras sobre ella. Es decir, pareciera no estar formada por fibras o por fibras tan entrecruzadas que no es posible observar espacio entre ellas. Esta condición aseguraría una mayor valor en el módulo de elasticidad de la muestra como se aprecia en las mediciones.

Por otro lado, sólo la membrana con material sacrificial en proporción 1:2 presentó valores similares al valor de la membrana de Colágena, mientras que las otras proporciones presentaron valores de módulo de Young menores al medido en membrana de Colágena. Es decir, se confirma que a mayor nivel de entrecruzamiento, mayor módulo de Young.

Para la medición en membranas de Colágena con Alginato de Sodio en proporción 1:2 se observó que a mayor módulo de Young del sustrato, mayor módulo de Young de la membrana. Esto se asocia a las variaciones en el secado de gotas sobre sustratos de diferente entrecruzado y por lo tanto diferente módulo de elasticidad [42, 43]. Al secar más rápido la gota, se tiene que las fibras se encontrarán menos concentradas en el centro y por lo tanto, menos entrecruzadas, en cambio un secado lento promueve la creación de una zona de concentración mayor donde las fibras se encontrarán más entrecruzadas, aumentando el módulo de Young como se vio en el caso de diferentes proporciones. Esto puede comprobarse en la figura 2.3 donde se observa diferencias en la distribución final de la gota de Colágena para cada proporción de material sacrificial.

Estas diferencias también se comprueban en las microfotografías obtenidas de SEM de estas muestras. Donde, nuevamente la membrana con mayor valor de módulo de Young (7:1) cuenta con fibras más angostas, pero que se observan más entrecruzadas. En cambio,

las membranas valores menores tienden a juntarse en estructuras de mayor diámetro.

Lavado del material sacrificial. Para las membranas con Alginato se tiene nuevamente un corrimiento de la banda asociada a la amida A (estiramiento de grupos O-H y N-H). Además de que se tiene la presencia de bandas que no habían estado presentes en las membranas de sólo Colágena. Estas bandas están asociadas al Alginato de Sodio y nos indica que aún con los lavados se pueden encontrar restos del material, por lo que se requiere mejorar dicho proceso.

Permeabilidad Se había planteado que la permeabilidad sería una de las propiedades modulables al agregar material sacrificial, ya que el material ocuparía lugar entre las fibras durante la gelificación, y que al retirarse dejarían poros de mayor tamaño. Con las pruebas de SEM y rigidez comprobamos que lo que ocurrió fue una modulación de la distribución de las fibras, donde fibras más pequeñas se encontraban más entrecruzadas mientras que fibras de mayor diámetro se encontraban más separadas una de otras. Con lo anterior esperaríamos que la membrana de proporción 2:1 fuera la más permeable. Esto se comprueba al obtener que las membranas con Alginato de Sodio muestran una permeabilidad mayor a la membrana de Colágena, tanto a los cinco como a los diez minutos de contacto. En ambos casos, la permeabilidad de la membrana de proporción 2:1 es mayor a la de proporción 1:2.

Cualitativamente se encontró que la membrana de Colágena es 13 % menos permeable que la membrana comercial de PTFE, mientras que la membrana de Colágena con Alginato en proporción 1:2 es 98 % más permeable que la membrana comercial y la membrana de material sacrificial con proporción 2:1, 213 % más permeable.

Fabricación de chip microfluídico y validación biológica.

Se ha observado, a través de los chips fabricados a partir de un molde estructurado en CNC utilizados, que se ha ido mejorando y estableciendo factores aún a mejorar, para el procedimiento de cocultivo. El procedimiento de fabricación de los chips, la forma de lavar los chips, las concentraciones de células, el tipo de marcadores a utilizar, el orden en que se debe realizar el procedimiento, los cuidados que se deben tener al realizar el cultivo que ha resultado en un procedimiento escrito siguiendo lo establecido en el Sistema de Gestión de la Calidad del laboratorio.

Se observaron diferencias en el comportamiento de ambos tipos celulares en cuanto a la adhesión que presentan a la membrana. Es importante verificar si este factor puede variar al cambiar la composición de la membrana agregando matrigel (que agrega la presencia de más proteína que sólo Colágena). Este cambio en la adhesión no se puede atribuir a

la membrana solamente ya que ambos fragmentos provienen de la misma membrana. Por otro lado, no se puede asegurar que el lado al que están en contacto las células sea el factor determinante a la adhesión ya que macroscópicamente, un lado de la membrana se observa más brillante que el otro. Diferencias entre las caras deben de ser verificadas a través de SEM y AFM.

Además se observó que los fibroblastos tenían una forma circular que difiere de su forma alargada que se observa en cultivos en caja de Petri con un módulo de Young en el rango de Gigapascales. Este cambio de morfología debe ser revisado para determinar qué factor es el que lo ocasiona.

Al ser observado en el microscopio confocal, se comprobó que la membrana evita el paso celular, además nos permite observar que la membrana se encontraba pandeada lo cual explica el desenfoque en los bordes de la figura 4.10 así como la distribución de las células en el centro de un canal y en los bordes del otro canal.

Capítulo 6

Conclusiones

Hemos de recalcar la importancia del poder fabricar dispositivos que se acerquen al biomimetismo que además nos permita modificar propiedades del ambiente celular. Ya que éstos nos permiten observar como reaccionan las células a dichos cambios, que pueden estar asociados a diversas patologías.

Recordemos que, en particular, uno de los elementos más importantes a mimetizar en dispositivos órgano en chip es el cocultivo celular, ya que en los órganos se encuentran varios tipos celulares, con cierta geometría y distribución que además pueden comunicarse entre ellas por medio de esfuerzos mecánicos y difusión de factores solubles que sirven como moléculas de señalización.

Se adaptó un procedimiento de fabricación de membranas porosas de proteína nativa de la matriz extracelular a las capacidades del laboratorio y el protocolo fue estandarizado y escrito siguiendo el formato del sistema de gestión de la calidad. Además, se generó un procedimiento para integrar la membrana a dispositivos microfluídicos de PDMS.

Sobre la caracterización de la membrana:

- Se encontró que el espesor es una propiedad estandarizable que depende del volumen de solución colocada.
- Se determinó por los resultados de rugosidad, FTIR y SEM, que se deben mejorar los lavados del material sacrificial ya que queda embebido en las membranas de Colágena.
- Se obtuvo un valor de módulo de Young para la membrana que es consistente al reportado en la literatura.
- Se observó una dependencia del pH de la solución para la formación de fibras y su módulo elástico.
- Una membrana envejecida no tiene cambios ni de composición (desnaturalización) ni en su módulo elástico.
- Se observó que la membrana de Colágena tipo I tiene una permeabilidad comparable con la de una membrana comercial con un tamaño de poro de $0.4 \mu m$.

- Se verificó que el agregar un material sacrificial permite modular propiedades de la membrana como la distribución de las fibras, lo cual tiene un impacto directo en su elasticidad y permeabilidad. A mayor entrecruzamiento de las fibras, mayor módulo de Young y menor permeabilidad.
- Adicionalmente para soluciones adicionadas con Alginato de Sodio, el módulo de Young del sustrato tiene también influencia en el módulo de Young de la membrana. Debido al cambio de permeabilidad del sustrato lo cual influye en el proceso de secado de la gota de la solución lo cual cambia la distribución de las fibras.

Finalmente se validó el cultivo celular en la membrana tanto en cultivo de un sólo tipo celular como en cocultivo. Este proceso debe ser aún estandarizado para determinar la concentración de células necesarias para la formación de una monocapa. Se observaron, en todos los experimentos, células adheridas a la membrana, que aunque presentaron cambios en su morfología, permanecieron viables por dos semanas. Lo anterior se asegura por el funcionamiento de los marcadores que fueron observados a lo largo del experimento. Se comprobó también que la membrana evita el paso celular de un canal al otro, al observar el chip en el microscopio confocal y hacer una reconstrucción 3D.

Podemos mencionar que la membrana no se limita a su uso en chips microfluídicos, ya que puede ser utilizada como barrera de tejidos que requieran ser humectados por difusión, es decir, su tamaño puede ser escalado para cumplir con tareas macroscópicas.

Capítulo 7

Perspectivas

Como trabajo a futuro se propone hacer pruebas donde a la membrana se le agreguen más proteínas de la matriz extracelular o bien fabricar una solución a partir de matriz extracelular nativa obtenida del proceso de descelularización de un tejido y observar cambios en la adhesión celular. También, para comprobar la viabilidad de las células, deben realizarse ensayos de vida y muerte. Además de un ensayo de proliferación que aporte información sobre la evolución del cultivo.

En cuanto a fabricación se propone escalar el número de canales que se encuentren separados por diferentes membranas, es decir fabricar dispositivos de multiniveles.

Lista de abreviaturas

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica.
CNC	Control Numérico por Computadora.
DMEM	Medio de cultivo Eagle Modificado de Dubelcco.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.
HepG2	Nombre de línea celular inmortalizada derivada de hepatocarcinoma humano.
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hank.
PAE	Línea celular inmortalizada derivada de endotelio aórtico porcino.
PBS	Buffer Fosfato Salino.
PCR	Reacción en cadena de Polimerasa.
PDMS	Polidimetilsiloxano.
PMMA	Polimetilmetacrilato. Conocido comúnmente como acrílico.
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido.
3T3-L1	Nombre de línea celular inmortalizada derivada de embrión de ratón.

Bibliografía

- [1] E. Plug and P. Microfluidics., “Materials for microfluidic device fabrication: A review.” www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/materials-for-microfluidic-chips-fabrication-a-review-2017/, 2017.
- [2] P. Abgrall and A. Gué, “Lab-on-chip technologies:making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem - a review,” *J. Micromech. Microeng.*, vol. 17, pp. 15–49, 2007.
- [3] H. Kimura, Y. Sakai, and T. Fujii, “Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery,” *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, pp. 43–48, 2018.
- [4] R. Kodzius, F. Schulze, *et al.*, “Organ-on-chip technology: Current state and future developments,” *Genes*, vol. 8, 2017.
- [5] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, “The extracellular matrix at a glance,” *J Cell Sci*, pp. 4195 – 4200, Dec 2010.
- [6] H. H. Chung, M. Mireles, B. J. Kwarta, and T. R. Gaborski, “Use of porous membranes in tissue barrier and co-culture models,” *Lab on a Chip*, vol. 18, no. 12, 2018.
- [7] E. Vandenhoute, A. Drozlez, E. Sevin, G. F., C. Mysiorek, and D. MP, “Adapting coculture in vitro models of the blood-brain barrier for use in cancer research: maintaining an appropriate endothelial monolayer for the assessment of transendothelial migration,” *Laboratory Investigation*, no. 96, pp. 588–598, 2016.
- [8] C. Théry, L. Zitvogel, and S. Amigorena, “Exosomes: composition, biogenesis and function,” *Nature Reviews Immunology*, no. 2, pp. 569–579, 2002.
- [9] D. G. Phinney and M. F. Pittenger, “Concise review: Msc-derived exosomes for cell-free therapy,” *Stem Cells Journal*, vol. 35, no. 4, 2017.
- [10] M. Y. Kim, D. J. Li, K. L. Pham, B. G. Wong, and E. E. Hui, “Microfabrication of high-resolution porous membranes for cell culture,” *Journal of Membrane Science*, vol. 452, pp. 460–469, 2014.
- [11] D. Huh, B. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, and D. E. Ingber, “Reconstituting organ-level lung functions on a chip,” *Science*, vol. 328, pp. 1662–1668, June 2010.

- [12] H. Wang, A. S. Abhilash, C. Chen, R. Wells, and V. Shenoy, “Long-range force transmission in fibrous matrices enabled by tension-driven alignment of fibers,” *Biophysical Journal*, vol. 107, no. 11, pp. 2592–2603, 2014.
- [13] M. J. Mondrinos, “Native extracellular matrix-derived semipermeable, optically transparent, and inexpensive membrane inserts for microfluidic cell culture,” *Lab on a Chip*, 2017.
- [14] L. C. Junqueira and C. J., *Histología Básica. Texto y Atlas*, ch. 5 Tejido Conjuntivo, pp. 99 – 104. Editoria Médica Panamericana, 2013.
- [15] P. Horton, L. Moran, O. R.S., D. Rawan, and G. Scrimgeour, *Principles of Biochemistry*. Prentice Hall, 1993.
- [16] J. Ber, J. L. Tymoczko, and S. L., *Bioquímica*, ch. 2 Composición y estructura de las proteínas, pp. 45 – 46. Editorial Reverte, 2007.
- [17] V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, K. P. J., and P. A. Weil, *Bioquímica Ilustrada*. McGraw-Hill Education, 30e ed.
- [18] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, “Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane),” *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 23, pp. 4974–4984, 1998.
- [19] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, “Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane),” *Electrophoresis*, no. 21, 2000.
- [20] A. Cruz-Ramírez, R. Sánchez-Olvera, *et al.*, “Progress on the use of commercial digital optical disc units for low-power laser micromachining in biomedical applications,” *Micromachines*, vol. 9, no. 4, 2018.
- [21] Y.-I. Yang, L. M. Leone, and L. J. Kaufman, “Elastic moduli of collagen gels can be predicted from two-dimensional confocal microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 97, pp. 2051–2060, 9 2009.
- [22] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, M. J. R., N. W. Ritchie, S. J. H.J., and J. D. C., *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, ch. 1 Electron Beam - Specimen Interactions: Interaction Volume, p. 2. Springer.
- [23] Quorum Technologies, *SC7620 Mini Sputter Coater Operating Manual*, 6 ed., 02 2013. p. 23.
- [24] T. Scientific, “FTIR Sample Techniques Attenuated Total Reflection ATR.”
- [25] N. P. Camacho, P. West, P. A. Torzilli, and R. Mendelsohn, “Ftir microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage,” *Biopolymers*, vol. 62, pp. 1–8, 1 2001.
- [26] B. de Campos and M. S. Mello, “Collagen type I amide I band infrared spectroscopy,” *Micron*, no. 42, pp. 283–289, 2011.

- [27] K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, and C. Petibois, “Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy,” *Analytic and Bioanalytic Chemistry*, no. 395, pp. 829–837, 2009.
- [28] R. B. D. Fraser, *In Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*, ch. 14 Collagens, pp. 344–402. Academic: New York, 1973.
- [29] Z. S. S. Júnior, B. S.B., and A. P.A., “Effect of papain-based gel on type i collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis.,” *Scientific Reports*, no. 5:11448, 2015.
- [30] P. Li, Y. Dai, and J. Zhang, “Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine,” *International Journal of Biomedical Science*, vol. 4, September 2008.
- [31] Helmiyati and M. Aprilliza, “Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent.,” *Materials Science and Engineering*, vol. 188, 2017.
- [32] K. Madhusudana and K. Krishna, “Synthesis and characterization of biodegradable poly(vinyl caprolactam) grafted on to sodium alginate and its microgels for controlled release studies of an anticancer drug.,” *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 06, pp. 061–069, 2013.
- [33] A. Siflinger-Birnboim, P. Del Vecchio, J. Cooper, B. F.A., M. Shepard, and A. Malik, “Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer,” *Journal of Cellular Physiology*, no. 132, pp. 111–117, 1987.
- [34] S. Yuan and R. Rigor, *Regulation of Endothelial Barrier Function*, ch. 3 Methods for Measuring Permeability. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
- [35] H. Chen and T. Yeh, “In vitro assays for measuring endothelial permeability by transwells and electrical impedance systems,” *Bio-protocol*, vol. 7, no. 9, 2017.
- [36] M. E. Segretín, “Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales..” <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.
- [37] T. Scientific, “Calcein AM.” www.thermofisher.com/order/catalog/product/C3100MP.
- [38] invitrogen, *MitoTracker Mitochondrion-Selective Probes*.
- [39] Y. Du, N. Li, H. Yang, C. Luo, Y. Gong, C. Tong, Y. Gao, S. Lu, and M. Long, “Mimicking liver sinusoidal structures and functions using a 3d-configured microfluidic chip,” *Lab on chip*, vol. 17, 2017.
- [40] Y. Wen-Chun, L. Pai-Chi, J. Yung-Ming, *et al.*, “Elastic modulus measurements of human liver and correlation with pathology,” *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 28, pp. 467 – 474.

- [41] D. W. Evans, M. E. C., P. M. Baptista, S. S., and J. L. Sparks, “Scale-dependent mechanical properties of native and decellularized liver tissue.,” *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*.
- [42] M. C. Lopes and E. Bonaccorso, “Influence of substrate elasticity on particle deposition patterns from evaporating water–silica suspension droplets,” *Soft Matter*, vol. 9, pp. 7942–7950, 2013.
- [43] J. Trantum, B. M.L., Z. Eagleton, M. R. L., and F. R. Haselton, “Biosensor design based on marangoni flow in an evaporating drop.,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 2, pp. 315–324, 2014.
- [44] V. L. Popov, *Contact Mechanics and Friction. Physical Principles and Applications*, ch. 5 Rigorous Treatment of Contact Problems - Hertzian Contact, pp. 55–61. Springer, 2010.
- [45] L. Landau and E. Lifshitz, *Course of Theoretical Physics. Theory of Elasticity*, vol. 7, ch. 8 Equilibrium of an elastic medium bounded by a plane, pp. 25–30. Pergamon Press, 1970.

Apéndice A

Obtención del Módulo de Young a través del Modelo de Hertz

El Modelo de Contacto Hertziano propone un método para encontrar soluciones a problemas de contacto en el marco de una aproximación de un semi-espacio.

Parte de la teoría de elasticidad donde se da un desplazamiento debido a una fuerza normal a la superficie del semi espacio elástico.

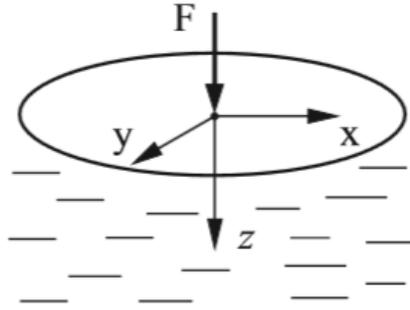


Figura A.1: Una fuerza actuando en un semi-espacio elástico [44].

En el Modelo Hertziano se tiene como hipótesis:

- El contacto es no adherente.
- La superficie es plana.
- No hay fuerzas de fricción.

Debido a la ausencia de fuerzas de fricción, sólo la contribución de la fuerza en el eje z es de interés. [45]

En el caso de una distribución continua normal de presión $p(x, y)$, el desplazamiento en z está dado por

$$u_z = \frac{1}{\pi E^*} \iint p(x', y') \frac{dx' dy'}{r} \quad (\text{A.1})$$

donde

$$r = \sqrt{(x - x')^2 + (y - y')^2}$$

y

$$E^* = \frac{E}{1 - \nu^2}$$

Para una distribución de presión Hertziana se tiene que

$$p = p_o \left(1 - \frac{r^2}{a^2}\right)^{1/2} \quad (\text{A.2})$$

que resulta en un desplazamiento de la forma

$$u_z = \frac{\pi p_o}{4E^* a} (2a^2 - r^2) \quad r \leq a \quad (\text{A.3})$$

y una fuerza

$$F = \int_0^a p(r) 2\pi r dr = \frac{2}{3} p_o \pi a^2 \quad (\text{A.4})$$

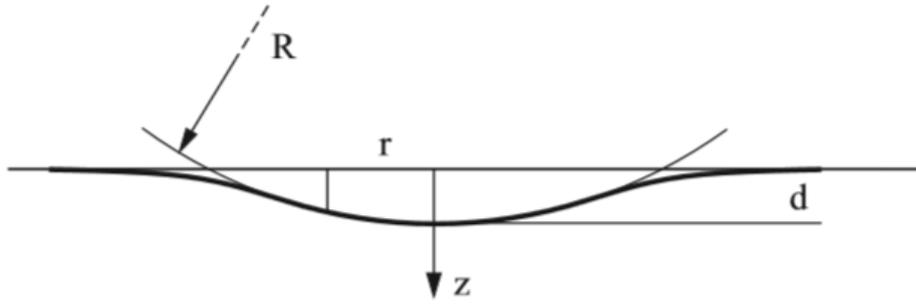


Figura A.2: Una esfera rígida en contacto con un semi-espacio elástico [44].

En el caso específico de una esfera indentando un semi-espacio elástico se tiene que el desplazamiento

$$u_z = d - \frac{r^2}{2R} \quad (\text{A.5})$$

igualando las ecuaciones A.3 y A.5

$$\frac{\pi p_o a}{2E^*} - \frac{\pi p_o r^2}{4E^* a} = d - \frac{r^2}{2R} \Rightarrow d = \frac{\pi p_o a}{2E^*}; a = \frac{2E^* d}{\pi p_o}$$

Así el radio de contacto

$$a = \sqrt{Rd} \quad (\text{A.6})$$

y la presión inicial

$$p_o = \frac{2E^*}{\pi} \left(\frac{d}{R}\right)^{1/2} \quad (\text{A.7})$$

Sustituyendo la ecuación A.7 en A.4

$$F = \frac{4}{3} E^* a^2 \left(\frac{d}{R}\right)^{1/2} = \frac{4}{3} E^* R^{1/2} d^{3/2} \quad (\text{A.8})$$

Con lo que el módulo de Young combinado será

$$E^* = \frac{3}{4} F R^{-1/2} d^{-3/2} \quad (\text{A.9})$$

Apéndice B

Espectros Infrarrojos

Se presentan a continuación los espectros completos de los resultados mostrados en la sección 3.7.

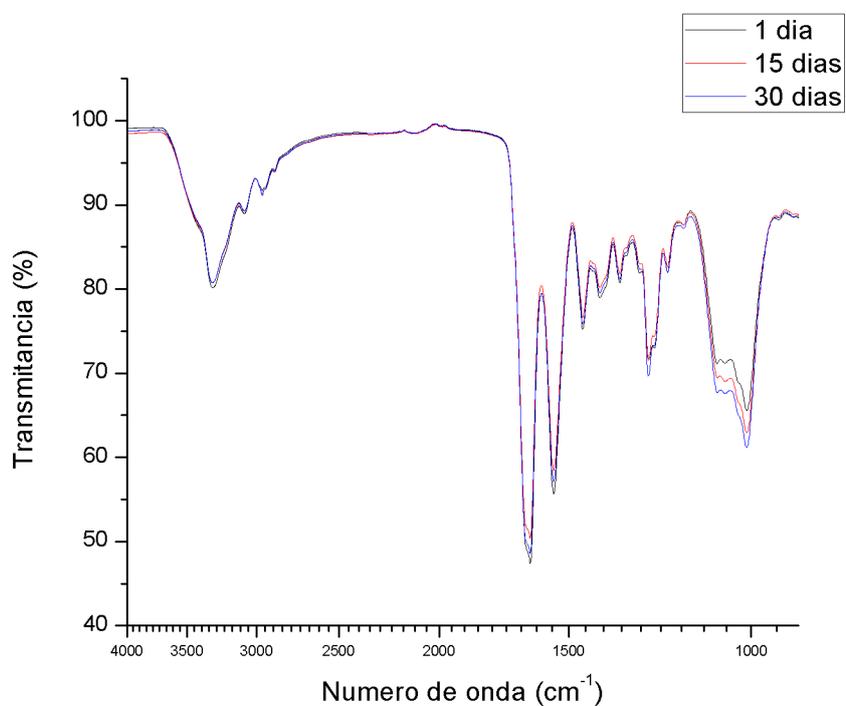


Figura B.1: Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con HBSS.

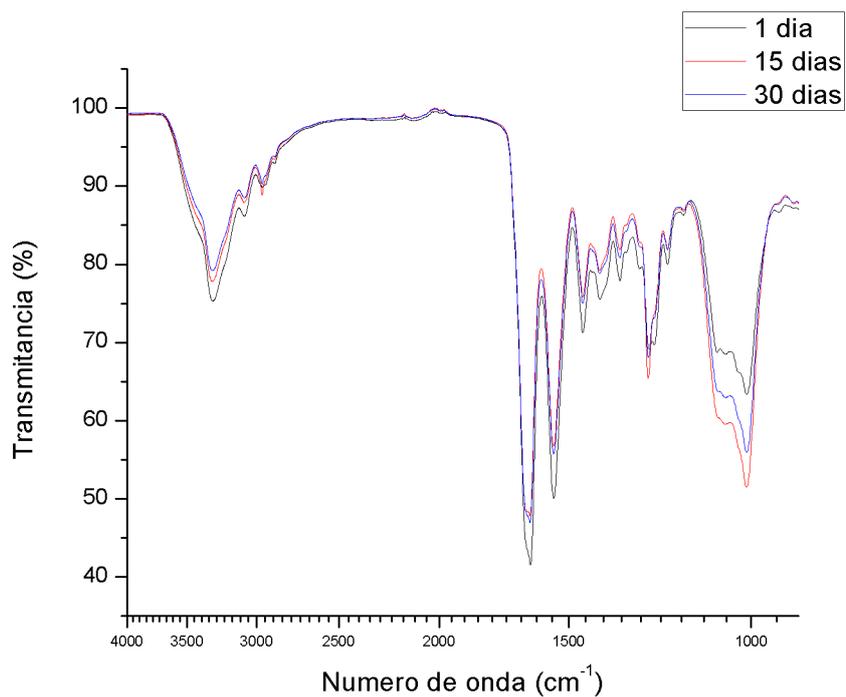


Figura B.2: Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con DMEM.

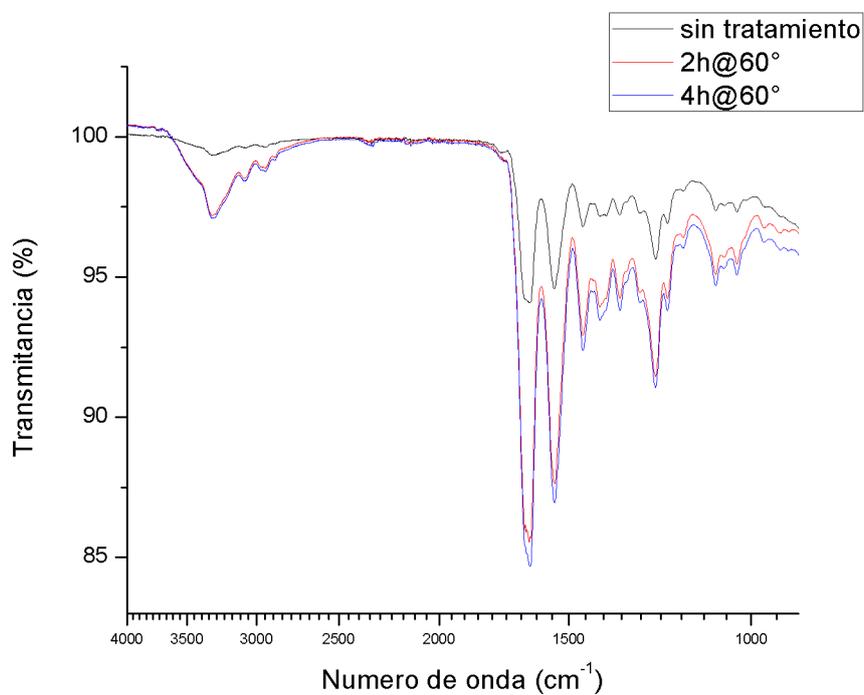


Figura B.3: Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con HBSS con tratamientos térmicos.

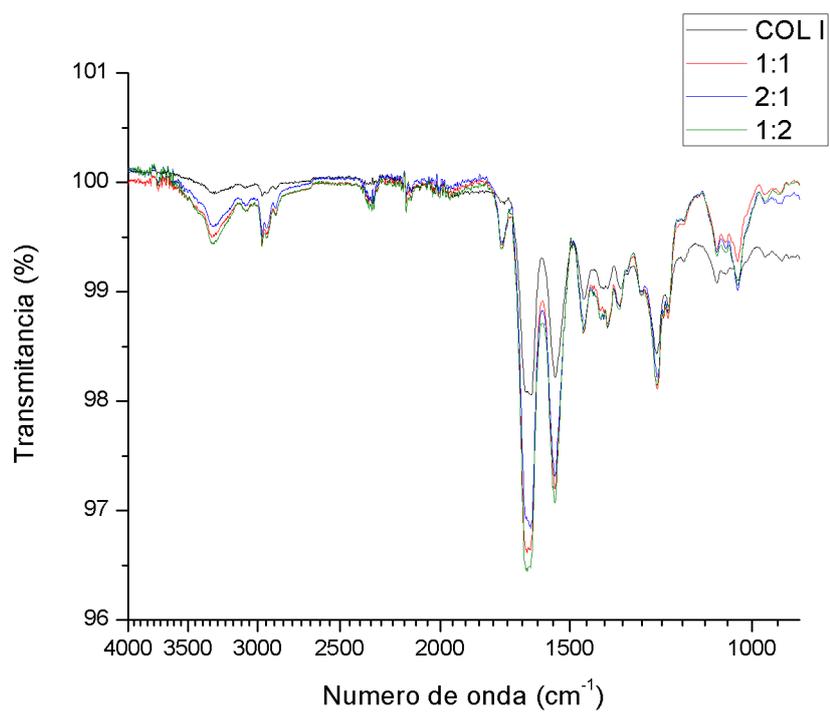


Figura B.4: Espectro obtenido de la prueba ATR FTIR para membranas de Colágena tipo I fabricadas con un material sacrificial.

Apéndice C

Portada LANSBIO-PROC-17

LaNSBioDyT

**LABORATORIO NACIONAL
DE SOLUCIONES BIOMIMÉTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA**

PROCEDIMIENTO PARA FABRICACIÓN DE membranas POROSAS DE COLÁGENA TIPO I

LANSBIO-PROC-17-01



ELABORÓ: Ana Ximena Monroy Romero
EXPERTA EN USO DE LA TÉCNICA



REVISÓ Y APROBÓ: MATHIEU HAUTEFEUILLE
RESPONSABLE TÉCNICO

FECHA DE EMISIÓN: 04 DE SEPTIEMBRE DE 2018

Apéndice D

Portada LANSBIO-PROC-20

LaNSBioDyT

LABORATORIO NACIONAL
DE SOLUCIONES BIOMIMÉTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA

PROCEDIMIENTO DE INTEGRACIÓN DE MEMBRANAS POROSAS EN DISPOSITIVOS LAB-ON-CHIP

LANSBIO-PROC-20-01



ELaboró: Ana ximena Monroy Romero
EXPERTA EN LA TÉCNICA



VALIDÓ: Ana Lucía Cabriales Torrijo
BEATRIZ DÍAZ BELLO



APROBÓ: Genaro Vázquez Victorio
MATHIEU HAUTEFEUILLE
RESPONSABLES TÉCNICOS

FECHA DE EMISIÓN: 26 DE OCTUBRE DE 2018