

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA



T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA

DESARROLLO DE BIOCHIPS PARA EL ESTUDIO DE MIGRACIÓN Y
QUIMIOATRACCIÓN DE CÉLULAS CANCEROSAS

P R E S E N T A
LUCERO MESCLI HERNÁNDEZ CEDILLO

T U T O R E S D E T E S I S
DR. JORGE LUIS DOMÍNGUEZ JUÁREZ
DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS

JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

1. Datos del Alumno

Hernandez
Cedillo
Lucero Mescli
luc@comunidad.unam.mx
Universidad Nacional Autónoma de
México
Centro de Física Aplicada y Tecnología
Avanzada
Tecnología
310137496

2. Datos del tutor

Dr.
Jorge Luis
Domínguez
Juárez

3. Datos del cotutor

Dr.
Francisco Gabriel
Vázquez
Cuevas

4. Datos del sinodal 1

Dr.
Pedro
Salas
Castillo

5. Datos del sinodal 2

Dra.
Blanca Edith
Millán
Chiu

6. Datos de sinodal 3

Dr.
Francisco Gabriel
Vázquez
Cuevas

7. Datos del sinodal 4

Dr.
Edgar
Jiménez Cervantes
Amieva

8. Datos del sinodal 5

Dr.
Miguel Ángel
Ocampo
Mortera

9. Datos del trabajo escrito

Desarrollo de biochips para el estudio de
migración y quimioatracción de células
cancerosas.
81 p, 2019

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Láseres del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) y en el Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Neurobiología (INB), ambos en el Campus Juriquilla de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo el asesoramiento de los Dres. Jorge Luis Domínguez Juárez y Francisco Gabriel Vázquez Cuevas. EL proyecto fue apoyado por PAPIITIN201017 para FGVC y PAPIITIN112017, PAPIMEPE101319 para JLDJ.

*Dedicado a mi padre.
Por enseñarme a motivarme a siempre querer ser mejor.*

AGRADECIMIENTOS

En mi formación

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma mater y mi segundo hogar.
- Al CFATA y a la Licenciatura en Tecnología por facilitarme el aprendizaje y darme la oportunidad de conocer el amplio panorama científico desde una etapa temprana de mis estudios.

En este proyecto

- A mis tutores de tesis, por creer en mí, apoyarme para desarrollar mis ideas de esta tesis y siempre estar al pendiente del proyecto y mi formación.
- A el Dr. Rafael Quintero Torres, del laboratorio de Láseres del CFATA, y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, del Laboratorio de Fisiología Celular del INB, por darme la facilidad de usar las instalaciones de sus laboratorios para realizar este trabajo.
- A mis sinodales por su paciencia y apoyo.

Personales

“Ningún hombre es una isla entera por sí mismo.

Cada hombre es una pieza del continente, una parte del todo.”

- John Donne –

- A mi familia por apoyarme a cumplir mis sueños. A mi madre por todo lo que hace por mí y por enseñarme el valor de la responsabilidad. A mis hermanos por siempre caminar a mi lado.
- A mis profesores que se dieron la tarea de enseñarme más allá de una clase, los cuales se tomaron el tiempo de darme un consejo o algunas palabras de aliento. En especial a Luis Domínguez por siempre darme su apoyo.
- A mis amigos de la vida que llegaron antes de esta etapa y siempre están dispuestos a darme su mano a pesar de la distancia.
- A mis amigos de la carrera con los que compartí un sin fin de momentos de todas las índoles. Por darnos la oportunidad de ir más allá de una clase y crecer juntos. A todos, gracias me quedo con un poquito de cada uno de ustedes que ahora forma parte de mí.
- A los amigos que encontré circunstancialmente en esta etapa, con los cuales espero seguir caminando en el futuro.

ÍNDICE

<i>Datos del Jurado</i>	<i>I</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>III</i>
<i>Dedicatoria</i>	<i>IV</i>
<i>Índice</i>	<i>V</i>
1 <i>Introducción</i>	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Hipótesis.....	5
2 <i>Marco teórico</i>	6
2.1 Fenotipo y migración celular.....	6
2.2 Migración de células cancerosas	8
2.3 Láser	11
2.3.1 Haz Gaussiano	13
2.4 Técnica de ablación láser	15
3 <i>Antecedentes</i>	17
3.1 Estudio de la migración celular.....	17
3.2 Microfabricación de biochips.....	20
4 <i>Caracterización del láser</i>	23
4.1 Arreglo óptico	23
4.2 Umbral de daño del láser.....	29
4.3 Caracterización del láser	31
4.4 Profundidad de grabado.....	35
5 <i>Diseño de biochip</i>	38
5.1 Requerimientos generales.....	39
5.2 Boceto y programación	41
5.3 Manufactura	43
5.4 Producción en serie y pruebas de migración celular.....	45
5.5 Proceso general de diseño	46

6	<i>Fabricación y evaluación de biochips</i>	47
6.1	Grabado	48
6.2	Molde positivo.....	52
6.3	Molde a PDMS.....	53
6.4	Ensamblado de biochip.....	56
7	<i>Manejo de biochips</i>	57
7.1	Evaluación con cultivo de células.....	58
8	<i>Resumen de resultados</i>	61
8.1	Resultados por capítulo	61
8.1.1	Caracterización del láser	61
8.1.2	Diseño de biochip.....	62
8.1.3	Fabricación de biochips	62
8.1.4	Manejo de biochips	62
9	<i>Conclusión</i>	63
10	<i>Contenido</i>	64
10.1	Índice de tablas	64
10.2	Índice de gráficas.....	64
10.3	Índice de figuras	65
11	<i>Anexos</i>	68
11.1	Anexo A	68
12	<i>Referencias</i>	72

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El término biochip surgió inspirado por analogías con los chips electrónicos. En este caso se emplea material para estudiar biología molecular y celular considerando pequeños dispositivos o sistemas biológicos micrométricamente estructurados.

La idea de los biochips surgió a principios de los años 90 durante la revolución genómica. Esta revolución inició con la obtención del perfil de expresión de genes con ensayos que usaban microarreglos para realizar hibridación de material genético y fueron mejorados inmovilizando miles de genes en un soporte sólido, de silicio (Ng & Ilag, 2003).

Más tarde esta idea de depositar e inmovilizar material biológico en una superficie sólida fue tomada por otras áreas de la biología para llevar a cabo estudios in vitro de material biológico, como moléculas y células, para observar y analizar su comportamiento (Huh, Hamilton, & Ingber, 2011).

Los biochips se clasifican principalmente en matrices y microfluidos. Las llamadas matrices contienen moléculas fijas ubicadas en regiones específicas a las cuales se somete el material de estudio. Mientras que los de microfluidos transportan las moléculas dentro del chip creando un flujo constante. Algunos combinan ambas tecnologías y pueden incluir biosensores electrónicos o químicos (Ng & Ilag, 2003)

El estudio de determinados fenómenos biológicos en tiempo real representa un reto y los biochips proveen los parámetros necesarios en un ambiente controlado. En las investigaciones relacionadas con el cáncer, la medida de la migración de las células cancerosas en combinación con moléculas a las que son atraídas (quimioatracción) en tiempo real es de gran importancia para determinar los mecanismos y procesos de la enfermedad, por ejemplo, evitar la metástasis.

La metástasis se define como el proceso de propagación de las células tumorales a distintos órganos, para formar tumores secundarios (Liotta & Stetler-Stevenson, 1991). Para que este proceso suceda, las células del tumor deben experimentar cambios fenotípicos, a través de los cuales, las células adquieren propiedades invasivas (Thiery, 2002). Es la presencia de metástasis la que define al cáncer. Una vez que se presenta la metástasis, la tasa de supervivencia de los pacientes es menor al 30% (Ma, Middleton, You, & Sun, 2018). En este contexto, el entendimiento de los mecanismos que regulan la habilidad migratoria e invasiva

de las células tumorales es crítico para el desarrollo de nuevas terapias en el tratamiento de la enfermedad.

Las células cancerosas responden a diversas señales ajustando sus mecanismos de migración y su capacidad invasiva, por tanto, el estudio de los mensajeros involucrados en la migración celular y sus mecanismos de transducción de señales es muy relevante para entender el fenómeno (Sahai, 2005). En este panorama, el desarrollo de técnicas innovadoras para estudiar estos procesos es de gran utilidad para desentrañar estos mecanismos de progresión del cáncer.

Con este tipo de métodos de estudio, se espera obtener información más amplia y detallada sobre las redes de señalización que regulan el proceso de invasividad del cáncer. Es de gran importancia entender cómo las redes de señalización influyen en el comportamiento celular, lo cual es indispensable para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento del cáncer (Roussos, Condeelis, & Patsialou, 2011).

Los métodos actuales *in vivo* e *in vitro* para estudiar este fenómeno tienen limitaciones que podrían verse mejoradas con el uso de biochips, como compartimentalizar un cultivo para utilizar dos líneas celulares o agregar selectivamente señales químicas externas a cada población.

En esta tesis se desarrollaron biochips de bajo costo mediante ablación láser para el estudio de la migración celular y quimioatracción de células de cáncer ovárico SKOV3.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Con el uso de los biochips se han creado sistemas muy complejos, intentando reconstruir la mayoría de los factores morfofisiológicos relacionados con diversos procesos celulares (Ma et al., 2018). Sin embargo, el costo elevado de fabricación y la información incompleta del desarrollo de su modelo experimental, impide que sean alcanzables para todos. El desarrollo de biochips a bajo costo ayudará a realizar estudios más complejos y detallados relacionados con la migración de células cancerosas y sus quimioatrayentes.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar y elaborar biochips mediante ablación láser para el estudio de los fenómenos de migración celular y quimioatracción en células cancerosas

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el láser con el cual se realizará la ablación láser.
- Diseñar un biochip para realizar pruebas de migración y quimioatracción en células cancerosas.
- Desarrollar una metodología para la fabricación de biochips y su forma de uso.
- Hacer microfabricación con ayuda de la ablación láser para realizar los microcanales del biochip.
- Ensamblar un biochip para realizar los experimentos de migración y quimioatracción.
- Cultivar células de cáncer de ovario SKOV3.
- Acoplar las células cancerosas en el biochip.
- Observar la migración y quimioatracción de las células en estudio mediante un microscopio.

1.4 HIPÓTESIS

Al desarrollar un biochip de bajo costo para realizar estudios de migración y quimioatracción de células cancerosas se reducirá la cantidad de células de estudio, materiales y reactivos necesarios para realizar este tipo de experimentos en comparación con otros métodos, además permitirá realizar varios experimentos a la vez en un espacio reducido.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 FENOTIPO Y MIGRACIÓN CELULAR

Durante la migración celular las células son movilizadas hacia puntos específicos, dirigidas por señales extra e intracelulares, como quimioattractores, factores de crecimiento y proteínas involucradas (Troncoso, Madariaga, & Aldana, 2017). La transición epitelio mesénquima es un conjunto de procesos que permiten la migración y la invasividad celular en el cáncer, mediante estos procesos una célula con características epiteliales adquiere temporalmente el fenotipo de una célula mesenquimal, por ejemplo acoplamiento a través de uniones adherentes (Troncoso et al., 2017).

Las células epiteliales y mesenquimales tienen diferentes fenotipos. Las células epiteliales poseen dominios de membrana plasmática, apical, lateral y basal, los cuales le dan polaridad. En los dominios de membrana se encuentran conexiones intercelulares como uniones ocluyentes a nivel apical, uniones adherentes, desmosomas, uniones gap en el dominio latero lateral y hemidesmosomas en el dominio basal (Troncoso et al., 2017). Las conexiones célula-célula están compuestas por glicoproteínas de adhesión transmembranal (claudinas, ocludinas, conexinas, cadherinas y cateninas) (Benedetti & Reyes, 2015). Por su parte las células mesenquimales forman una matriz extracelular y no presentan uniones entre ellas, son alargadas y tienen extensiones denominadas filopodios (Benedetti & Reyes, 2015).

Durante la transición epitelio mesénquima los cambios más representativos ocurren en la morfología, la adhesión célula-célula, y las funciones celulares (Montenegro & Rojas, 2001; Troncoso et al., 2017). Los contactos intercelulares que unen a las células se pierden, y las glicoproteínas de adhesión reducen su expresión (Montenegro & Rojas, 2001; Troncoso et al., 2017). Además, la expresión de proteínas de las uniones celulares disminuye y se promueve la expresión de ciertas integrinas que promueven la migración celular (Troncoso et al., 2017). El citoesqueleto es reordenado ocasionando la formación de filopodios formados por actina lo cual permite su motilidad y se producen cambios en la forma y la polaridad de la célula (Montenegro & Rojas, 2001; Troncoso et al., 2017).

La transición epitelio mesénquima es esencial durante la etapa embrionaria para la formación de órganos en muchas especies de organismos multicelulares. Posteriormente en la

etapa adulta este fenómeno queda restringido al sistema inmune y algunas enfermedades como el cáncer (Thiery, 2002; Troncoso et al., 2017).

2.2 MIGRACIÓN DE CÉLULAS CANCEROSAS

El cáncer comienza con un evento de transformación de células sanas a células cancerosas y su crecimiento progresivo, posteriormente se presenta la vascularización (angiogénesis) del tumor para que la masa tumoral obtenga nutrientes (Kim et al., 2009). Cuando el tumor es detectado en una etapa temprana puede ser tratado con éxito, sin embargo, si esto no sucede o el tratamiento no es efectivo, puede ocurrir la metástasis.

La metástasis es el proceso mediante el cual las células cancerosas se diseminan a otras partes del cuerpo. Podemos resumir el proceso de la metástasis (Kim et al., 2009) de la siguiente manera:

- Movilidad e invasión: Ocurre la transición epitelio mesénquima en las células lo cual les da movilidad e invaden pasando a través de vénulas de pared delgada.
- Transporte y adherencia: Las células entran en circulación en el torrente sanguíneo y posteriormente se adhieren en la membrana basal de los capilares de otro órgano.
- Extravasación y proliferación: Las células atraviesan los capilares hasta un nuevo órgano, en el nuevo lugar las células generan un tumor secundario, y proliferan conservando las características de las células del tumor primario.

En el cáncer las células con características epiteliales sufren, cambios en la conformación de sus moléculas de adhesión y estructurales, lo que ocasiona la pérdida del fenotipo epitelial llevándolas al fenotipo mesenquimal y posibilitando su dispersión. La transición epitelio mesénquima aumenta la movilidad de las células cancerosas y el desarrollo de características invasivas.

La movilidad de una célula depende de los componentes del citoesqueleto (microtúbulos y filamentos), de su ritmo de renovación molecular y de las moléculas con las que interactúan (Eynard, Valentich, & Rovasio, 2016). La cantidad de componentes del citoesqueleto, su distribución y sus cambios permitirán la movilidad de las células.

La migración celular comprende tres etapas, que son la extensión de las prolongaciones celulares, la adhesión a la superficie sobre la cual se desplaza y la contracción en una dirección (Figura 2.1) (Eynard et al., 2016). Una célula cancerosa es movilizada por la reorganización coordinada y constante de sus componentes citoplasmáticos como orgánulos, inclusiones, cromosomas y núcleo (Eynard et al., 2016).

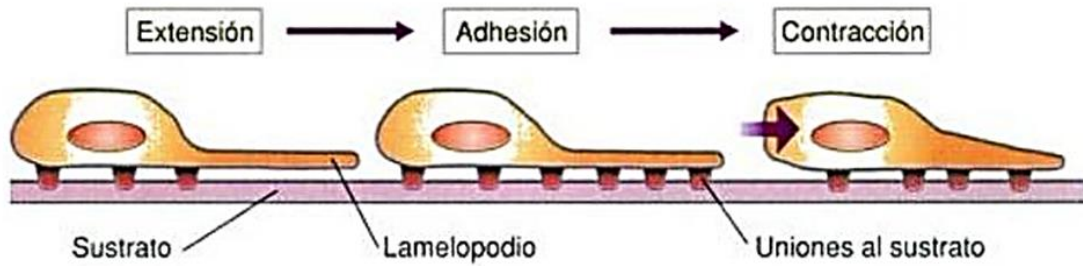


Figura 2.1 Etapas de la migración celular (Eynard et al., 2016).

Uno de los componentes más importantes es la actina. El aumento de la tasa de polimerización de la actina hace que los microfilamentos de actina crezcan en dirección de la membrana cambiando la forma de la célula en la dirección del movimiento (Eynard et al., 2016). La actina es apoyada por motores moleculares asociados a microtúbulos los cuales movilizan pequeñas vesículas, endocitadas de la membrana celular, en la dirección del movimiento para fusionarse con la membrana y aumentar la superficie del frente de migración (Figura 2.2) (Eynard et al., 2016).

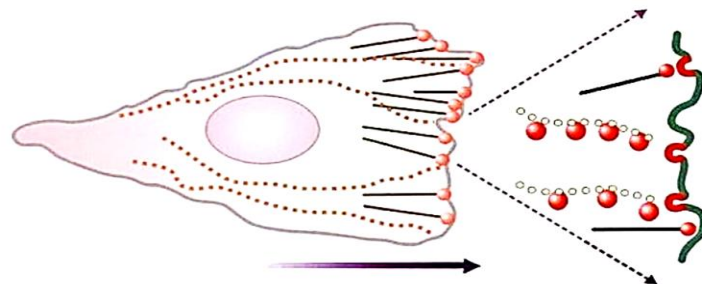


Figura 2.2 Aumento de superficie del frente de migración en una célula (Eynard et al., 2016).

El movimiento de las células no ocurre de forma azarosa, es producto de cascadas de señales extrínsecas y citoplasmáticas que promueven la movilidad, esto promueve un movimiento dirigido hacia sitios específicos donde las moléculas interactúan de forma coordinada (Eynard et al., 2016).

Estas moléculas de señalización atraen a las células de forma específica, esto se ha demostrado observando la incidencia de metástasis de un tumor primario a algún órgano particular. Por ejemplo, el cáncer de mama hace metástasis en hueso, pulmón, cerebro, e hígado, mientras que el cáncer de próstata hace metástasis principalmente al hueso (Ma et al., 2018). Esta migración preferencial muestra que las células responden a moléculas secretadas por el sitio del tumor secundario (Ma et al., 2018).

Se conocen los mecanismos generales (Figura 2.3) asociados con la migración celular sin embargo aún no se dilucidan todas las rutas de señalización, las moléculas específicas y los

mensajeros intermediarios que promueven la motilidad de las células con direccionalidad y precisión de movimiento (Eynard et al., 2016).

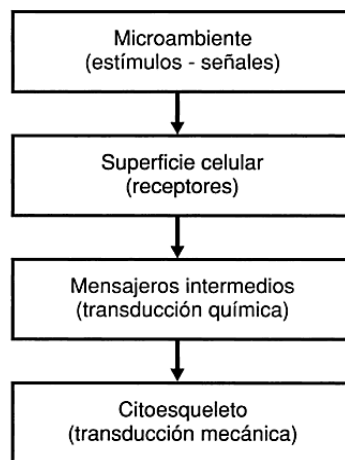


Figura 2.3 Interacciones moleculares que determinan la motilidad celular (Eynard et al., 2016).

La metástasis es un proceso que conlleva una compleja regulación molecular y rutas de señalización. En este trabajo se propone una herramienta para estudiar detalladamente este proceso y que sea de utilidad para en un futuro desarrollar terapias más efectivas contra el cáncer

2.3 LÁSER

La palabra láser es un acrónimo del inglés que significa amplificación de luz por emisión estimulada de radiación. Estos dispositivos, como dice su nombre, “...utilizan la emisión estimulada de radiación en un medio apropiado para generar un haz de luz cuyas características especiales de monocromaticidad, coherencia y direccionalidad se encuentran perfectamente controladas...” (Fernández, 2010).

La emisión estimulada ocurre cuando los átomos de un medio activo se excitan mediante una fuente de luz (método de bombeo) y sus electrones suben a niveles de energía más altos. Un medio activo está compuesto por átomos en estado fundamental y átomos excitados, pero para lograr la emisión de un láser el número de átomos excitados debe superar a el número de átomos en estado fundamental, a esto se le llama inversión de población en el medio (Fernández, 2010).

Cuando hacemos incidir luz en el medio excitado, los electrones pierden su excitación y obtenemos más luz a cambio. Esta luz es de la misma frecuencia que la anterior y los fotones extra reducen la excitación de más átomos y se obtienen más fotones. En resumen, los átomos en estado fundamental absorben la radiación mientras que los átomos excitados amplifican la luz mediante emisión estimulada.

En la Figura 2.4 se muestra esquemáticamente el proceso de generación de un haz láser. El medio está rodeado por una lámpara que representa el bombeo con fotones, en un extremo hay un espejo totalmente reflejante y en el otro un espejo parcialmente reflejante, a este espacio se le denomina cavidad óptica o resonante.

Los destellos de luz de la lámpara de bombeo cargan de energía los átomos del medio activo. Los átomos del medio activo emiten fotones y se mueven juntos de un extremo a otro. Los fotones quedan atrapados por las reflexiones de los espejos dentro de la cavidad resonante. Este proceso se repite constantemente y los fotones vuelven a cargar los átomos del medio activo obteniendo mayor emisión estimulada. La energía aumenta hasta llegar a la saturación de la cavidad y finalmente los fotones del haz láser salen a través del espejo parcialmente reflejante.

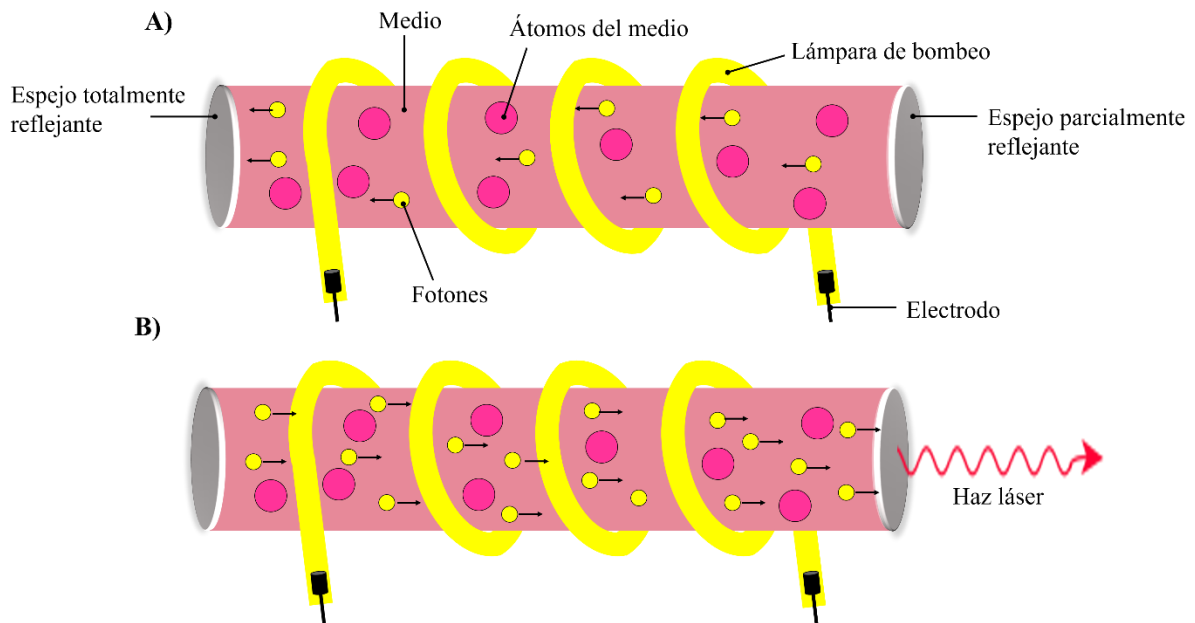


Figura 2.4 Proceso de generación de un haz láser.

Un láser genera radiación de ondas electromagnéticas alrededor de una longitud de onda que representa un intervalo de frecuencias muy estrechas lo que genera un haz monocromático. Además, en la emisión estimulada, los fotones son emitidos de la misma forma y contribuyen en fase creando una fuente de luz coherente. La extrema concentración de las ondas electromagnéticas en la cavidad resonante dan una elevada densidad de energía (Fernández, 2010).

El medio activo define el mecanismo de excitación. Un medio activo puede ser cualquier cosa (Fernández, 2010);

“cualquier cosa puede emitir radiación láser si la golpeas suficientemente fuerte”.

- Arthur Sachwalaw (pionero del láser) -

Los medios activos más comunes incluyen gases, sólidos y semiconductores, otros relevantes son los de electrones libres, los de rayos X y los de colorante líquido.

El láser que emite de forma prolongada lo denominamos láser continuo, mientras que el que lo hace por intervalos de tiempo se denomina láser pulsado. En este trabajo se empleó un láser continuo por lo que nos enfocaremos en este tipo de láseres.

Actualmente, a los láseres continuos los podemos encontrar con facilidad en la vida cotidiana, en algunos productos electrónicos, como, por ejemplo, en lectores y grabadores de discos, en un puntero láser, o en los lectores de códigos de barras, por mencionar algunos.

Entre los láseres continuos podemos encontrar a los láseres de estado sólido. Estos láseres tienen un material sólido como medio activo a un cristal o un vidrio, el cual en su momento de

fabricación se le introducen iones en el orden del 1% (Fernández, 2010). Estos láseres pueden ser bombeados por una lámpara o en el diodo mediante una corriente eléctrica. El bombeo del diodo ofrece mayor eficiencia ya que el diodo se puede ajustar a la absorción del medio de emisión, además de que requiere menor refrigeración (Fernández, 2010).

2.3.1 HAZ GAUSSIANO

Un láser consta básicamente de una cavidad resonante, un medio activo y una energía de bombeo. La cavidad resonante contiene al medio activo y a dos espejos; uno totalmente reflejante y otro parcialmente reflejante.

Las características de los espejos de la cavidad le darán una configuración específica al haz de salida para tener frentes de onda que satisfagan esa configuración dada. Un frente de onda estará compuesto por diferentes distribuciones de fase y amplitud, a los cuales se les llama modos electromagnéticos transversales (TEM). El TEM de radiación proveniente del láser es el perfil del campo electromagnético en un plano perpendicular a la dirección de propagación. Estos modos estarán influenciados por cualquier obstáculo dentro de la cavidad (Malacara, 2015).

Los modos pueden cambiarse de forma voluntaria cambiando la configuración de la cavidad o involuntaria por alguna partícula de polvo o ralladura sobre los espejos. El modo más simple y deseado es el modo transversal 0,0 ($TEM_{0,0}$), representado en la Figura 2.5. En este modo la fase sobre los espejos es constante, y su amplitud decrece del centro hacia las orillas en forma gaussiana.

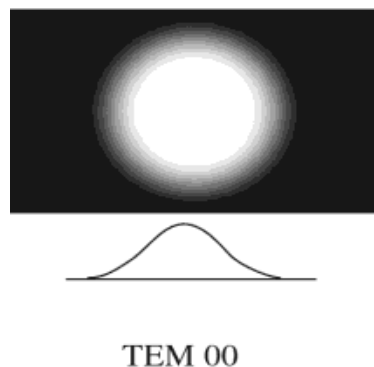


Figura 2.5 Haz gaussiano de menor orden (modo $TEM_{0,0}$) (Malacara, 2015).

Esto significa que si el haz del láser converge o diverge su tamaño irá aumentando con la distancia conservando la densidad y distribución de la energía (Bachs, Cuesta, & Careles,

1988). Un haz gaussiano es perfectamente simétrico y su plano de simetría es el plano focal, denominado cintura del haz (Figura 2.6).

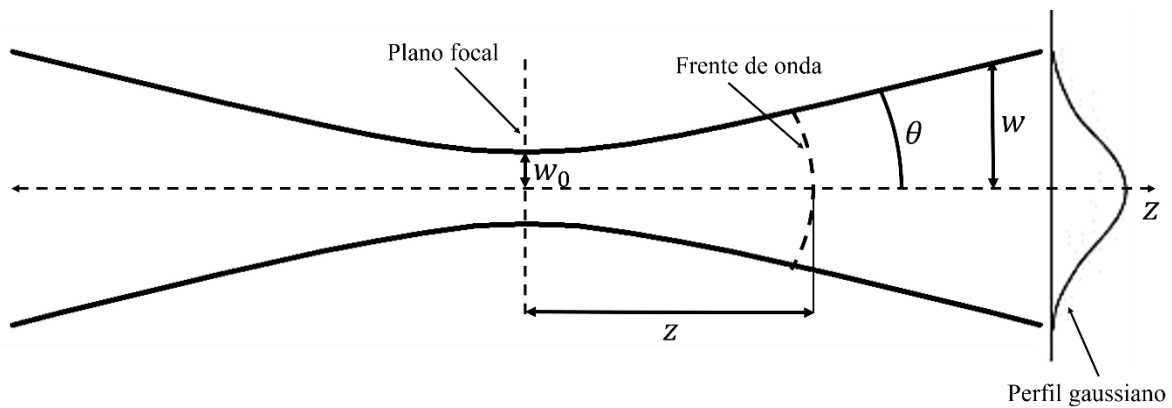


Figura 2.6 Parámetros de un haz gaussiano. Z distancia del foco. w_0 diámetro de la cintura. θ ángulo de convergencia o divergencia.

La fórmula que relaciona el tamaño del haz con la distancia recorrida esta representada en la Ec. 1

$$w^2 = w_0^2 \left[1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2 \right] \quad (1)$$

donde w (width en inglés) es el tamaño del radio del haz, w_0 es el radio mínimo del haz, z es la distancia a el plano focal y λ es la longitud de onda del haz.

Para calcular el diámetro del haz después de una lente, en su foco encontramos el límite de difracción (Figura 2.7) por lo que podemos simplificar con la fórmula de la siguiente forma

$$2w_0 = \left(\frac{4\lambda}{\pi} \right) \left(\frac{F}{D} \right) \quad (2)$$

donde F es la distancia focal de la lente y D el diámetro del haz antes de la lente.

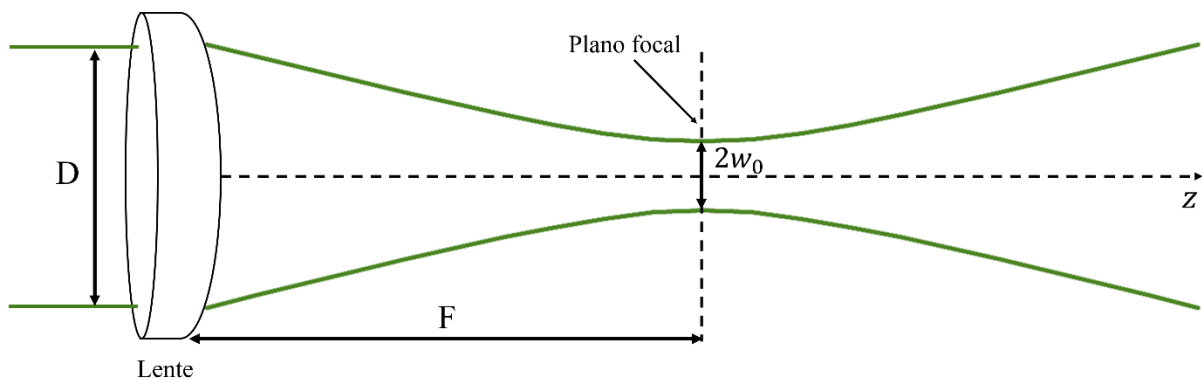


Figura 2.7 Haz de un láser después de una lente.

2.4 TÉCNICA DE ABLACIÓN LÁSER

Mediante la radiación de un rayo láser es posible remover material de una superficie, este proceso se denomina ablación láser. El proceso es diferente dependiendo del tiempo de exposición y de la densidad de energía. Para analizar esto es necesario primero entender el término de la potencia de un láser.

La potencia constante del láser comúnmente se mide en cantidad de energía promedio en un tiempo determinado. Esta relación quiere decir, cuantos joules entre segundo en promedio aplicas, que usado en el sistema internacional equivale a Watts. La potencia de un láser se mide en watts pero al mismo tiempo se puede deducir su energía al multiplicarla por la unidad de segundo.

La ablación láser mediante un láser pulsado, si el tiempo de pulso está en el orden de femtosegundos, el material será removido pasando de estado sólido a gaseoso. En este caso con el pulso de un láser, en óptica, se mide como la energía obtenida por una unidad de área. Representada comúnmente como joules/cm^2 . El termino es equivalente en física a lo que sería fluencia. Dejando de lado los láseres pulsados consideraremos la ablación láser con láseres continuos.

El proceso de ablación, mediante un láser continuo, comienza con la absorción de fotones en el área del material en la que incide el haz del láser. La naturaleza de la radiación constante ocasiona un aumento de la temperatura sobre esta superficie lo que da como resultado un cambio de fase del material. Este cambio de fase contribuye a la transformación del material debido al sobrecalentamiento de la superficie. El sobrecalentamiento se transfiere debajo de la superficie y ocasiona una microexplosión o salpicadura (Jiménez, 2012).

Este proceso de ablación genera un hueco o cráter de ablación en el sitio de exposición. Alrededor del cráter queda la zona afectada por el calor y en la superficie forma un borde sobre el cráter (Figura 2.8) (Jiménez, 2012).

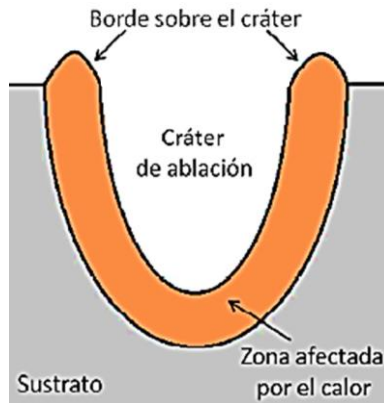


Figura 2.8 Cráter generado por ablación láser (Jiménez, 2012).

Las características específicas de la ablación, como profundidad o diámetro del cráter, dependen de las propiedades ópticas y termodinámicas del material, las cuales definirán el límite o umbral de daño (Jiménez, 2012).

El daño inducido por láser es un fenómeno de interacción de láser y materia. El cual puede proporcionar una herramienta para procesamiento y modificación de material (Manenkov, 2014). El umbral de daño inducido por láser indica la cantidad mínima de potencia láser que una superficie necesita para ser dañada (Ristau, Li, Sargent, & Sytchkova, 2017)

Para realizar la ablación láser es necesario usar una energía por encima del umbral de ablación. La prueba se realiza exponiendo el material de estudio a una fluencia del láser y posteriormente se examina. La fluencia se va aumentando hasta observar un daño apreciable.

3 ANTECEDENTES

3.1 ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR

En la actualidad los métodos más empleados para estudiar migración e invasividad de células de cáncer son los ensayos in vivo, usualmente en ratones y las aproximaciones in vitro, principalmente con el método llamado de “herida y cicatrización” y los ensayos en cámara Boyden.

Los modelos in vivo tienen todas las variables fisiológicas en el espécimen, lo cual representa una ventaja frente a los modelos in vitro. Sin embargo, se requieren ratones inmunocomprometidos para que estos acepten las células humanas cancerosas, esto representa un problema ya que las células inmunitarias desempeñan un papel importante en el desarrollo de la metástasis (Ma et al., 2018). Otro problema es que la diferencia entre especies ha impedido una completa eficacia de los fármacos al administrarse en pacientes humanos a pesar de que estos han demostrado buenos resultados en los ratones (Ma et al., 2018). Además, los ensayos de metástasis en ratones requieren tiempos prolongados, al menos un mes.

En cuanto a los modelos in vitro, el método de la “herida y cicatrización” permite observar la migración de manera sencilla, pero no logra replicar el entorno 3D y los gradientes de señales que estarían presentes in vivo (Ma et al., 2018). Por su parte el ensayo en cámara de Boyden permite cuantificar la migración hacia un quimioatrayente permitiendo la medición en el punto final, sin embargo, no se pueden apreciar imágenes en tiempo real ni se permite el análisis de una sola célula (Ma et al., 2018).

Estos modelos presentan desventajas que los biochips buscan mejorar. Los biochips son plataformas que permiten la incorporación de interacciones complejas en microentornos, sobre los cuales se pueden manipular factores individuales.

Ma et al. clasifica a los biochips para el estudio de la metástasis según el estímulo al que se esté sometiendo a las células, como: respuesta a mecanismos mecánicos; respuesta a señales bioquímicas o respuestas celulares. Algunos biochips combinan los tipos de estímulos y dependiendo la cantidad de factores que se quieran controlar se vuelven más complejos y costosos.

El objetivo de que los biochips sean una plataforma para el estudio de la migración celular ha propiciado el desarrollo de diferentes investigaciones para determinar los estímulos que

afectan a las células sin que se induzca directamente la migración. Un ejemplo es un dispositivo microfluídico, desarrollado por Irimia et al., el cual con hidrogeles confina mecánicamente células de cáncer de mama MDA-MB-231 en canales de $3\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$, estas células migraron sin necesidad de un estímulo externo, lo que demostró que las células pueden migrar por señales mecánicas (Irimia & Toner, 2009). Otro estímulo mecánico que afectan la migración es la rigidez la cual afecta la velocidad de migración (Ma et al., 2018).

Estos son ejemplos de los factores que se han tenido que contemplar en el desarrollo de biochips para permitir recrear un medio similar al de los tejidos donde se lleva a cabo la migración.

Con el avance de las investigaciones se adoptó el Polidimetil siloxano (PDMS) como el material predilecto para este tipo de aplicaciones gracias a sus propiedades mecánicas, además, permite el paso de los gases a través de su superficie y es transparente.

En el estudio de migración celular se han desarrollado diversas configuraciones para observar este fenómeno. Un ejemplo, es el trabajo desarrollado por Mak et al. donde propone un dispositivo microfluídico con una red de canales de $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$ los cuáles se reducen en canales más pequeños de $5\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Las células MDA-MB-231 fueron colocadas en los canales grandes y se observó que las células se alargaban dentro de los canales más pequeños para poder pasar al otro extremo y al salir recuperaban su forma (Mak, Reinhart-King, & Erickson, 2013).

La complejidad de los biochips varía en función de los parámetros que se quiera estudiar. Un biochip desarrollado por Li et al. agregó dentro de sus canales de migración Matrigel como sustituto de matriz extracelular. Utilizó fibroblastos asociados a carcinoma, los cuales tenían que atravesar el Matrigel ya que en el otro extremo eran atraídos por suero fetal bovino (Li et al., 2016).

Otros autores agregan además un sistema de bombeo por microflujo, lo que permite que los medios de cultivo o alguna otra sustancia fluya periódicamente a través de los biochips. El trabajo desarrollado por Huang et al. agregó en su diseño un canal de flujo perpendicular a los canales de cultivo, este flujo pretendía simular el flujo intersticial, y quería observar el efecto que tenía sobre la migración de células MDA-MB-231. Entre sus resultados encontró que las células migran más rápido en presencia del flujo (Huang, Tung, Zheng, Kim, & Wu, 2015). Estas observaciones nos dan una variable más a controlar en el desarrollo de biochips.

Existen gran cantidad de investigaciones y diseños de biochips para el estudio de la migración celular, sin embargo, la disponibilidad aún es limitada, el costo de proceso de fabricación es alto y los detalles de los métodos de fabricación aún son resguardados por sus

creadores. Por lo anterior, se requiere un método de fabricación de fácil acceso y costo asequible que pueda realizarse en un laboratorio universitario. Este trabajo pretende sentar las bases de un método sencillo de fabricación y a bajo costo.

3.2 MICROFABRICACIÓN DE BIOCHIPS

El constante avance en la miniaturización de sistemas electrónicos inspiró a las ciencias de la vida para crear sistemas micrométricos como nuevas herramientas en investigaciones relacionadas con la biología celular, la biología molecular y la química analítica. Los primeros biochips surgieron como herramientas para cromatografía y en la década de los años 90 fueron adoptados para estudios en biología molecular en el análisis de genes (Cheng & Kricka, 2003).

La complejidad y costos de producción de los biochips avanzaron en función al progreso de miniaturización y sus técnicas de fabricación. El paso de la microfabricación de componentes electrónicos a biochips representó un reto ya que los métodos no estaban desarrollados para trabajar con materiales biocompatibles como los polímeros (Cheng & Kricka, 2003).

Con la entrada de los polímeros, como materiales base de los biochips, las técnicas de microfabricación se fueron adaptando para la producción de los mismos. Las técnicas de fabricación incluyen generalmente procesos de limpieza, microfabricación y lavado o desmolde, y estos se subdividen dependiendo de la técnica empleada (Cheng & Kricka, 2003).

Las técnicas pueden dividirse en métodos de fabricación maestros y técnicas de serie/individual (Cheng & Kricka, 2003). Los métodos de fabricación maestros crean un molde base para crear biochips en serie a partir del primero, realizando sólo en una ocasión las técnicas de microfabricación. Mientras que los de serie / individual permiten hacer uno o varios biochips, pero cada uno debe someterse a todos los pasos de microfabricación.

Los métodos de fabricación maestros requieren mayor infraestructura y son empleados para producciones en serie de biochips ya probados. Entre estos métodos se encuentra el micromaquinado mecánico, la galvanoplastia y el micromaquinado en silicona (Cheng & Kricka, 2003). Estos métodos permiten estructuras en un rango de 10 a 40 μm o 100 a 200 μm , dependiendo el costo (Cheng & Kricka, 2003). Al obtener un molde maestro estos métodos son apoyados de las técnicas de estampado caliente y moldeo por inyección para hacer una producción en serie (Cheng & Kricka, 2003).

Los métodos de serie / individual incluyen técnicas de tecnologías basadas en láser, métodos basados en litografía y técnicas por estratificación. Los métodos basados en litografía son los más laboriosos ya que requieren una gran serie de pasos, donde se obtienen estructuras de entre 100 μm a 50 mm (Cheng & Kricka, 2003). Los métodos basados en litografía son los más empleados para realizar biochips, ya que tienen un equilibrio entre costo y resolución.

Las tecnologías basadas en láser que emplean láseres pulsados, estos crean estructuras en el orden de nanómetros (Cheng & Kricka, 2003). En la década pasada los más empleados eran los láseres de nanosegundos, pero en la actualidad se emplean los láseres de femtosegundos. Los grabados con láseres de nanosegundos tienen la desventaja de que el material es expulsado por fusión y el material fundido se solidifica nuevamente creando imperfecciones (Hamad, 2016). Mientras que los grabados con láseres de femtosegundos al ser más cortos los pulsos no existe transferencia de calor en el material y el material afectado es desprendido por vaporización y no tiene área de refundición (Hamad, 2016).

La resolución de grabado es muy importante en la escala de nanómetros, sin embargo, si no se requieren grabados tan finos se pueden emplear técnicas de grabado láser menos sofisticadas y costosas. El uso de láseres continuos para hacer grabados directamente, sin fotolitografía, no es muy común ya que requieren un mayor tiempo de fabricación. Los trabajos realizados con láseres continuos, reportados en la bibliografía, emplean láseres de CO₂ para crear microestructuras.

Uno de los primeros trabajos reportados fue el realizado por Klank et al., donde grabaron sobre polimetilmetacrilato (PMMA). Aquí la potencia de grabado fue variada con un láser de CO₂ desde 0 - 40 W. Obtuvieron canales de 100 - 200 μm , siendo su canal más estrecho de 85 μm de ancho, empleando una velocidad de grabado de 1 m/s (Klank, Kutter, & Geschke, 2002).

Posteriormente surgieron otros trabajos para fabricar microestructuras sobre PMMA, usando también el láser de CO₂. Entre los que destaca el trabajo de Qi et al., quienes realizaron canales de aproximadamente 100 x 100 μm (ancho x alto), con una potencia de 4.5 W y una velocidad de 76.3 mm/s (Qi, Wang, Chen, Ma, & Zuo, 2009). Otro es el trabajo de Hong et al., grabaron canales de 150 x 60 μm con una potencia de 1.2 W y una velocidad de 250 mm/s (Hong et al., 2010).

El grupo de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Automatización de la Universidad Tecnológica de Liaoning ha destacado recientemente en el grabado con láser de CO₂. Observaron que los grabados sobre PMMA al variar la potencia del láser y la velocidad de grabado, existe un efecto en la rugosidad de los canales (Chen, Li, Zhai, Hu, & Zhou, 2017). Posteriormente, grabaron sobre una cinta doble cara de PMMA con una potencia de entre 6.6 - 9 W y una velocidad de grabado de 5 - 15 mm/s, logrando remover el pegamento y dejando solo la parte de PMMA de la cinta. Obtuvieron canales de 200 μm de ancho aproximadamente pero no reportan su profundidad (Chen, Li, & Gao, 2018). También graban canales sobre tereftalato de polietileno, variando la velocidad de grabado entre 5 - 25 mm/s y la potencia del

láser entre 4 - 20 W. Los canales grabados más pequeños fueron de 125 x 50 μm a una velocidad de 25 mm/s y una potencia de 4 W (Hu & Chen, 2018).

Sólo se han reportado grabados con ayuda de láseres continuos empleando láser de CO_2 . Con ayuda de estos láseres se han realizado grabados de canales de un ancho mínimo de 100 μm . Por lo que para realizar estructuras más pequeñas se requiere de una nueva propuesta y de su respectivo sistema óptico.

En este trabajo se propone un arreglo óptico de bajo costo para realizar microestructuras inferiores a 100 μm . Las estructuras son grabadas en forma de canales para su futura aplicación en ensayos de migración celular.

4 CARACTERIZACIÓN DEL LÁSER

En este trabajo fue empleado un diodo láser de estado sólido de 531 nm (verde) para realizar ablación láser. Primero, para obtener los grabados de las dimensiones deseadas y de manera repetible se realizó una caracterización del láser. En segundo lugar, se buscaron obtener los parámetros para el control del diámetro y profundidad. Estos parámetros de grabado son dependientes del material de grabado. El material de grabado son celdas de poliestireno para espectrofotometría. La caracterización se hizo con un arreglo óptico para caminar o controlar la dirección del haz, así como para disminuir o aumentar su diámetro. Los parámetros de potencia y tiempo de exposición se variaron para observar su efecto en la ablación del material.

4.1 ARREGLO ÓPTICO

El láser empleado fue uno de estado sólido bombeado por diodo (DPSS) de la marca Hangzhou Brandnew Technology Co., Ltd., este es un láser continuo y trabaja a una longitud de onda de 532 nm (Gráfica 4.1), y se puede variar su potencia de 0 a 4 watts en intervalos de 0.1 watt. Este sistema cuenta con una fuente de alimentación de baja tensión y alta corriente (Figura 4.1).

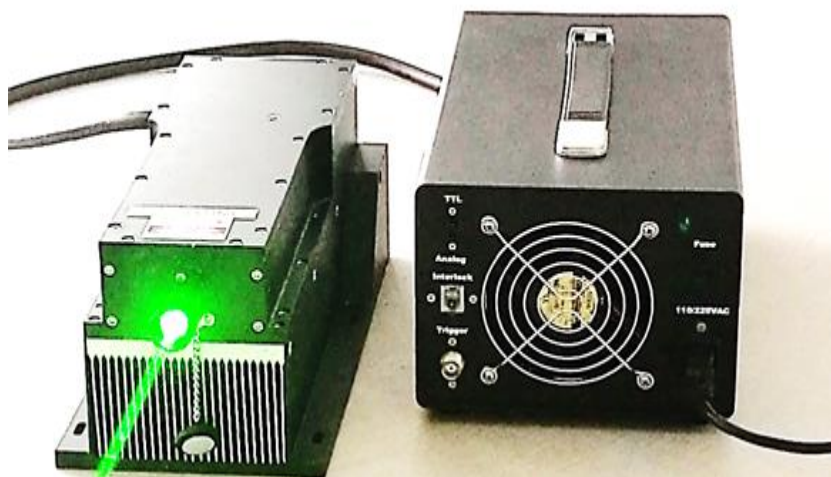
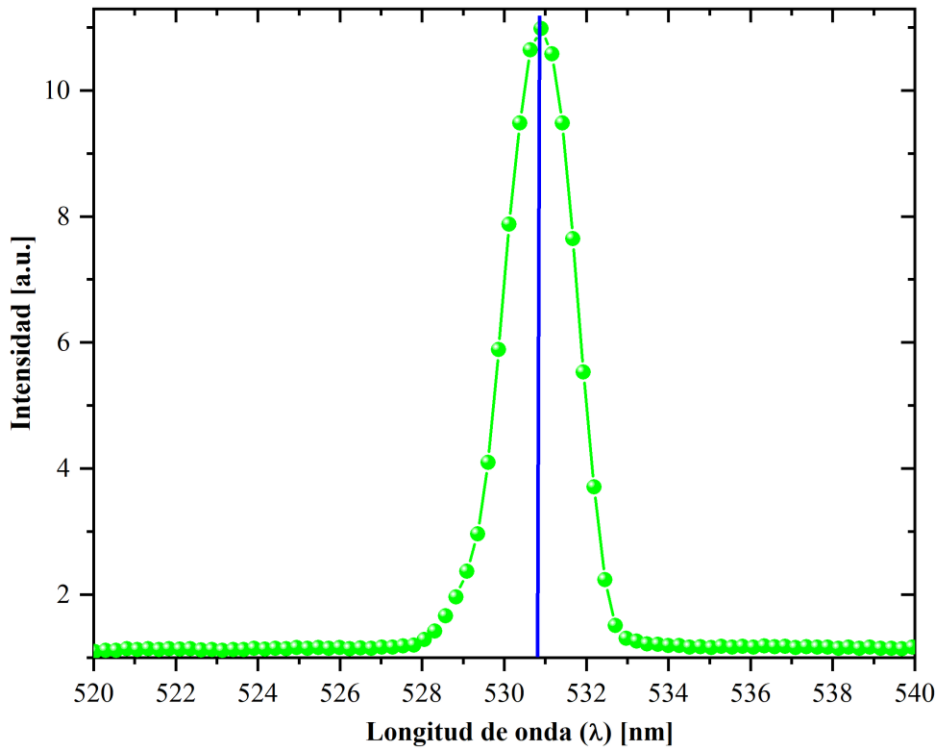


Figura 4.1 Láser 532nm DPSS diodo láser de estado sólido (izquierda), fuente de alimentación (derecha) [imagen proporcionada por Hangzhou Brandnew Technology Co.].

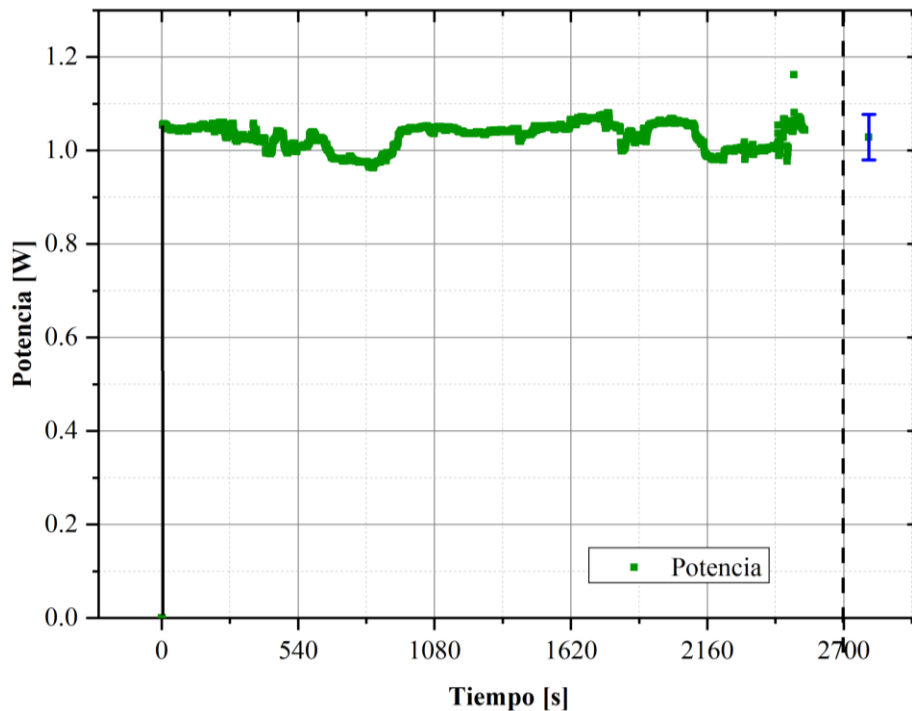


Gráfica 4.1 Espectro del láser de estado sólido.

Equipo	Especificaciones
Láser	Láser de estado sólido bombeado por diodo (DPSS), el cual trabaja a una longitud de onda de 532 nm, de la marca Hangzhou Brandnew Technology Co., Ltd.,
Medidor de potencia	Medidor digital de potencia óptica y energía (powermeter PM100D) de la marca Thorlabs.
Cabezal altas potencias	Cabeza del sensor de potencia térmica (S310C), 190 nm - 25 μm , 10 W, de la marca Thorlabs.
Cabezal bajas potencias	Sensor de potencia de fotodiodo delgado de silicio (S130VC), 200 - 1100 nm, 50 mW, de la marca Thorlabs.

Tabla 4.1. Equipo empleado.

El fabricante reporta una estabilidad del 5% en potencia. Para corroborar los datos de estabilidad se usó un medidor digital de potencia PM100D en conjunto con un cabezal para altas potencias. Las especificaciones de los equipos se muestran en la Tabla 4.1. La salida de potencia fue monitorizada durante 40 minutos, capturando 2500 valores donde cada punto es el valor de 10 promedios de potencia por segundo (Gráfica 4.2).



Gráfica 4.2 Estabilidad de la potencia promedio a la salida del láser. La desviación estándar (barra azul) se encuentra en el rango de variación que el fabricante establece en sus especificaciones.

El láser fue acoplado a un arreglo óptico (Figura 4.2) para disminuir el tamaño y mejorar la calidad del haz. Este arreglo consiste en dos espejos metálicos para modificar el camino óptico; dos iris que funcionan como filtros espaciales para regular la cantidad de luz y mantener un haz gaussiano; una lente convergente de 15 mm de foco para focalizar el haz y disminuir el diámetro. En el foco de la lente se coloca la muestra a grabar, la cual está sujeta a un sistema de motores en 3 ejes controlados por MATLAB. Los motores nos permiten tener un sistema en tres ejes de movimiento (X , Y , Z). Los ejes X y Y nos permiten hacer diferentes patrones de grabado, mientras que el eje Z permite el movimiento a diferente distancia del foco de la lente. El haz del láser atraviesa el primer iris, cambia de dirección en el primer espejo, cambia de dirección y plano en el segundo espejo y pasa a través del segundo iris, posteriormente, entra en la lente para llegar hasta la muestra de grabado. En la Tabla 4.2 se muestran las especificaciones de cada uno de los componentes.

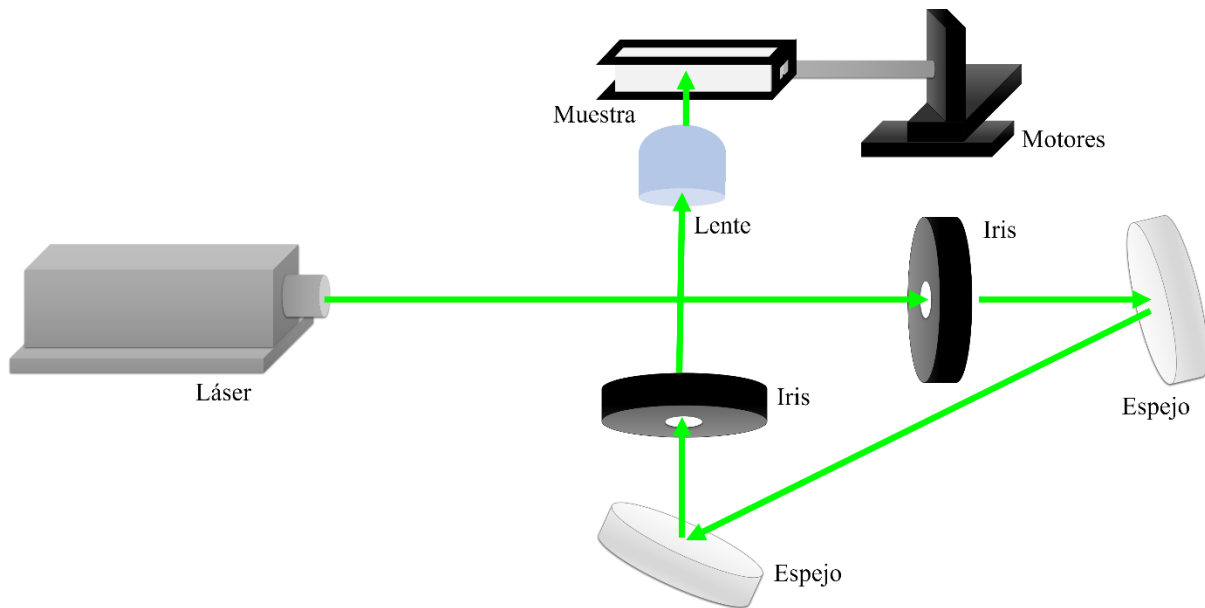


Figura 4.2. Diagrama esquemático del arreglo experimental para mejorar la calidad óptica.

Componente	Especificaciones
2 Iris	Diafragma de iris accionado por palanca (SM1D12), Ø0.8 - Ø12 mm, de la marca Thorlabs.
2 Espejos	Espejo de plata protegido (PF10-03-P01) de Ø1 ", de la marca Thorlabs.
1 Lente	Lente Plano-Convexa (LA1540), NBK-7, Ø1/2", f = 15.0 mm, sin recubrimiento, de la marca Thorlabs.
3 Driver	Controlador de servomotor T-Cube DC (TDC001) de la marca Thorlabs.
3 Motores	Etapa de conversión motorizada (MTS50-Z8), de 50 mm (1.97 "), 8-32 y 4-40 tomas de la marca Thorlabs.

Tabla 4.2 Componentes del arreglo experimental.

Para medir el diámetro del haz se utilizó el método de la navaja, el cual consiste en medir el diámetro del haz a 86% y 13% de la potencia promedio del haz Gaussiano (Figura 4.3). El procedimiento se realiza obstruyendo el haz del detector hasta tener el 86% de la potencia inicial. En ese punto se toma la primera medida de posición de referencia. De la misma manera y siguiendo la misma dirección se mueve la navaja para la obstrucción, hasta tener el 13% de la potencia y ahí se toma como referencia la segunda posición. Finalmente, se procede a realizar la diferencia entre las posiciones para obtener el tamaño del diámetro del haz.

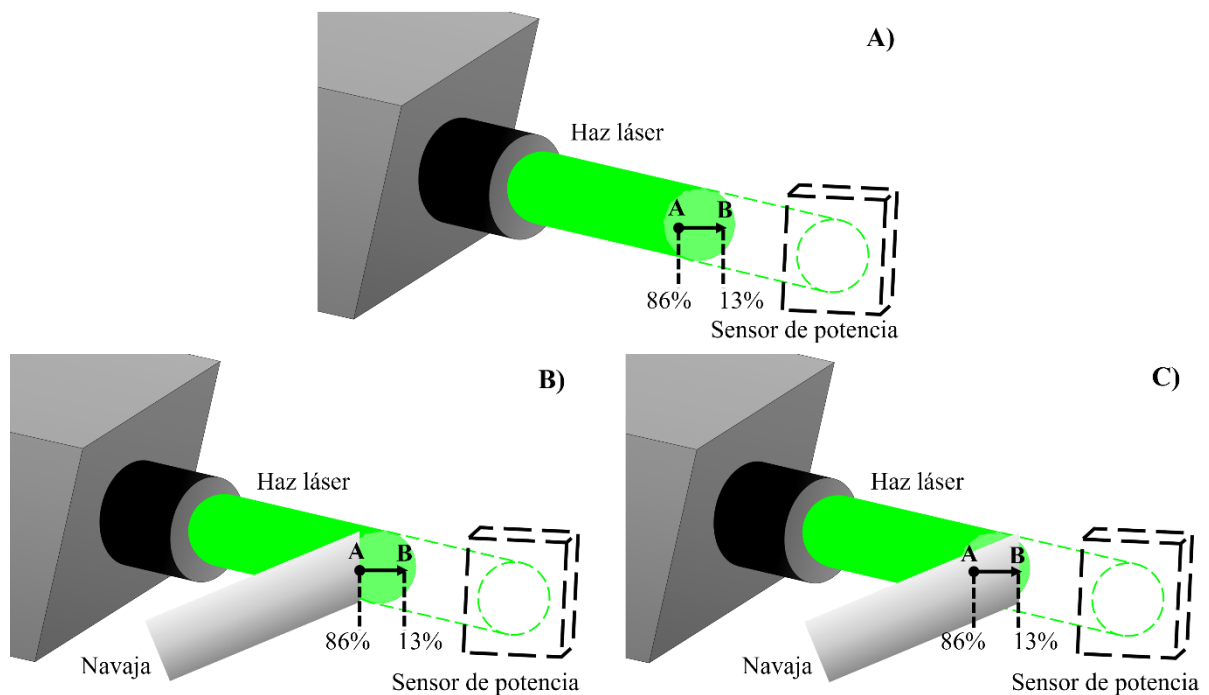


Figura 4.3 Técnica de la navaja para determinar el diámetro de un haz. *A) El primer paso es medir el 100% de la potencia. B) En el segundo paso se mueve el filo de una navaja hasta medir el 86% de potencia y ese será el primer punto de referencia. C) El tercer paso consiste en mover la navaja hasta obtener el 13% de la potencia, ese es el segundo punto de referencia. La navaja tiene que estar colocada en un sistema que ayude a medir la diferencia de posición entre el punto A y el punto B.*

Este método fue empleado para medir el diámetro del haz a la salida del láser y antes de entrar a la lente, donde se obtuvo 10 mm y 0.7866 mm respectivamente. Además, se midió la potencia para observar el cambio entre la salida del láser y el arreglo óptico. Las medidas de potencia se realizaron a la salida del láser con un valor de 1W y antes de la lente, midiendo 10 mW, observando que después de la lente se tienen 9.25 mW. Estas medidas se muestran esquemáticamente en la Figura 4.4. Para las medidas del diámetro del haz y potencia se empleó el medidor digital de potencia, el cabezal de potencias altas para medir a la salida del láser y el cabezal de potencias bajas para medir dentro del arreglo óptico.

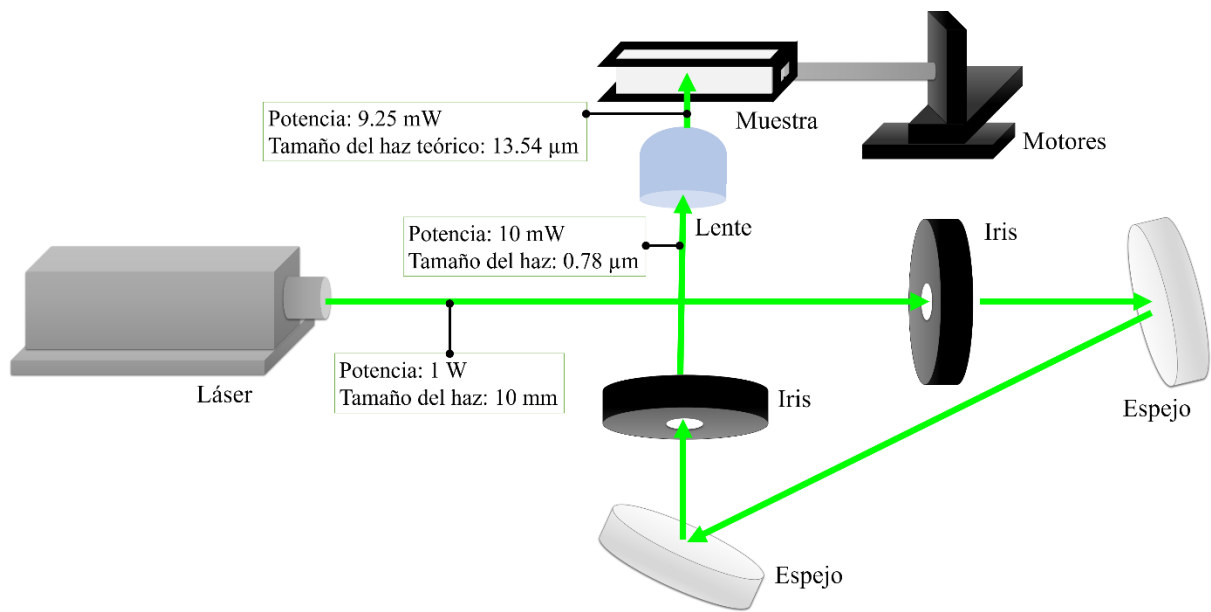


Figura 4.4 Medidas en el esquema de potencia y diámetro.

4.2 UMBRAL DE DAÑO DEL LÁSER

Es importante estimar el límite de daño en función de la potencia del láser en un material cuando se quiere realizar ablación láser, ya que cada material de grabado tendrá límites diferentes dados por la naturaleza del material. En este caso utilizamos celdas para espectrofotómetro de poliestireno. Sobre estas se realizaron grabados variando la potencia de 0.01 mW a 9.5 mW. La potencia fue medida antes de entrar a la lente y fue variada con ayuda de dos polarizadores lineales Ø12.5 mm (LPVIS050 de la marca Thorlabs), como se muestra en la Figura 4.5. Estos polarizadores nos permitieron variar la potencia de manera controlada cambiando de polarización vertical a polarización horizontal. Además, para evitar cambios de potencia se dejó estabilizar en una potencia fija el láser por 20 minutos mínimo.

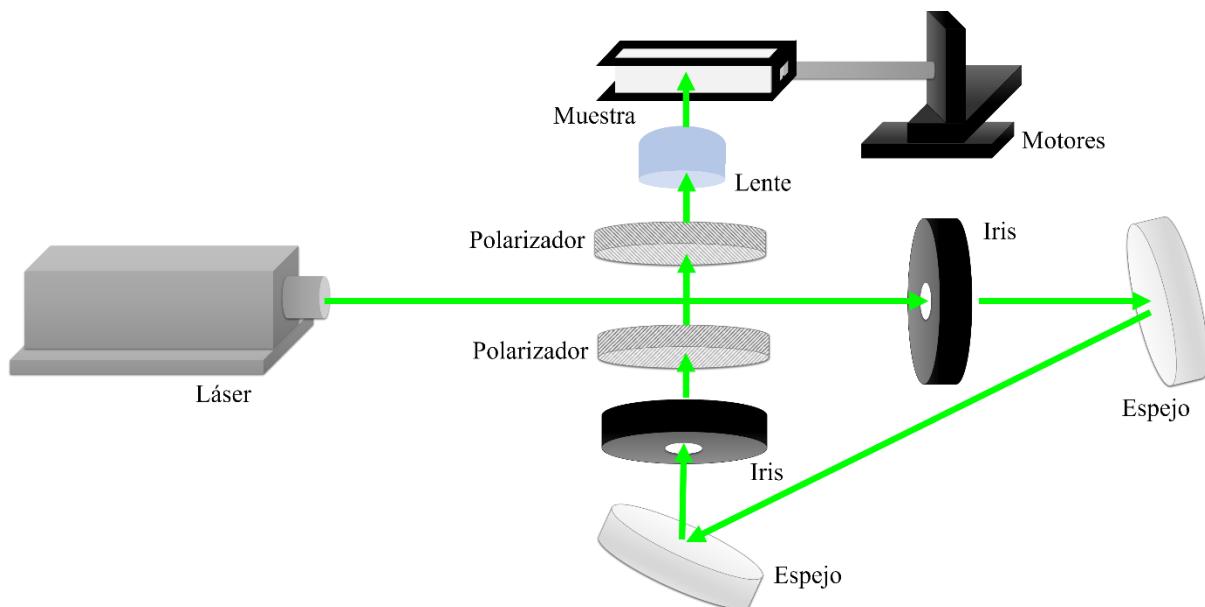
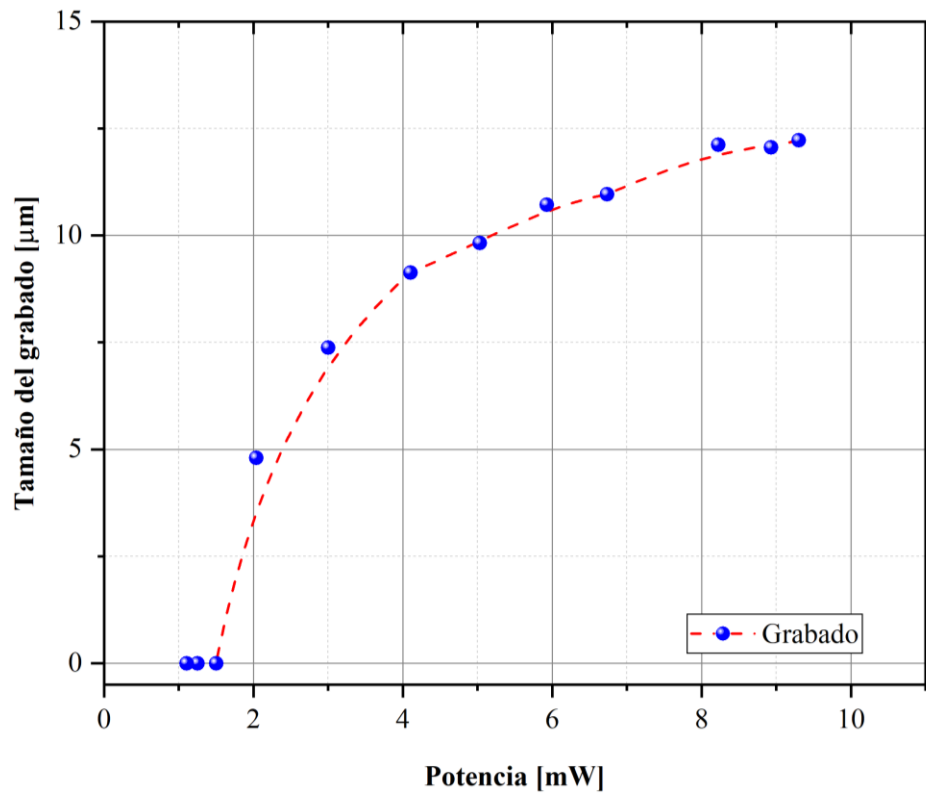


Figura 4.5 Esquema del sistema con polarizadores.

Los cambios de potencia medidos después de la lente se realizaron con saltos de aproximadamente 1 mW de diferencia por cada grabado. Posteriormente, se midió el diámetro de grabado con un microscopio óptico vertical de la marca AmScope (Microscopio compuesto metalúrgico 40X - 640X Infinity Plan). El microscopio está acoplado a una cámara de 3 MP tipo CMOS para tomar imágenes. Con ayuda del software IS Capture se realizaron las medidas de distancia a las imágenes. Este software se calibró previamente con la distancia de una fibra óptica estándar de 125 μm .

Con las medidas del diámetro en los canales grabados dañados se realizó la Gráfica 4.3 en función de la potencia. El límite de umbral de daño se encuentra en 2 mW, ya que por debajo de este valor ya no se aprecian grabados en el material.



Gráfica 4.3 Umbral de grabado y anchura grabada en los sustratos.

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL LÁSER

La caracterización del láser se realizó con el fin de conocer los valores de profundidad y diámetro que se podían obtener mediante la intensidad aplicada para lograr la ablación láser. Antes de realizar las pruebas experimentales se realizaron cálculos teóricos para tener una aproximación de los valores de diámetros esperados.

El diámetro teórico del haz del láser después de la lente en el foco está dado por la Ec. 2, detallada en la sección 2.3.1,

$$2w_0 = \left(\frac{4\lambda}{\pi}\right) \left(\frac{F}{D}\right) \quad (2)$$

Sustituyendo por los valores empleados, longitud de onda $\lambda=532$ nm, foco de la lente $F=15$ mm y diámetro del haz $D=0.79$ mm medido con la técnica de la navaja, obtenemos un valor teórico del diámetro del láser después de la lente de $12.68 \mu\text{m}$

$$2w_0 = \left(\frac{(4)(532 \text{ nm})}{\pi}\right) \left(\frac{15 \text{ mm}}{0.79 \text{ mm}}\right) = 12.68 \mu\text{m}$$

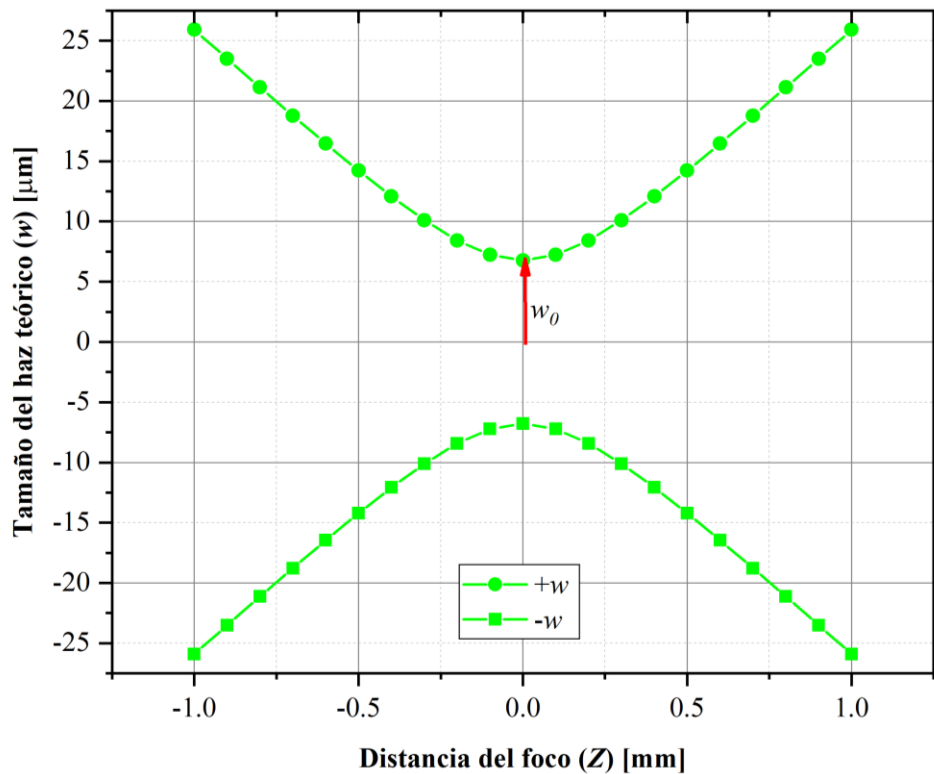
Para calcular el diámetro del láser a una distancia distinta del foco empleamos la Ec. 1, detallada en la sección 2.3.1,

$$w^2 = w_0^2 \left[1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2}\right)^2\right] \quad (1)$$

En este caso w^2 es una ecuación dependiente de Z lo que nos permite predecir el tamaño del radio del haz variando el valor de Z

$$w(z) = w_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2}\right)^2\right]^{1/2} \quad (3)$$

Ya que $2w_0=12.68 \mu\text{m}$ el valor de w_0 es $6.34 \mu\text{m}$, sustituyendo este valor en la ecuación anterior y variando la distancia del foco en Z obtenemos la Gráfica 4.4 que muestra la variación del tamaño del haz cuando se aleja del foco de la lente.



Gráfica 4.4 Diámetro teórico del haz en función de la distancia al foco de la lente.

Las medidas del tamaño de diámetro del haz se realizaron mediante grabados sobre celdas de poliestireno para espectrofotometría (Figura 4.6 A). Los grabados se realizaron con ayuda de los motores, X, Y y Z. Cada grabado se realizó variando el diámetro del foco con pasos de 0.2 mm, es decir, cambiando la distancia con el motor Z. La distancia Z va adelantándose al foco, es decir, la distancia hasta llegar a los 5 pasos antes del foco y con 5 pasos después del foco equivalente a ± 1 mm (Figura 4.6 B).

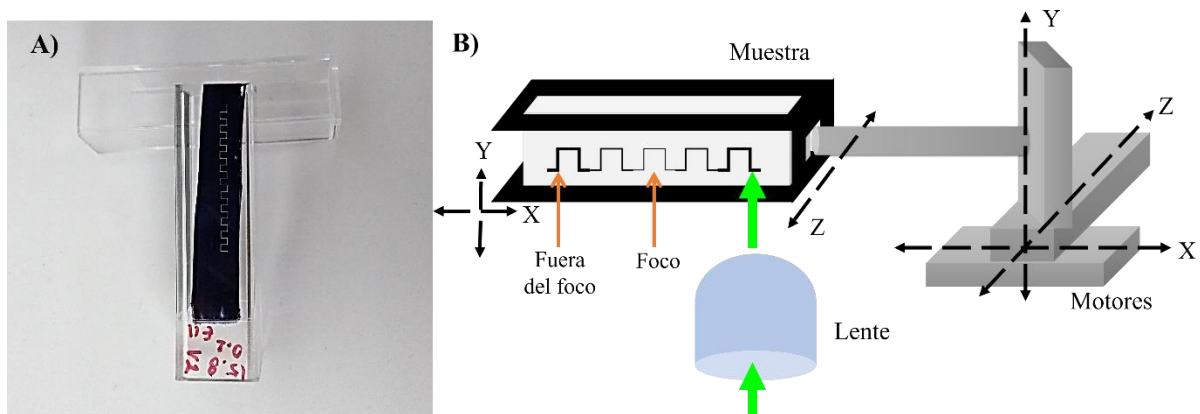
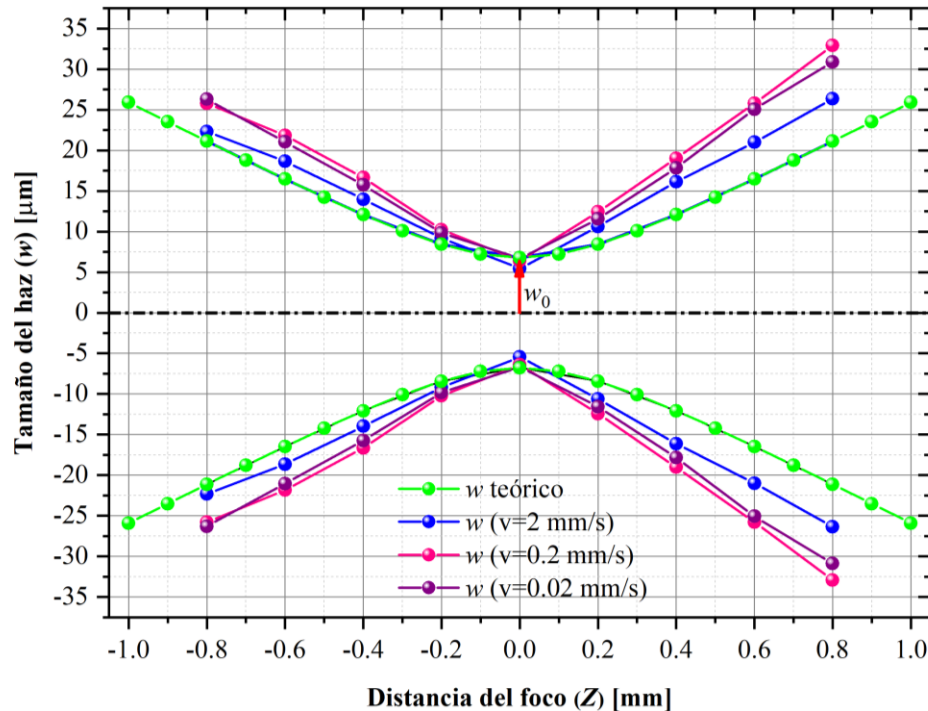


Figura 4.6 A) Foto de la celda grabada y sin grabar B) Esquema de grabado para determinar el diámetro en función del tiempo de exposición debida a la velocidad de los motores.

La velocidad de los motores fue variada para obtener gráficas a distintas velocidades intentando observar cómo influye dicha velocidad en el diámetro del haz de grabado debido al tiempo de exposición. Las velocidades empleadas para los distintos gráficos (Gráfica 4.5) fueron 0.02 mm/s, 0.2 mm/s, 1 mm/s y 2 mm/s.



Gráfica 4.5 Comparación experimental con valor teórico (líneas verdes) de anchura de haz gaussiano. Tres condiciones de grabado cambiadas con la velocidad de los motores para variar el tiempo de grabado equivalente a la variación en el tiempo de exposición, equivalentes a cambiar en tres órdenes de magnitud la energía.

Para medir el diámetro de grabado en la celda por cada diámetro distinto del haz, se empleó nuevamente el microscopio óptico vertical de AmScope, antes mencionado, para realizar dichas medidas. La Gráfica 4.6 fue realizada con las medidas promedio del diámetro de la ablación a partir de 6 medidas independientes tomadas de la misma imagen (Figura 4.7). Estos promedios de medidas de diámetros de las líneas de ablación entregan una desviación de $\pm 1 \mu\text{m}$.

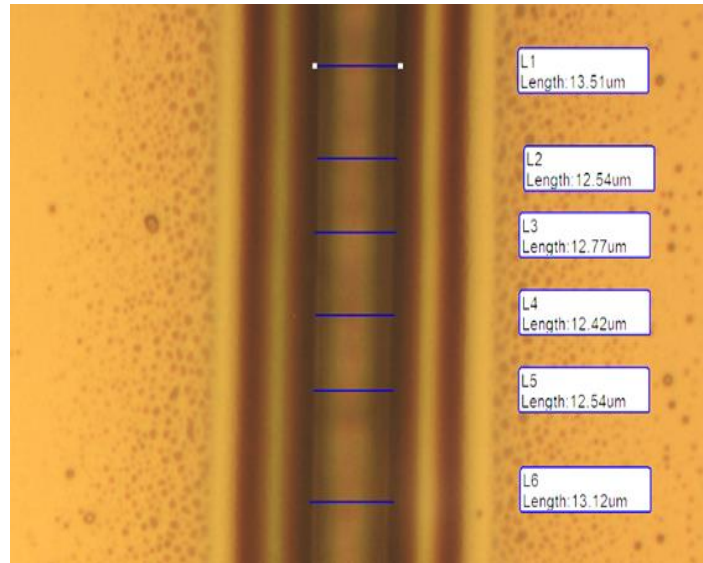
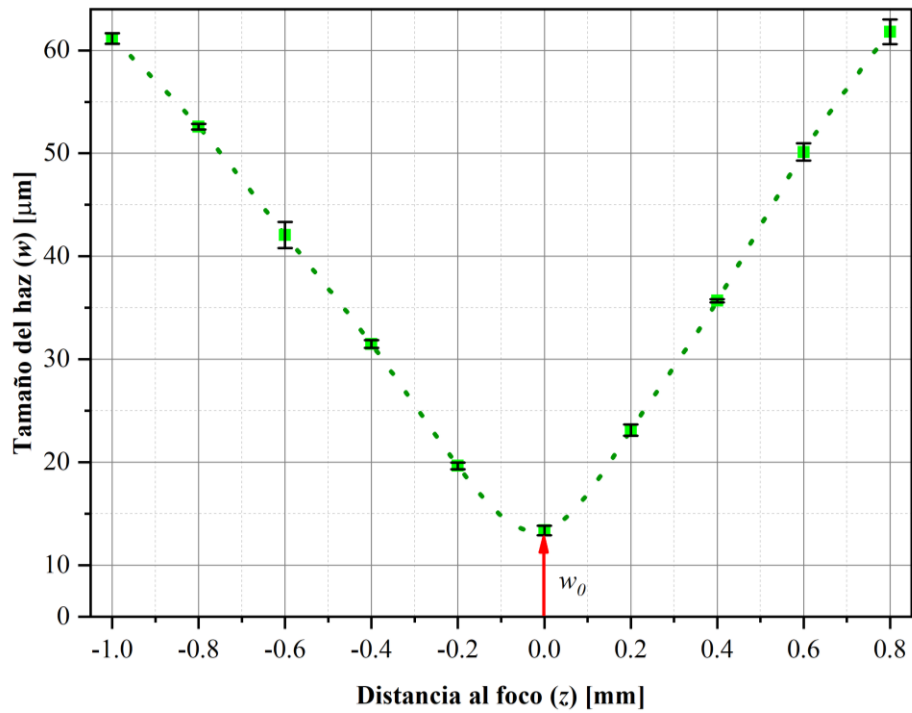


Figura 4.7 Captura de pantalla de la toma de 6 medidas.



Gráfica 4.6 Radio de haz con desviación estándar.

4.4 PROFUNDIDAD DE GRABADO

La profundidad del grabado en la ablación láser a un valor constante de potencia, está dado por el tiempo de exposición. Este tiempo de exposición, está controlado y determinado por la distancia del grabado y el tiempo que está expuesto el haz sobre la superficie del material, equivalente a la velocidad en la que movemos la muestra. Por lo tanto, para realizar la caracterización de profundidad de grabado, se realizaron grabados variando la velocidad del movimiento de la muestra. Posteriormente, se midió la profundidad del canal mediante el microscopio AmScope.

Previo a tomar las medidas de profundidad se realizó una estandarización métrica de cambio de foco en el microscopio. Para medir la profundidad o altura de los grabados con una referencia. Se estableció un punto de referencia con un objeto conocido. Nuevamente se usó una fibra óptica de $125\ \mu\text{m}$ en el eje óptico, desde la superficie hasta su centro lo cual corresponde a $62.5\ \mu\text{m}$. Se tomó la diferencia del giro del tornillo micrométrico al cambiar el foco, este valor corresponde a 80 unidades de giro del tornillo micrométrico del microscopio (Figura 4.8). Por lo que realizando los cálculos con ayuda de una regla de tres obtenemos que 20 unidades de giro corresponden a $15.625\ \mu\text{m}$ y dos unidades de giro o distancia entre cada marca de referencia corresponde a $0.78\ \mu\text{m}$.

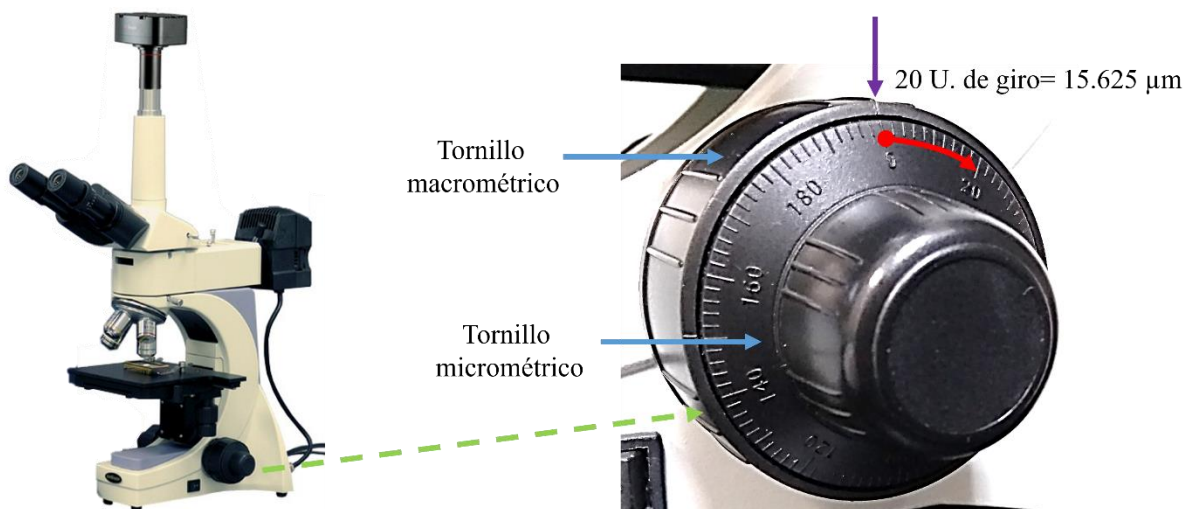


Figura 4.8 Microscopio AmScope (izquierda), tornillos para cambiar el foco (derecha). Punto de referencia (flecha morada), 20 unidades de giro (flecha roja).

Sabiendo la equivalencia de una marca de referencia del tornillo micrométrico, se tomaron las medidas cambiando el foco para pasar de un plano normal (sobre la celda) a otro inferior o superior (punta del grabado), representados en la Figura 4.9.

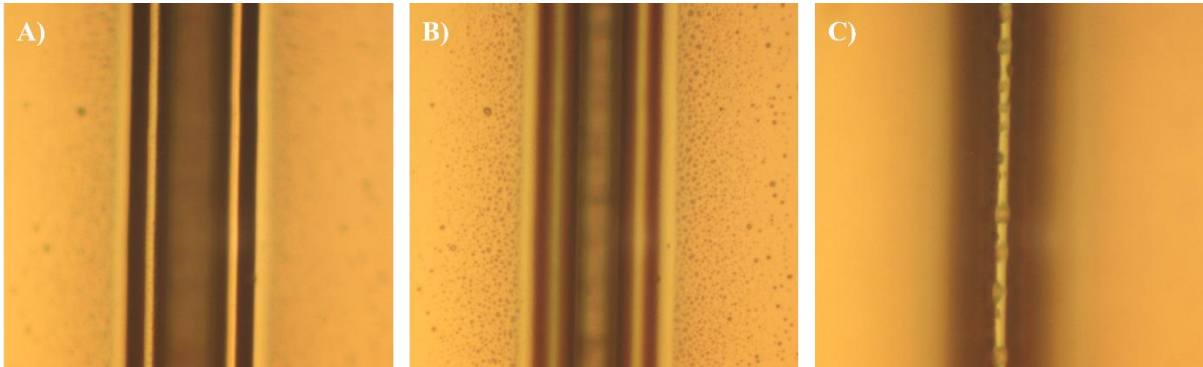


Figura 4.9 Grabado sobre celda, capturado con el software del microscopio AmScope. A) Vista superior fuera del canal en los bordes del grabado. B) Vista en plano normal sobre la celda. C) Vista inferior dentro del canal.

A continuación, se resumen los pasos seguidos para la obtención de la fabricación de grabados o canales positivos y negativos. El primer paso fue grabar sobre una celda por ablación y con las condiciones de potencia y distancia antes mencionadas. Posteriormente los grabados, ya con los canales fabricados por la ablación, se pasaron a una resina epóxica, barniz policromo de la marca Poliformas Plásticas S.A. de C.V. Por último, el grabado sobre la resina epóxica, ahora en forma de protuberancias, se pasó a PDMS, Sylgard 184, elastómero de silicona de la marca Dow Corning.

El grabado en la celda nos da un molde negativo, se puede apreciar como un canal. El grabado después de ser traspasado a la resina epóxica es un molde positivo, que se puede observar como una protuberancia. Cuando el grabado se pasa al PDMS se aprecia igual que el de la celda con un molde negativo.

Estos grabados por ablación láser tendrán un borde sobre el cráter como se detalla en la sección 2.4, por lo que para tomar las medidas variando el foco, se toma un plano normal de referencia, que es la superficie de los polímeros (Figura 4.10).

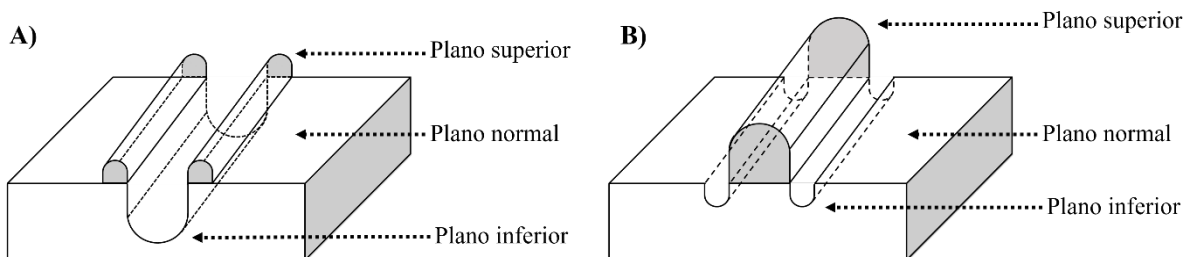
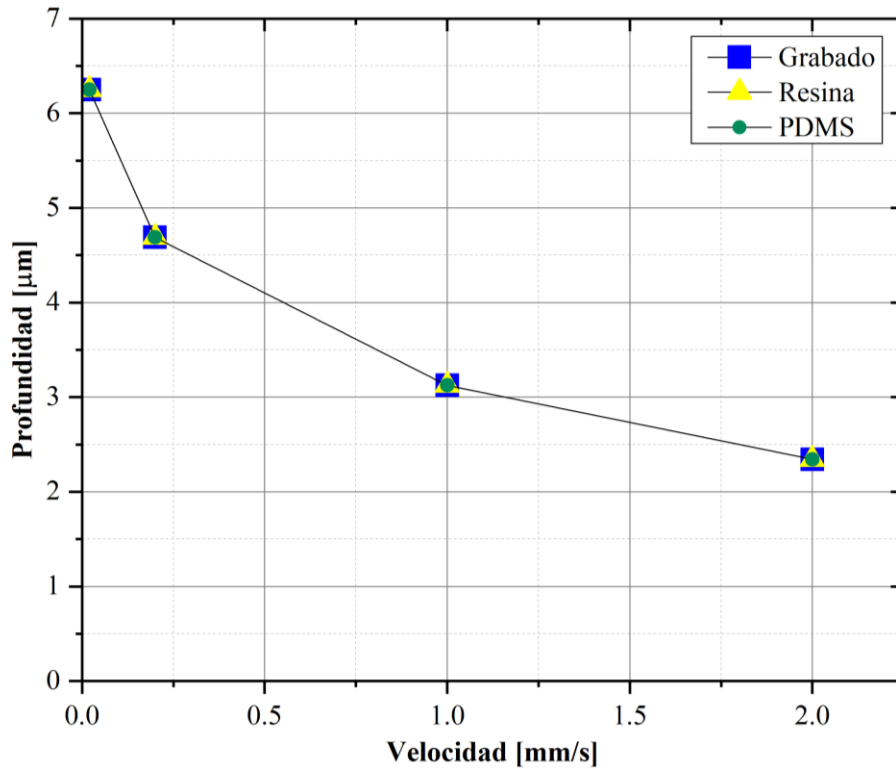


Figura 4.10 Planos de referencia en moldes de grabado. A) Molde negativo (celda y PDMS). B) Molde positivo (resina).

En el caso de los moldes negativos se mide del plano normal hacia el plano inferior, mientras que en el molde positivo se mide del plano normal al plano superior. Tener las medidas de los tres pasos de fabricación ayuda a visualizar con qué calidad se mantiene el grabado en cada paso.

Las medidas obtenidas se representan en la Gráfica 4.7, donde se puede observar que en los tres pasos del proceso se mantiene la calidad del grabado sin perder resolución.



Gráfica 4.7 Medidas de profundidad de ablación láser dependientes de la velocidad o tiempo de exposición.

5 DISEÑO DE BIOCHIP

El diseño de este biochip contempla un método de fabricación que reduzca los costos de fabricación convencionales respecto a los métodos basados en litografía. Este diseño requiere una mayor resolución comparado a la resolución que se puede obtener en un laboratorio universitario con la técnica de litografía por fotomáscara, menor a 100 micrómetros.

El reto general de este proceso es elaborar biochips que contengan microcanales con una entrada y salida (Figura 5.1). La entrada y salida deben estar comunicados mediante uno o varios canales entre ellos. La idea de tener una entrada y salida sería para depositar en la entrada células cancerosas y en la salida un quimioattractor. Todo esto para que estas células sean atraídas y migren de su punto de origen a otro donde haya mayor cantidad de quimioattractor. Esto no contempla una barrera física para mediar el paso de las células ni la velocidad de difusión, por lo que el tiempo de migración de las células puede estar limitado por el tiempo en el que el quimioattractor se difunda completamente en el medio.

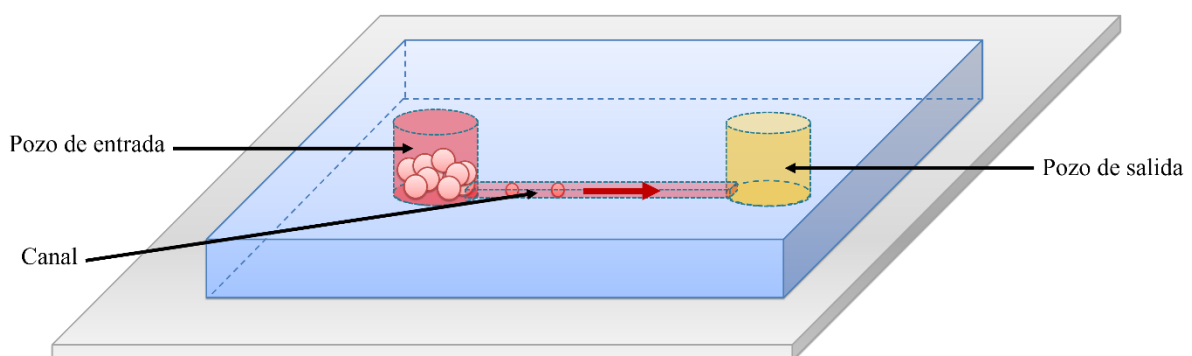


Figura 5.1 Esquema general del diseño de un biochip.. En rojo medio de cultivo de las células y en amarillo el quimioattractor. La flecha roja indica la dirección de migración celular.

El proceso general para el diseño de un biochip de migración celular consistió, de manera resumida, en las etapas de boceto y programación, manufactura, y producción en serie y pruebas de migración (Figura 5.2).

La etapa de boceto y programación consiste en el diseño preliminar que se quiere realizar. Este boceto incluye dibujos y la programación de los motores para realizar el grabado esperado. La manufactura es la etapa de fabricación de los biochips. Si esta etapa es completada correctamente se pasa a la etapa de producción en serie y se realizan experimentos de migración celular en ellos. En los casos en que no hubo señales de migración celular se procedió a

rediseñar nuevamente la estructura del biochip. En la Figura 5.2 se muestran de manera resumida las etapas de diseño.

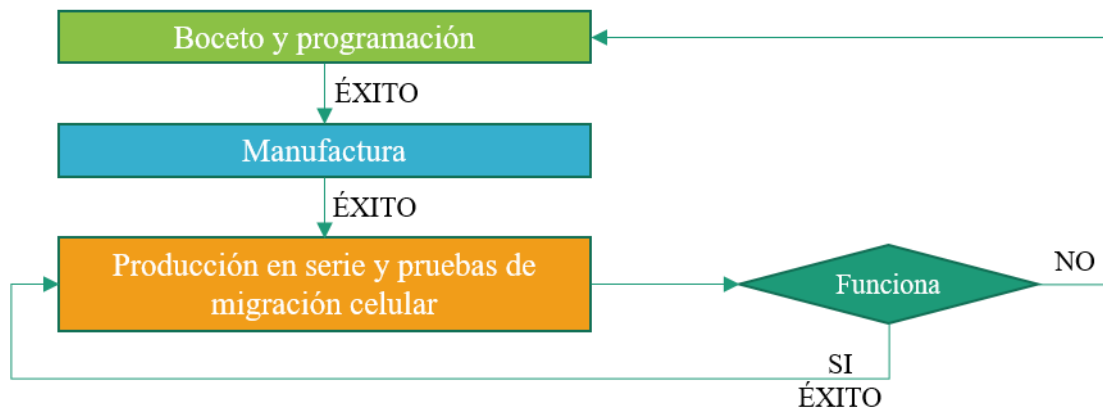


Figura 5.2 Etapas de diseño de un biochip de migración celular.

5.1 REQUERIMIENTOS GENERALES

El diseño de los biochips se basó en una serie de requerimientos biológicos para que las células realizarán migración celular. Los requerimientos biológicos definen el tamaño y la forma de la arquitectura del biochip, así como los materiales de uso.

El tamaño de los canales de migración está determinado por el tamaño de las células y el tamaño mínimo al que se contraen cuando realizan migración celular. Las dimensiones mínimas de los canales se establecieron en un área de $64 \mu\text{m}^2$, estas se basaron en el tamaño de los poros de las cámaras de Boyden que se utilizan en experimentos de migración celular. Ya que este tamaño de poro es usado en diversas líneas celulares para el estudio de migración, esta herramienta también se podría extender a diversos tipos celulares.

Las células empleadas fueron las SKOV3, ya que son comúnmente usadas para estudiar fenómenos de migración celular y el grupo de investigación tiene experiencia con estas. Una célula SKOV3 mide de manera transversal aproximadamente $20 \mu\text{m}$. Por lo tanto, para evitar migración por estímulos mecánicos es necesario que el área transversal del punto de partida de la migración sea mayor a $20 \mu\text{m}$.

Las células requieren ciertos nutrientes y condiciones físicas para vivir, por lo que el biochip debe contemplar el suministro de nutrientes y estar dentro de una incubadora. Las condiciones de cultivo en una incubadora son: humedad (95%), temperatura ($36 \text{ }^\circ\text{C}$) y oxigenación (95% de CO_2). Estas condiciones fueron consideradas en el diseño y selección de los materiales.

Para el suministro de nutrientes se propone una entrada en donde serán colocadas las células con su medio y una salida en donde será colocado el quimioattractor, las células no necesariamente deben llegar a la salida. Se propone suero fetal bovino (SBF) como quimioattractor para las células. Las células deben estar en medio sin SBF y en ayuno para poder migrar.

Durante el experimento de migración celular la cantidad de medio y quimioattractor debe ser suficiente para mantenerse a pesar de la evaporación ocasionada por la temperatura de la incubadora. Para evitar la evaporación se propone conectar en la entrada y salida unas puntas de micropipeta con sus respectivas soluciones. Se realizó un experimento en el que 10 μL dentro de una punta de micropipeta mantuvieron su volumen por más de 48 horas.

Los materiales de uso para los biochips deben ser transparentes para poder observar a través de ellos en un microscopio. Las células requieren adherirse a el material donde se cultivan para realizar la migración. Se seleccionaron portaobjetos como material de base ya que se ha mostrado que realizando un lavado previo del vidrio las células son capaces de adherirse sobre él, y para el cuerpo del biochip se seleccionó PDMS. En la Figura 5.3 se resumen los requerimientos necesarios para el diseño del biochip.

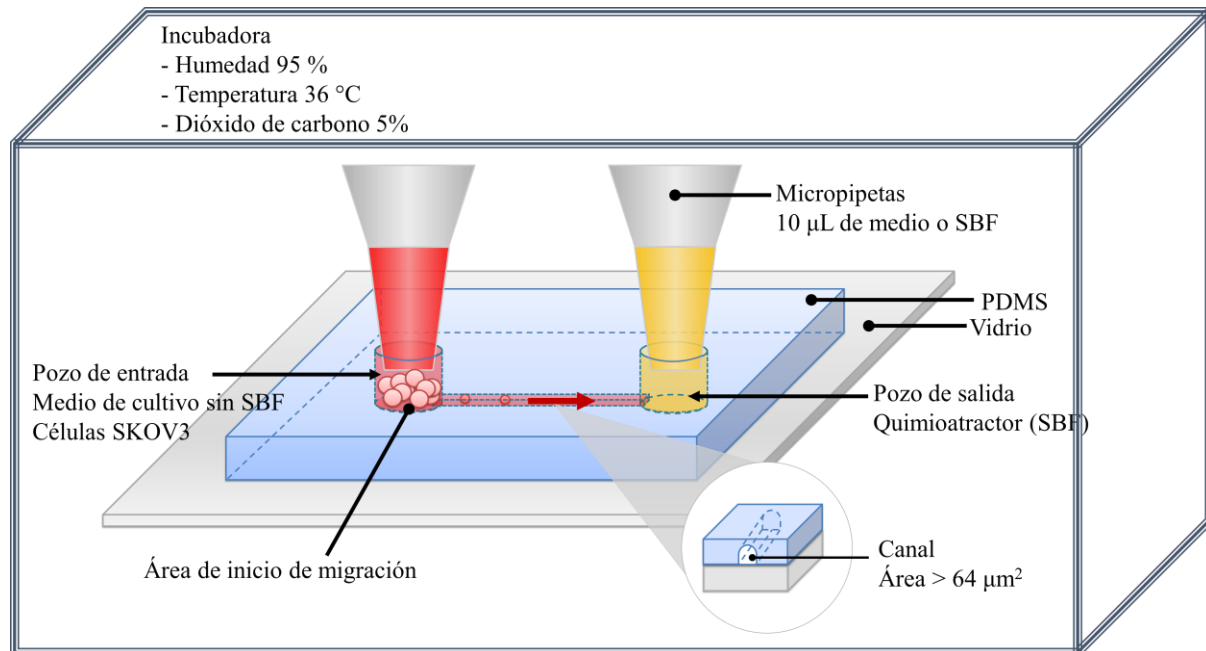


Figura 5.3 Diagrama de requerimientos para el diseño del biochip.

5.2 BOCETO Y PROGRAMACIÓN

La primera etapa del diseño de un biochip consiste en dibujar y esquematizar la configuración de los canales del biochip, posteriormente, programar la secuencia en MATLAB del movimiento de los motores y realizar una prueba de grabado (Figura 5.4).

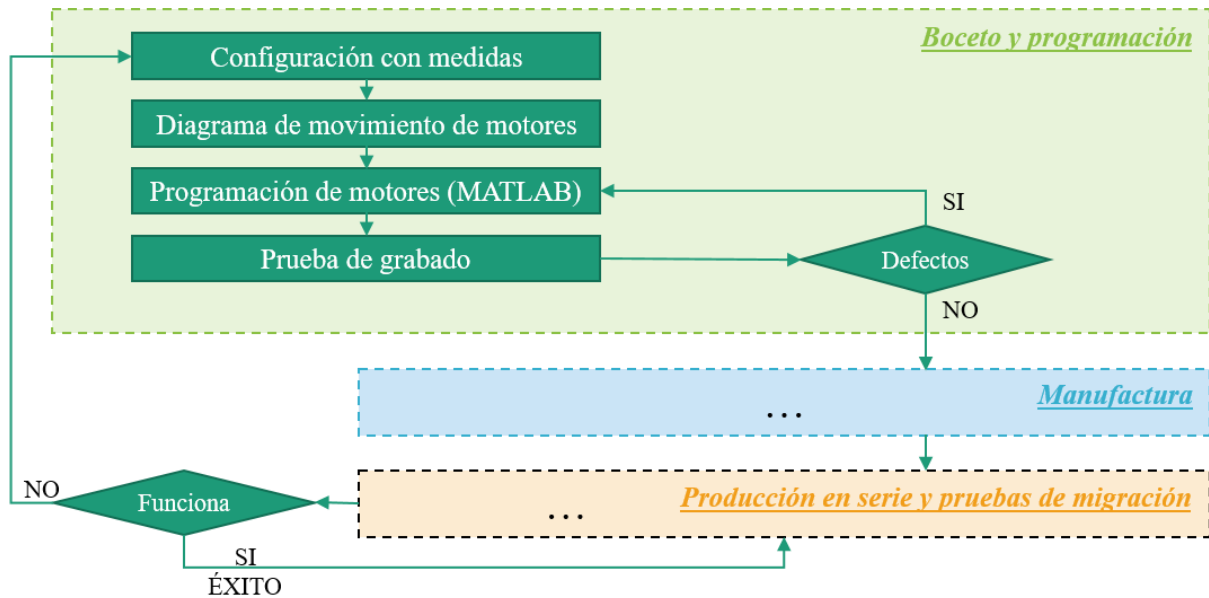


Figura 5.4 Etapa de diseño de un biochip.

En la sección 3 se detallan las limitaciones en la fabricación de los canales en función de las propiedades del material grabado (sección 4.2) y del arreglo óptico (sección 4.3). La forma transversal de los canales es de un medio círculo debido a la ablación láser y sus dimensiones mínimas son de 13 μm de diámetro y 7 μm de alto. Esto no da un área de aproximadamente 76 μm^2 , lo cual cumple el criterio de área de canal.

Considerando el tamaño mínimo del diámetro de un canal, el primer paso es dibujar la configuración de los canales con sus respectivas medidas. Posteriormente, se realiza un diagrama de movimiento de motores. Para realizar canales de más de 13 μm de diámetro se superponen los grabados hasta obtener el tamaño deseado (Figura 5.5).

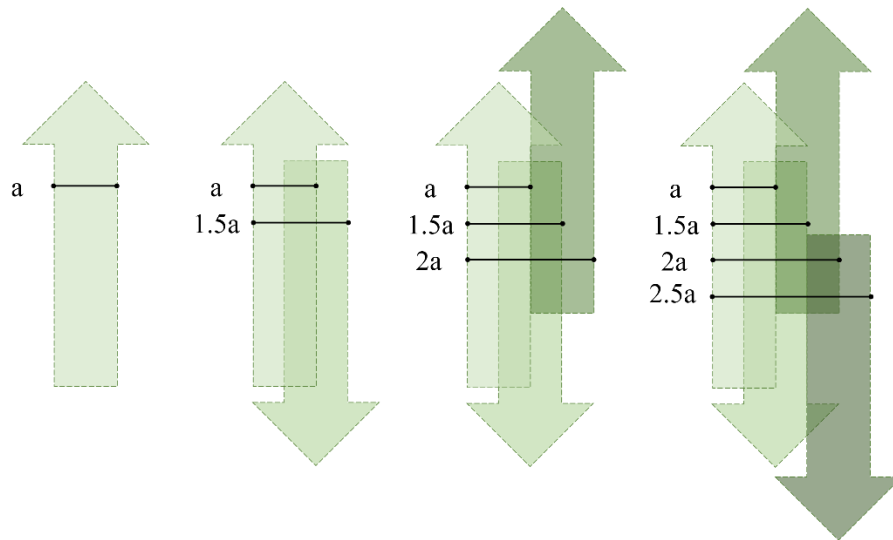


Figura 5.5 Proceso de grabado para canales de más de 13 μm . Las flechas indican la dirección del grabado.

Como se muestra en la Figura 5.5 para realizar líneas más grandes al tamaño del diámetro de grabado de dimensión a se requiere mover la siguiente línea a la mitad del diámetro del grabado anterior en una sola dirección. En este caso a corresponde a 13 μm de diámetro de grabado, para este ejemplo el grabado final $2.5a$ (lado derecho) sería de 32.5 μm .

Después de realizar el diagrama de movimientos se procede a programar en MATLAB la secuencia para realizar la configuración deseada. En este trabajo se realizaron dos configuraciones (Figura 5.6), su código de grabado se encuentra en el Anexo A.

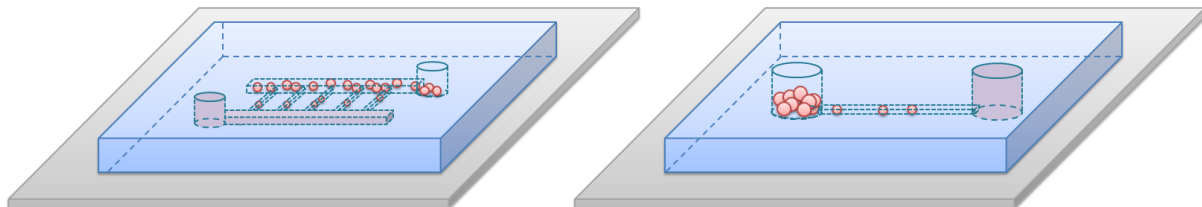


Figura 5.6 Configuraciones propuestas de biochips.

Esta etapa concluye con una prueba de grabado, es importante recordar que la óptica del sistema esta fija, y los motores mueven la muestra. El grabado se realiza en una celda de espectroscopia de poliestireno recubierta con pintura negra indeleble. Las celdas son pintadas ya que el poliestireno es transparente a la longitud de onda del grabado (532 nm).

Si el grabado tiene defectos de programación se regresa a revisar el código y corregir los errores para que se realice la configuración deseada. Un grabado sin defectos nos señala una programación correcta y podemos usar este código en la etapa de manufactura.

5.3 MANUFACTURA

En este trabajo se propone un proceso de manufactura y se explica detalladamente en la sección 6. La etapa de manufactura conlleva una serie de pasos desde el grabado con el láser hasta la prueba de ese grabado con fluidos (Figura 5.7).

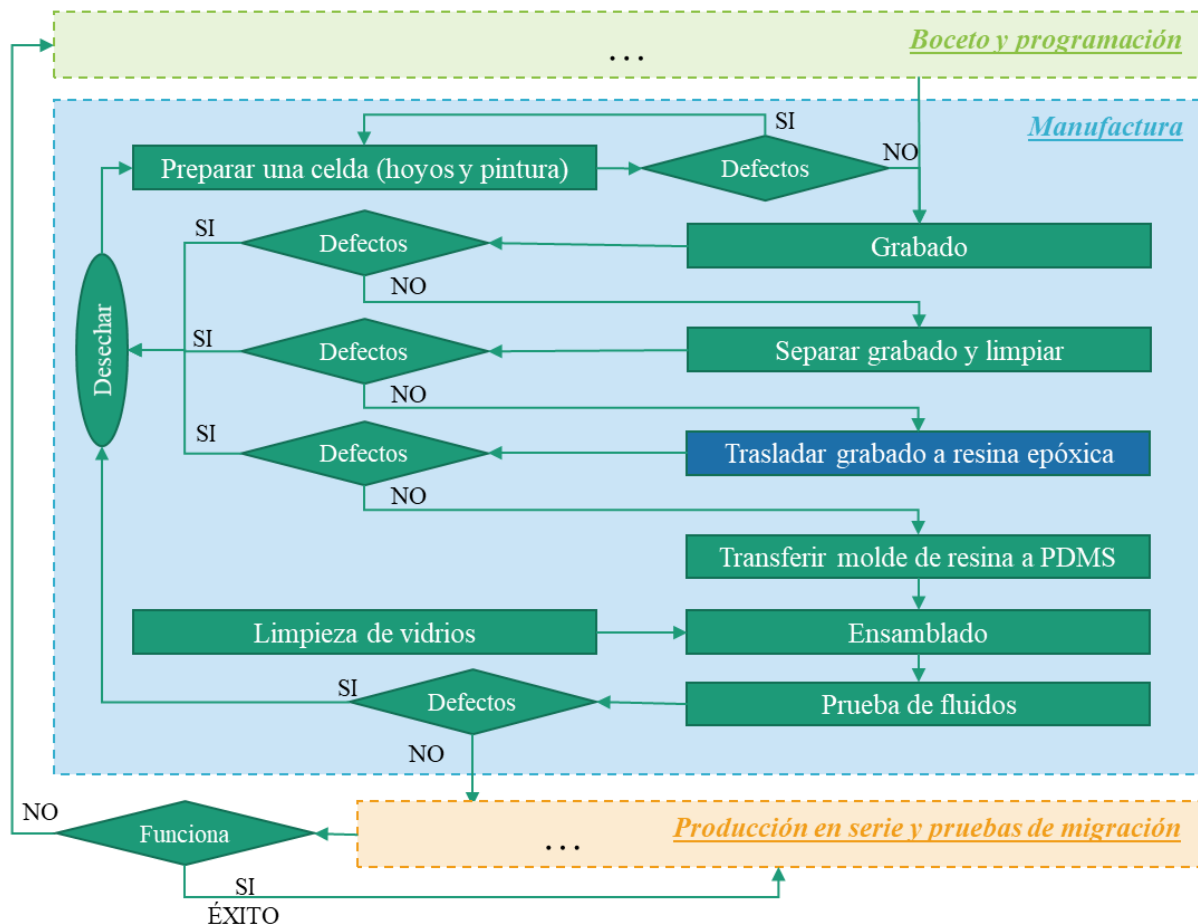


Figura 5.7 Etapa de manufactura. El recuadro azul representa el molde que se empleara para la fabricación en serie.

Antes de realizar el grabado se prepara una celda con hoyos que correspondan a la entrada y salida, y se pinta la sección a grabar. Se optó por entradas y salidas con forma circular para poder ensamblar una micropipeta en ellas. Al ser pozos de más de 0.5 mm se cumple el requerimiento de punto de inicio de la migración.

El grabado con el láser es realizado sobre la celda, posteriormente es separado de la celda y limpiado. El grabado es transferido a resina epóxica para obtener un molde de resina. Este molde de resina será empleado para producción en serie si el diseño pasa todas las pruebas del

proceso. Entre cada paso se verifica que no haya defectos mediante un microscopio. Los defectos incluyen canales obstruidos y canales sin entrada o salida.

El molde de resina es transferido a PDMS y después de su polimerización es ensamblado sobre un portaobjetos. El portaobjetos es previamente limpiado. Como paso final, al tener ensamblado el biochip se coloca en él un colorante para observar de manera visible si se llena correctamente por el paso del colorante. Si los canales no se llenan significa que el biochip está tapado y que sus moldes tienen imperfecciones. Habrá que repetir este proceso nuevamente hasta que el fluido sea uniforme en todo el biochip. En el caso de no existir defectos, este diseño, se pasa a la etapa de producción en serie.

5.4 PRODUCCIÓN EN SERIE Y PRUEBAS DE MIGRACIÓN CELULAR

El proceso de producción en serie es similar al proceso de manufactura después de realizar el grabado. Este proceso se realiza las veces que se quiera replicar el biochip, a diferencia del ensamblado en manufactura, a este se le agregan las puntas de micropipeta. Los defectos también son observados mediante un microscopio.

El biochip es llenado con células y quimioattractor, y posteriormente se espera 12 horas para observar si la migración ocurrió. Este es el punto decisivo para saber si la configuración propuesta funciona. Si no hay evidencias de migración el diseño se desecha y se regresa a la fase uno a proponer una nueva configuración. En caso de tener resultados positivos se puede seguir la producción en serie. Los pasos de esta etapa se resumen en la Figura 5.8.

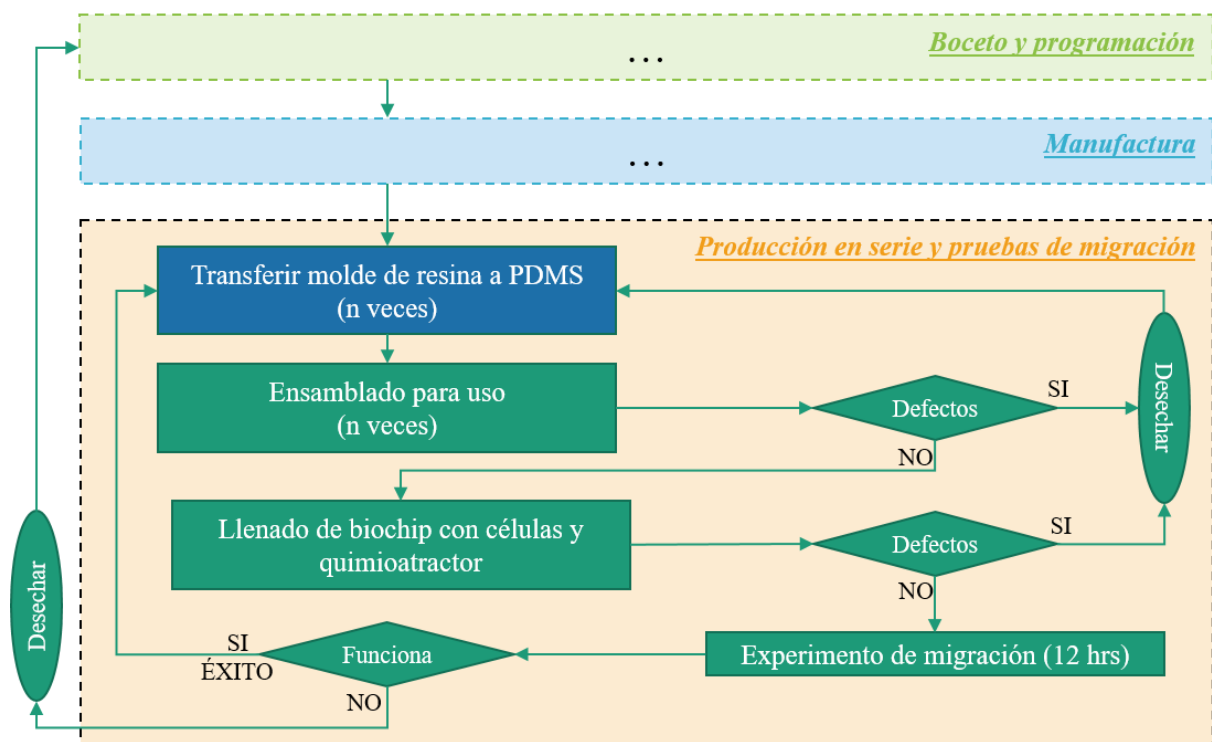


Figura 5.8 Etapa de producción en serie y pruebas de migración.

5.5 PROCESO GENERAL DE DISEÑO

El proceso de diseño cuenta con las tres etapas explicadas anteriormente. De forma global en la Figura 5.9 se puede apreciar el proceso completo.

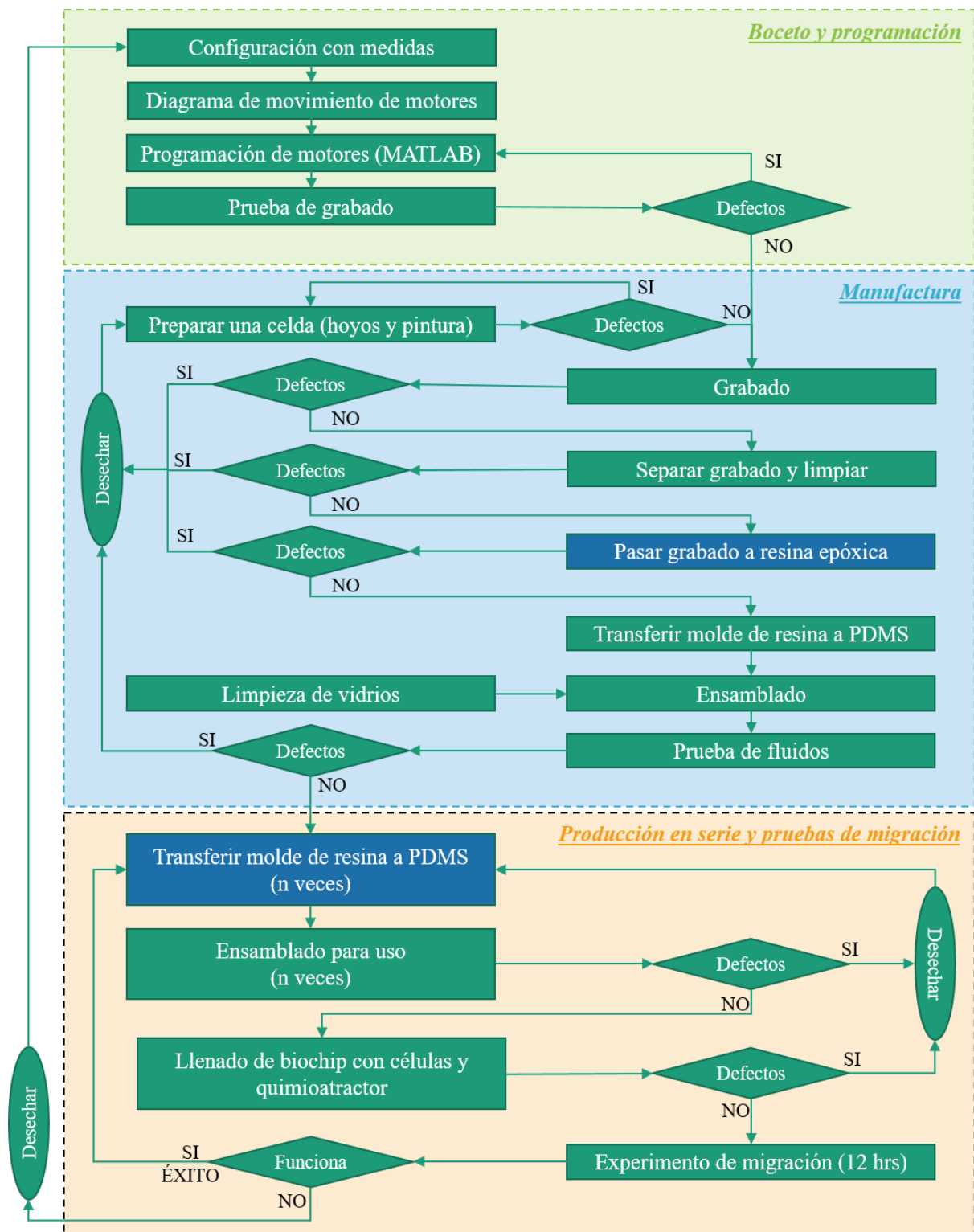


Figura 5.9 Proceso completo de diseño de un biochip de migración celular.

6 FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOCHIPS

La metodología de fabricación se resumen en la Figura 6.1. El primer paso de fabricación es la ablación láser mediante un láser verde continuo a 532 nm con una potencia de entrada de 1 W. Los grabados tienen dimensiones de hasta 15 μm con buena calidad. Para conveniencia en este trabajo los grabados serán llamados como un molde negativo, por ser huecos en una superficie.

Después de realizar el grabado láser se pasa a la realización de un molde positivo con una resina epóxica. Por último, se realiza nuevamente un molde negativo en PDMS. El grabado en resina epóxica es un molde que permite obtener biochips con el mismo patrón en PDMS. Ya que el grabado está en PDMS se coloca sobre un sustrato de vidrio previamente limpiado. Los chips están ensamblados y es posible realizar pruebas con fluidos para verificar que con ese grabado se obtienen canales que permitan el flujo y no estén bloqueados. Después de que se verifica el flujo se puede usar ese molde para realizar ensayos de migración celular.

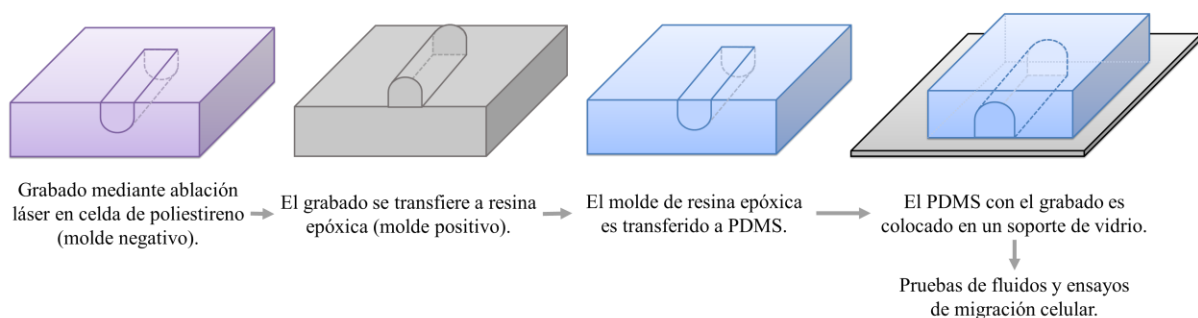


Figura 6.1 Esquema de proceso general de fabricación de biochips.

6.1 GRABADO

Las celdas de espectroscopia fueron pintadas con marcador indeleble (Figura 6.2), con base aceite color negro, para aumentar la absorción del material y permitir la ablación láser.



Figura 6.2 A) Celdas de espectroscopia de poliestireno. B) Pintado de celda con marcador negro. C) Celda pintada para realizar dos grabados.

Después de pintar las celdas fueron perforadas con un taladro (Dremel) mediante una punta de tungsteno tipo fresa para grabar. Se eligió esta punta ya que se observó que permitía que los agujeros tuvieran menor cantidad de residuos (Figura 6.3). Se realizaron pruebas con una fresa de 0.8 mm y 1.2 mm, dependiendo el tamaño de pozo requerido. Estos agujeros serán los pozos de entrada y salida. Se optó por realizar los pozos antes de los canales ya que cuando se realizan primero los canales en el momento de hacer las perforaciones, correspondientes a los pozos, los canales se tapaban con la materia suelta generada por la perforación.

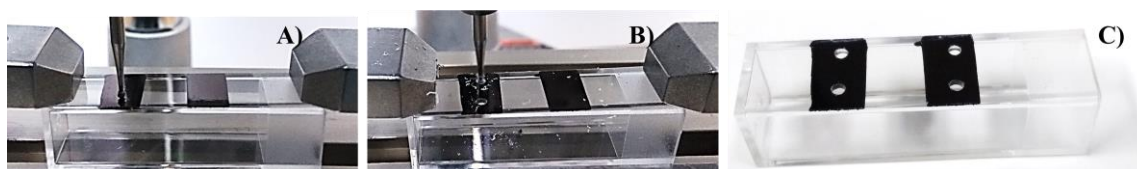


Figura 6.3 A) y B) Proceso de perforación de celdas con un Dremel. C) Celda perforada con entradas y salidas para dos grabados.

Posterior a realizar la perforación se usó la punta de un cautín ligeramente caliente, lo suficiente para ablandar la celda de poliestireno, pero sin llegar a fundirlo. En nuestro caso fue suficiente 10s de calentamiento a la mínima temperatura del cautín. Con la punta del cautín caliente se presionó sobre los pozos para hacer uniforme la orilla (Figura 6.4). La uniformidad de los pozos se verificó con el microscopio AmScope (Figura 6.4) y solo se procedió a grabar en los pozos en los que se había logrado una uniformidad.

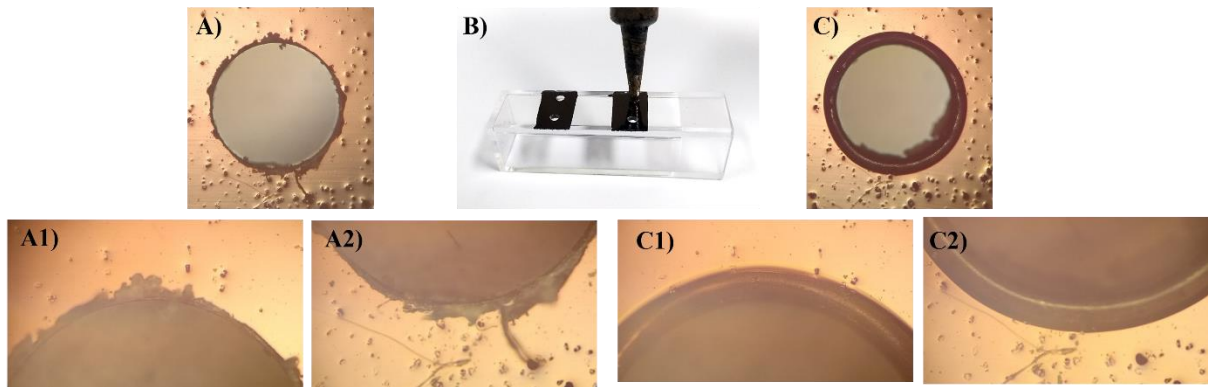


Figura 6.4 Ablandamiento de bordes de pozos. A) Pozo perforado sin ninguna modificación, A1 parte superior del pozo, A2 parte inferior del pozo. B) Proceso de ablandamiento de bordes para quitar imperfecciones. C) Pozo después de ablandar bordes, C1 parte superior de pozo ablandado, C2 parte inferior de pozo ablandado.

Para realizar los grabados mediante el láser con el sistema óptico, este sistema fue alineado previamente y se esperó 40 minutos a que el láser se estabilizara antes de comenzar a grabar. El láser fue acoplado a un arreglo óptico compuesto por dos iris, dos espejos y una lente, este arreglo óptico se detalla en la sección 4.1. Las condiciones de grabado son 1 W de entrada, antes del arreglo óptico, con un diámetro de 0.78 mm del haz del láser después del último iris y una potencia de 10 mW en ese punto. Después de la lente la potencia es de 9.5 mW y bajo esas condiciones, el grabado en el foco de la lente es de 13 μm de diámetro en promedio. Las celdas en las que se realizaron los grabados fueron colocadas en una montura a la medida hecha con impresión 3D, esta montura se colocó sobre los motores para permitir su movimiento (Figura 6.5).

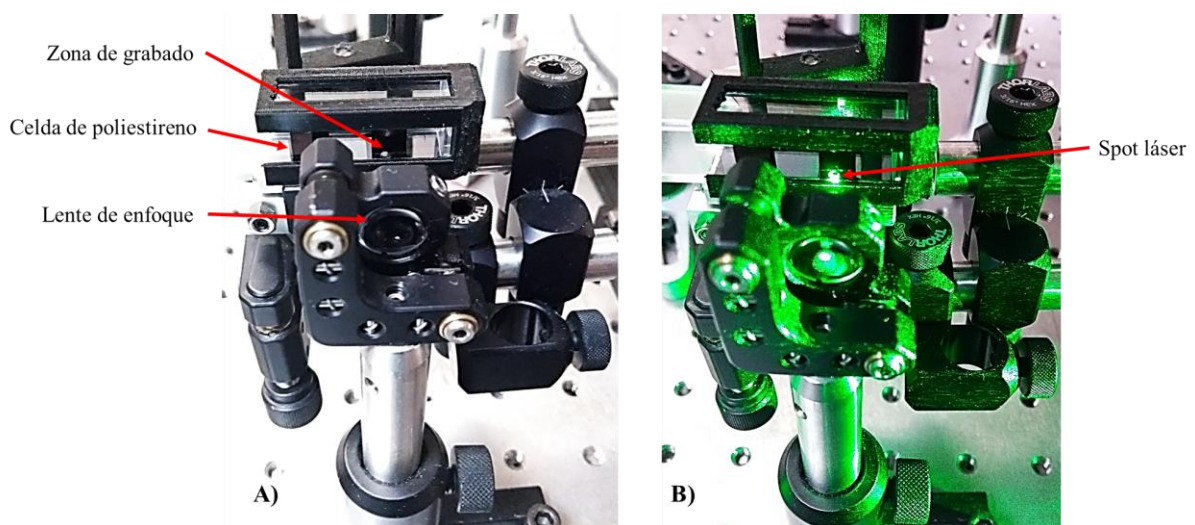


Figura 6.5 Configuración del sistema de grabado de la celda de poliestireno. A) Láser apagado. B) Celda en proceso de grabado.

Los motores fueron controlados por MATLAB para fabricar diferentes configuraciones del biochip. Todos los grabados se realizaron en el foco para mantener la profundidad del grabado.

Después de realizar el grabado por ablación láser, con ayuda del microscopio AmScope, se verificó que la ablación láser haya retirado material del borde de los pozos. Con esto se permite que los canales estén conectados entre sí. Solo los grabados que pasaban esta prueba de calidad pasaron a la siguiente etapa (Figura 6.6). Estos moldes son utilizados como un molde negativo ya que tienen los canales del grabado.

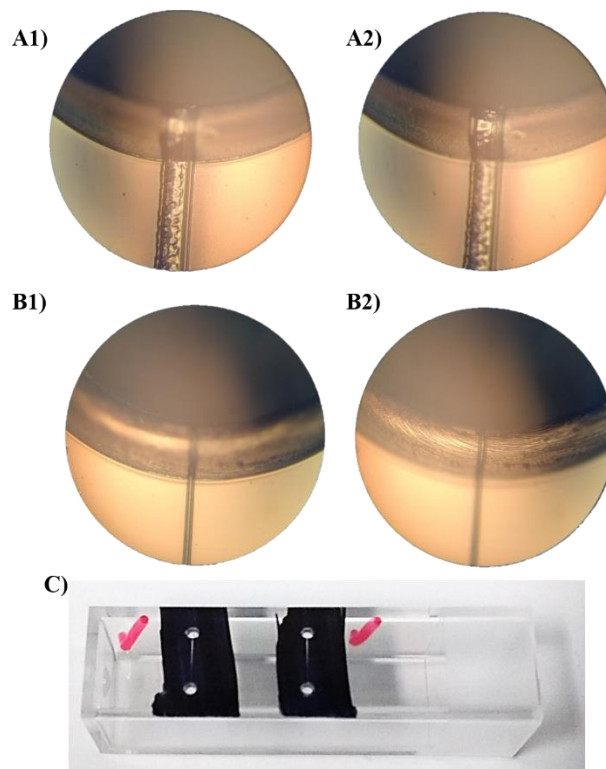


Figura 6.6 A1, A2) Grabado de $100\ \mu\text{m}$ atravesando el pozo, imágenes tomadas en diferente foco del microscopio. B1, B2) Grabado de $13\ \mu\text{m}$ atravesando el pozo, imágenes tomadas en diferente foco del microscopio. C) Celda con grabados que conectan la entrada y salida de los pozos.

Los moldes grabados son cortados con ayuda del Dremel y un disco de diamante. Posteriormente fueron limpiados con isopropanol al 100% para retirar la pintura. Posteriormente fueron lavados en isopropanol al 30% mediante sonicación para eliminar los restos de pintura (Figura 6.7). Ya que los grabados están limpios y secos fueron colocados en una atmósfera de acetona.

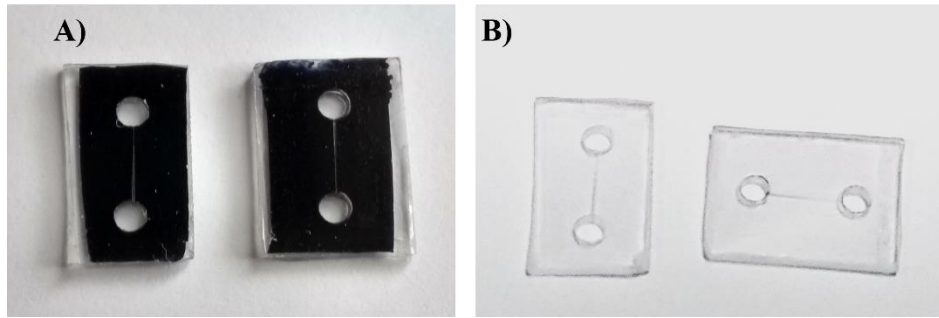


Figura 6.7 A) Grabados cortados. B) Grabados limpios.

Los grabados fueron expuestos en una atmósfera de acetona para mejorar la uniformidad de la superficie del grabado. Para realizar esta tarea se utilizó un sistema (Figura 6.8) en el cual está compuesto por un frasco de vidrio. Este frasco tiene en el fondo un papel absorbente con acetona y fue colocado boca abajo sobre una superficie con agua. En una base por encima de una superficie con agua se colocan los grabados y al cerrar el sistema con el frasco estos quedan dentro de él. La acetona se va evaporando a temperatura ambiente y queda atrapada entre el frasco y el recipiente con agua. La exposición a la atmosfera con acetona en este sistema se realizó abriendo y cerrando el sistema, para evitar la acumulación excesiva de vapor de acetona, ya que cuando esto sucede el polímero del grabado se deforma completamente. El tiempo de exposición fue de 6 minutos, y se dividió en 6 partes, un minuto en atmósfera de acetona y uno sin atmósfera de acetona, así consecutivamente hasta tener 6 minutos en atmósfera de acetona. Al final de este proceso se observa al microscopio que no se hayan generado grietas que atraviesen los grabados ya que eso ocasiona fugas del fluido.

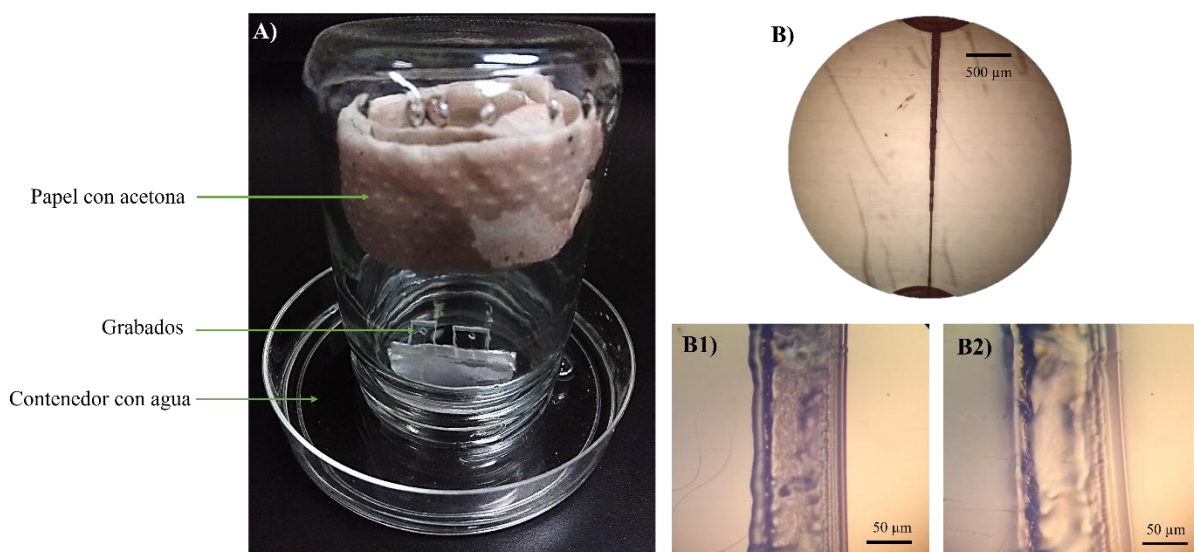


Figura 6.8 A) Configuración experimental de atmósfera con acetona. B) Grabado, B1 grabado antes de ponerlo en atmósfera con acetona, B2 grabado después de exponerlo a atmósfera con acetona

6.2 MOLDE POSITIVO

El siguiente paso es pasar el grabado a una resina epóxica (Figura 6.9). Para esto los grabados fueron lavados con isopropanol al 30% mediante sonicación y secados con aire comprimido, posteriormente se pegaron con cinta doble cara a un primer recipiente con la parte del grabado hacia arriba para evitar que floten antes de que termine la polimerización.

En un segundo recipiente por separado se prepara la resina epóxica comercial (barniz policromo marca Poliformas Plásticas), se mezcló uniformemente compuesto A con compuesto B y un compuesto de solventes (quita burbujas) de la misma marca en una proporción 50:50:50. Estos reactivos de la marca Poliformas Plásticas son de formulación desconocida por ser productos comerciales.

La mezcla de solventes permite que el polímero final tenga mejores propiedades mecánicas al ser manipulado, como flexibilidad y resistencia a la deformación. La resina epóxica ya mezclada se vacía en el recipiente con los grabados y se lleva 20 minutos a vacío para sacar la mayor parte de las burbujas.

Posteriormente, se deja polimerizar a temperatura ambiente por 6 horas como lo indica el fabricante sobre una superficie nivelada. Pasado el tiempo de polimerización la resina epóxica es desmoldada y con ayuda de una navaja se corta alrededor del molde de los grabados y con precaución de no romperlo se separa la parte del grabado de la resina epóxica. Por último, al nuevo molde de resina epóxica se le cortaron los excedentes en la orilla. Estos moldes de resina epóxica son moldes positivos, ya que presentan las protuberancias y formas correspondientes a los grabados.

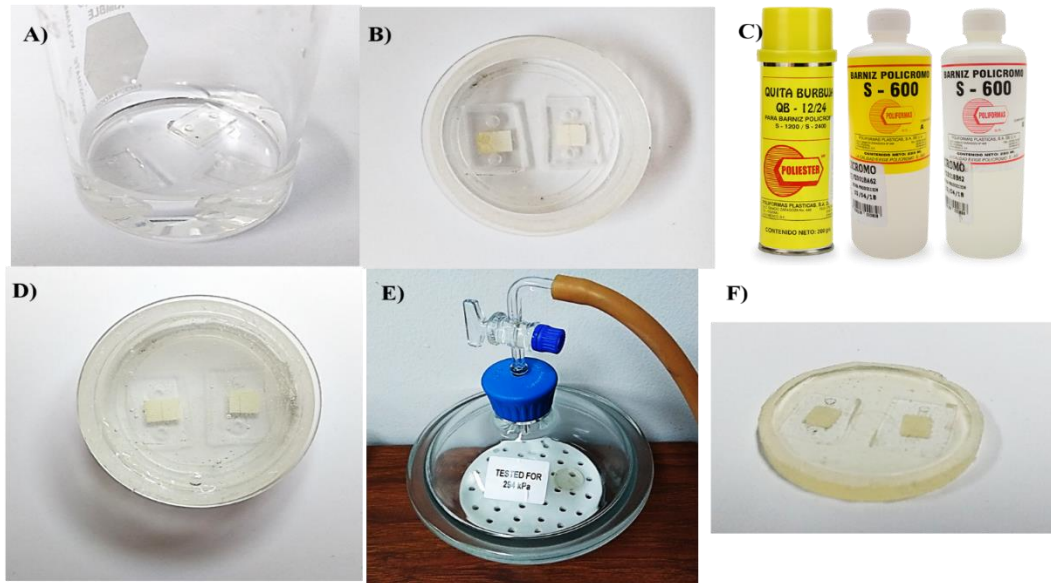


Figura 6.9 A) Lavado de moldes de poliestireno en isopropanol. B) Inmovilización de moldes. C) Reactivos empleados. D) Grabados sumergidos en resina epóxica. E) Remoción de burbujas mediante vacío. F) Moldes de resina epóxica.

6.3 MOLDE A PDMS

Para realizar los biochip en PDMS, los moldes de resina epóxica (Figura 6.10), fueron lavados en isopropanol al 30% mediante sonicación y secados con aire comprimido. Posteriormente fueron colocados en un recipiente previamente limpiado con la parte del grabado hacia arriba. Por separado se preparó el PDMS de la marca Corning. Este fue mezclado uniformemente en proporción 10:1 de monómero y catalizador, correspondientemente como lo indica el fabricante. Posteriormente se coloca el PDMS sobre el recipiente con los moldes y se lleva a vacío durante 40 minutos. El vacío se detiene cada 10 minutos para empujar los moldes de resina epóxica al fondo ya que no están fijos. Finalmente se deja polimerizar a temperatura ambiente durante 20 horas sobre una superficie nivelada.

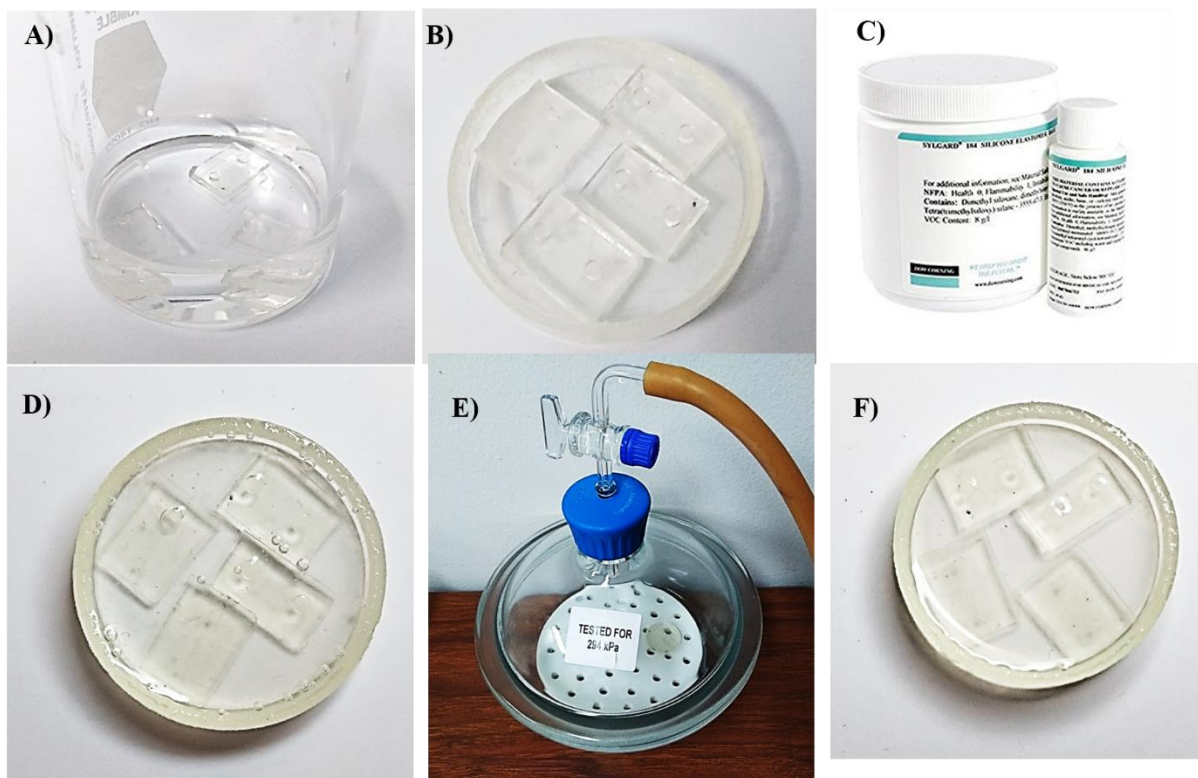


Figura 6.10 A) Lavado de moldes de resina epóxica en isopropanol. B) Moldes de resina epóxica. C) Reactivos empleados. D) Moldes de resina epóxica sumergidos en PDMS. E) Remoción de burbujas mediante vacío. F) Estructura de biochip en PDMS polimerizado.

El soporte de los biochips son portaobjetos de vidrio, los cuales fueron limpiados con papel óptico e isopropanol. Los portaobjetos fueron lavados con metanol grado reactivo en sonicación durante media hora. Por ultimo fueron lavados con agua ultra pura (Mili-Q) durante 15 minutos cambiando el agua cada 5 minutos. Los portaobjetos fueron mantenidos en agua Mili-Q hasta ser utilizados.

El proceso de ensamblado se realizó dentro de una campana de flujo laminar. Los portaobjetos fueron secados con aire comprimido. Con ayuda de una navaja se cortaron los moldes de PDMS alrededor del molde de resina y se cortaron las entradas y salidas de los biochips, sin tocar la parte donde están los canales. Los moldes de PDMS se colocan sobre el vidrio y se cortan los excesos de PDMS presionando la muestra para que quede fijo por adhesión estática (Figura 6.11).

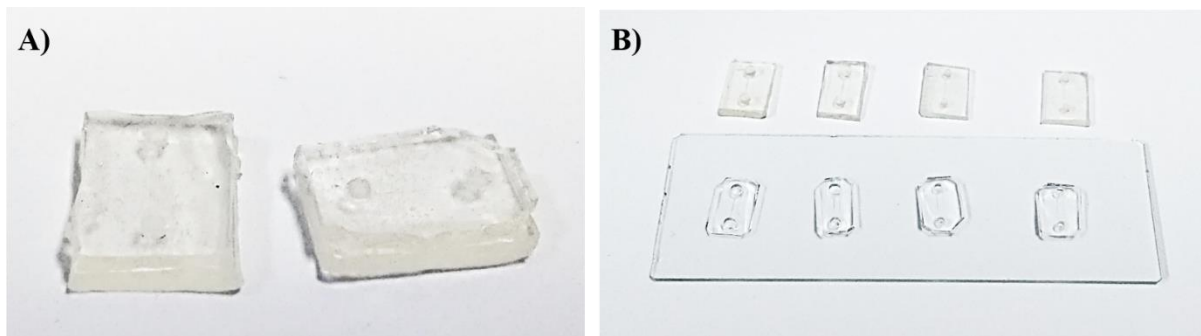


Figura 6.11 A) Moldes de resina epóxica con PDMS antes de desmoldar. B) PDMS ensamblado en sustrato de vidrio.

En los chips ensamblados se realizaron pruebas para demostrar y saber que fluido entraba en los canales. Esto se realizó agregando 1-2 μL de azul de bromofenol diluido en PBS a la entrada de cada canal (Figura 6.12). Se observó el paso del fluido con un microscopio invertido (Olympus CKX41) y solo se marcaron los moldes funcionales, identificando los canales de PDMS que permitían el paso del fluido en todo el canal.

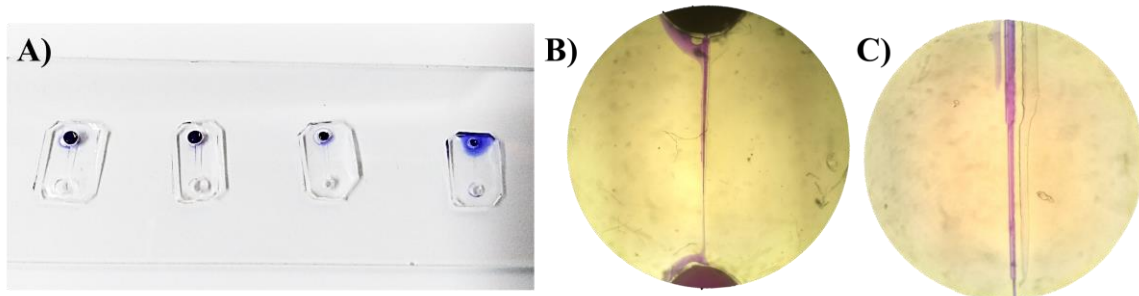


Figura 6.12 A) Pruebas de fluidos, se puede observar que el último del lado derecho se inundó un pozo rompiendo la barrera del canal. B) Canal con entrada y salida accesibles para el fluido. C) Canal con paso de fluido correcto.

6.4 ENSAMBLADO DE BIOCHIP

Los moldes que permitieron el paso del fluido se reprodujeron nuevamente en PDMS y se llevó a cabo la misma metodología de ensamblaje mencionada en el punto anterior. Ya que fueron ensamblados se les colocó una punta de micropipeta de 10 μL en la entrada y salida de los canales (Figura 6.13). Dependiendo del tamaño del pozo de entrada y salida la punta fue cortada para quedar a la medida entrando a presión para que no se cayera.

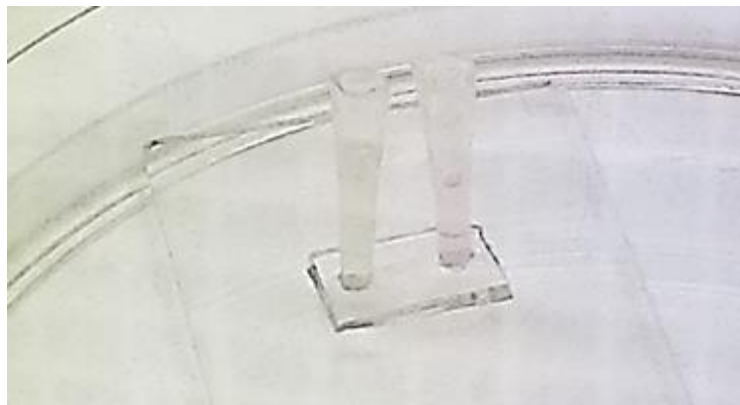


Figura 6.13 Biochip ensamblado con puntas en los pozos de entrada y salida de fluido.

Esta punta fue de utilidad para mantener un volumen constante de fluido dentro de los canales, ya que dentro de ellas se colocaron 10 μL de medio de cultivo y quimioattractor en el pozo de entrada y salida, respectivamente, por lo cual permitió que a pesar de la evaporación dentro de la incubadora se mantuvieran con fluido los pozos y canales.

7 MANEJO DE BIOCHIPS

Los biochips de manera general constan en un pozo de entrada, uno o varios canales y un pozo de salida. Un biochip ensamblado se compone de un portaobjetos de vidrio tratado para facilitar que las células se adhieran, sobre el portaobjetos un sistema de canales conectados por dos pozos en PDMS, los pozos de entrada y salida tienen una punta de micropipeta para mantener con fluido los canales y evitar la evaporación (Figura 7.1).

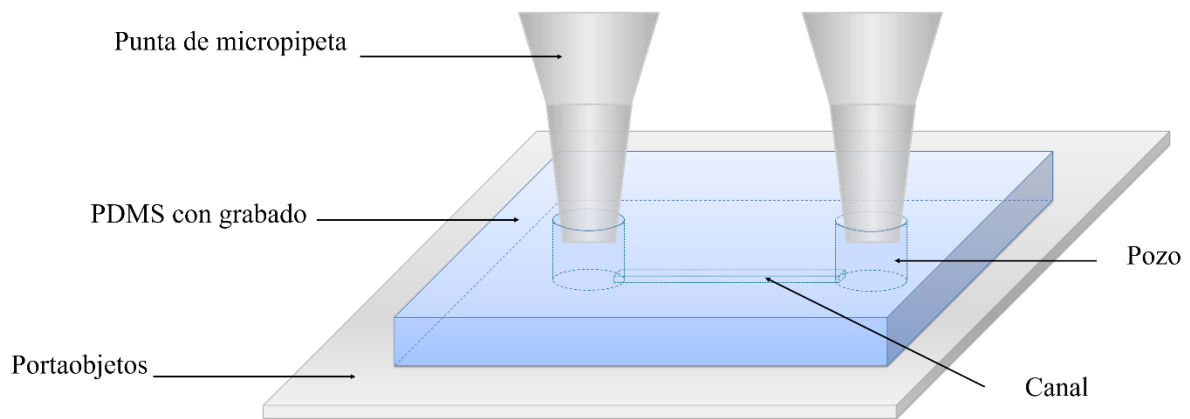


Figura 7.1 Partes de un biochip ensamblado.

El PDMS está pegado al portaobjetos por adhesión, por lo que se tienen que manejar con cuidado para no despegarlos y mantener el sistema sin fugas. Las puntas están unidas a los pozos por presión, por lo que pueden retirarse y volver a colocarse. Después de ensamblar los biochips es posible realizar los estudios de migración celular agregando en ellos células cancerosas y un quimioattractor.

7.1 EVALUACIÓN CON CULTIVO DE CÉLULAS

En este trabajo se emplearon células SKOV3 de carcinoma ovárico. Estas células fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) acondicionado con suero fetal bovino (SBF) al 10% y la mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina al 1%. El RPMI permite el crecimiento de una gran variedad de células de mamíferos en suspensión o monocapa, usa un sistema tampón de bicarbonato y su pH normal es de 8, pero se ajusta a 7.4 por adición de NaOH. Las células fueron cultivadas en cajas Petri para cultivo de tejidos de 3 cm de diámetro, a una temperatura controlada de 37°C en una atmosfera de 95% aire y 5% de dióxido de carbono, y humedad del 95%.

Para depositar las células en los biochips, las células al 80 – 90 % de confluencia fueron despegadas de la caja Petri por la acción proteolítica de la tripsina, para esto se adicionaron 500 µL de la enzima y se incubaron por 8 minutos a 37 °C. Una vez que se observó que estuvieran en suspensión, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de medio RPMI sin suero conteniendo 1 µL de CellTracker CM-DiI (Thermo Fisher Scientific), un colorante fluorescente rojo y se dejaron incubar durante 3 horas. El RPMI sin suero sirvió como medio de ayuno, mientras que el CellTracker tiñe las células para ser visualizadas por microscopía de fluorescencia.

Posteriormente se tomaron 2000 células y se colocaron en el pozo de entrada de un biochip sin puntas en los pozos. En el pozo de salida se colocaron 2 µL de SBF como quimioattractor. En la punta del pozo de entrada se colocaron 10 µL de medio RPMI sin acondicionar, y posteriormente se colocó la punta a presión, en el pozo de salida se colocaron 10 µL de SBF. La metodología para llevar a cabo este proceso se esquematiza en la Figura 7.2.

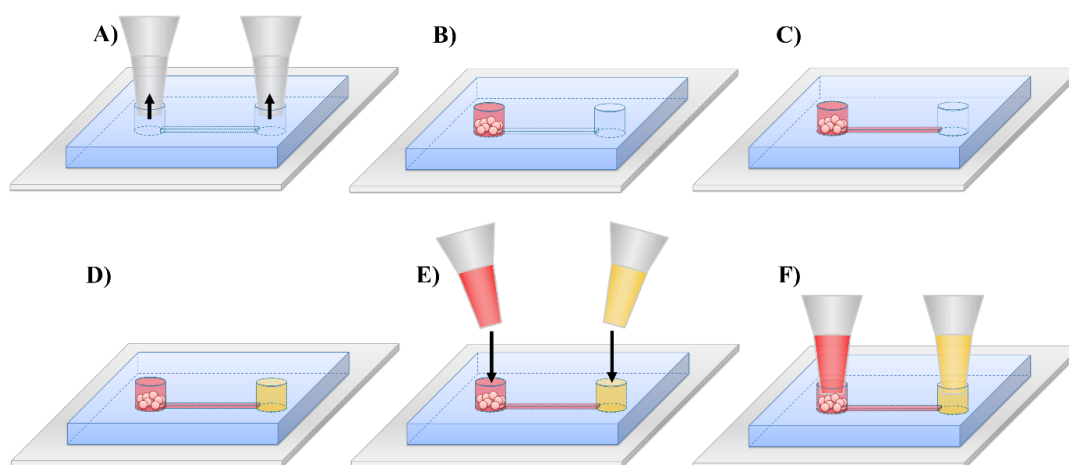


Figura 7.2 Esquema de la metodología para migración celular en biochips. A) Retirado de puntas de micropipeta. B) Se colocaron células en uno de los pozos en RPMI sin suero (rojo). C) El canal de migración

se llenó con RPMI. D) En el otro pozo se colocó SBF (amarillo). E) Una de las puntas de micropipeta fue llenada con RPMI sin suero y la otra con SBF. F) Se colocaron las puntas en su pozo correspondiente y se incubaron por 12 horas.

Posteriormente, los biochips se dejaron incubar durante 12 horas en una caja de Petri (Figura 7.3).

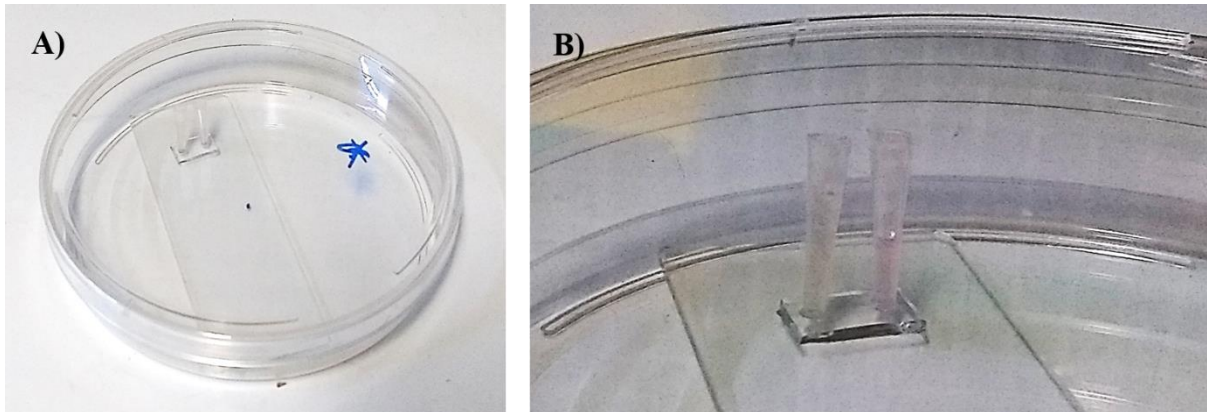
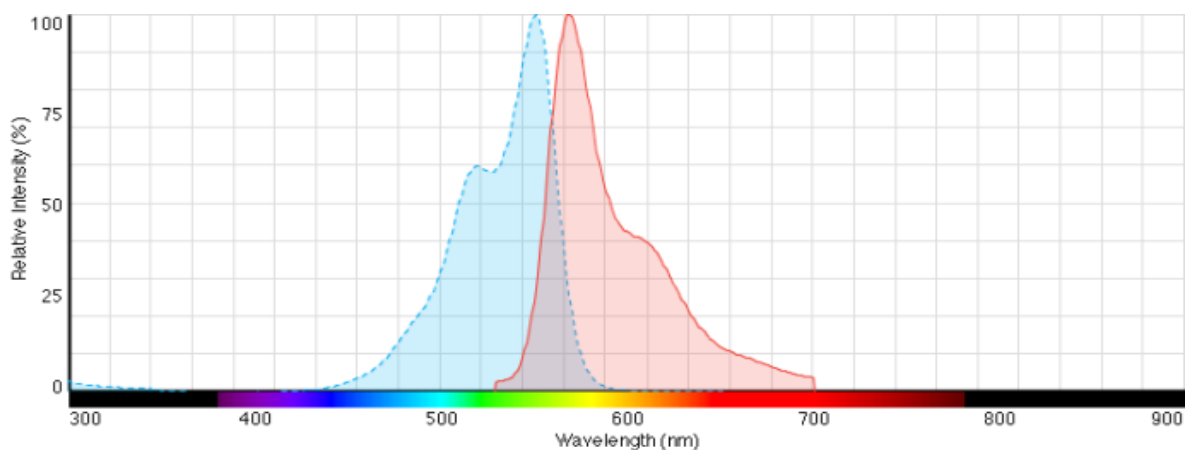


Figura 7.3 Biochip ensamblado con células. A) El biochip fue metido en una caja Petri y posteriormente en la incubadora. B) Acercamiento al biochip.

El CellTraker CM Dil con el que se tiñó el citoplasma de las células tiene su máximo de excitación en 553 nm, mientras que su máximo de emisión es en 570 nm, esto lo podemos observar en la Gráfica 7.1. Por lo que los biochips fueron observados en un microscopio invertido Olympus CKX41 con un filtro verde y un detector rojo para observar la fluorescencia de las células (Figura 7.4).



Gráfica 7.1 Espectro de fluorescencia de CellTraker CM Dil. En azul excitación. En rojo emisión.

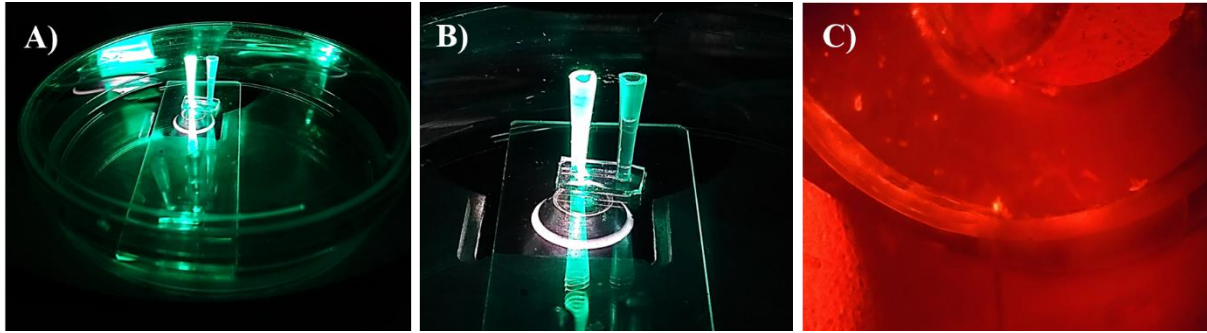


Figura 7.4 Biochips observados con un de un filtro de luz verde. A) y B) Biochips colocados en microscopio Olympus. C) Imagen obtenida con el microscopio Olympus.

Las células en el biochip fueron observadas 12 horas después de su incubación. El biochip empleado en esta etapa del proceso fue el de un canal de 12 μm de diámetro y 7 μm de profundidad. El resultado obtenido después de las 12 horas fue una aglomeración de células a la entrada del canal, como se observa en la Figura 7.5.

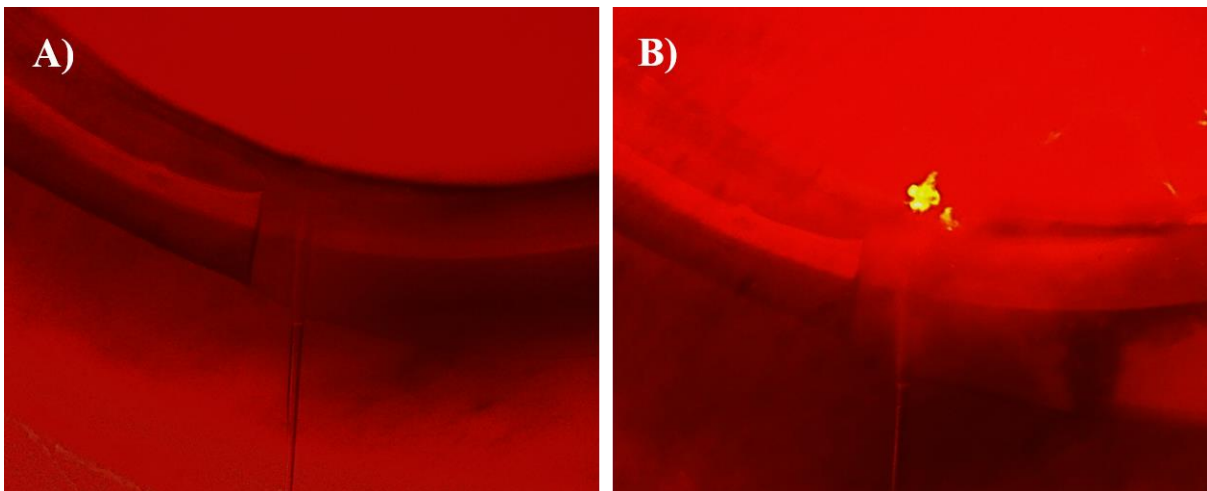


Figura 7.5 Imagen de biochip con canal de 12 μm tomada con microscopio Olympus. A) Imagen sin excitación. B) Imagen con excitación en rojo para observar la fluorescencia de las células.

8 RESUMEN DE RESULTADOS

En resumen, el desarrollo de un biochip para migración celular representó varios retos ya que no se había realizado un trabajo similar en el grupo de investigación. Este trabajo realizó en cuatro partes principales:

- Caracterización del láser: caracterización de un láser continuo de estado sólido.
- Diseño de biochip: diseño del biochip en base a los parámetros biológicos.
- Fabricación de biochips: desarrollo de una metodología de fabricación a bajo costo de biochips mediante ablación láser.
- Manejo de biochips: desarrollo de metodología para depositar las células en los biochips.

8.1 RESULTADOS POR CAPÍTULO

8.1.1 CARACTERIZACIÓN DEL LÁSER

- Mediante el arreglo óptico, compuesto por dos lentes y dos iris acoplados a un láser verde continuo 532 nm, se logró disminuir el diámetro del haz de 1 cm hasta 13.5 μm manteniendo un haz gaussiano.
- El umbral de daño láser para las celdas de poliestireno fue encontrado a una potencia superior a 2 mW, para valores superiores a esta potencia los grabados cambian su estructura haciendo marcas, pero se observan completamente definidos hasta después de 8 mW.
- El láser fue caracterizado en función del material de ablación, se realizaron grabados variando el tiempo de exposición y la distancia al foco de la lente. Se estableció el diámetro ideal de grabado en el foco, ya que la profundidad en este punto es máxima.
- El diámetro mínimo del grabado de canales es de 13.5 μm y la profundidad de grabado de 7 μm . Con estos valores se conocieron las limitaciones dimensionales para posteriormente diseñar biochips a esta escala.

8.1.2 DISEÑO DE BIOCHIP

- Considerando los requerimientos biológicos para realizar migración celular se estableció un diseño general de un biochip para migración celular.
- Usando las dimensiones establecidas por las características del haz en el foco fue posible realizar programas para diferentes configuraciones.
- El proceso de diseño estuvo delimitado por el establecimiento de una metodología de fabricación de los biochips.

8.1.3 FABRICACIÓN DE BIOCHIPS

- Con ayuda del arreglo óptico fue posible grabar mediante ablación láser patrones con un tamaño de entre 13 μm a 100 μm , usando una potencia relativamente baja (1 W) de entrada en el sistema óptico.
- El mejoramiento de la superficie de los grabados es posible con una atmósfera de acetona. La resina epóxica y el PDMS permitieron mantener la calidad de grabado inicial.
- El proceso de fabricación de pozos de entrada y salida mantienen la calidad y repetitividad del grabado y permiten la entrada y salida del fluido.
- Con ayuda de puntas de micropipeta acopladas en los pozos de entrada y salida se logró mantener el fluido en el biochip dentro de la incubadora de células por un tiempo suficiente para los experimentos de migración celular.

8.1.4 MANEJO DE BIOCHIPS

- Las células cancerosas SKOV3 lograron la adhesión en los portaobjetos.
- Las células que fueron químicamente atraídas, pero no entraron al canal del biochip, se quedaron aglomeradas a la entrada.

9 CONCLUSIÓN

En esta tesis se diseñaron, fabricaron e implementaron biochips para el estudio de migración celular.

El arreglo óptico permite realizar grabados de 13 a 100 micrómetros de diámetro de canal sobre poliestireno. El láser utilizado es un láser continuo con una potencia promedio de 10 mW. Las condiciones biológicas para experimentos de migración celular fueron establecidas y se realizaron diseños que cumplieran con las mismas. La metodología de fabricación desarrollada permite realizar biochips de manera repetible.

A pesar de que alternativas de diseño fueron implementadas como la de dos pozos conectados mediante un canal de 15 μm de diámetro, estos muestran señales de quimioatracción, pero se requiere hacer un diseño que disminuya la velocidad de la difusión en el medio para observar el fenómeno de migración celular más detalladamente.

Estos biochips son una herramienta que utiliza células cancerosas para analizar comportamientos de quimioatracción; en el que se reduce la cantidad de reactivos comparado con otras técnicas; además de la posibilidad de utilizarlos en un ambiente controlado.

10 CONTENIDO

10.1 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 7.1. Equipo empleado.....	24
Tabla 7.2 Componentes del arreglo experimental.....	26

10.2 ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 7.1 Espectro del láser de estado sólido.....	24
Gráfica 7.2 Estabilidad de la potencia promedio a la salida del láser. La desviación estándar (barra azul) se encuentra en el rango de variación que el fabricante establece en sus especificaciones.	25
Gráfica 7.3 Umbral de grabado y anchura grabada en los sustratos.	30
Gráfica 7.4 Diámetro teórico del haz en función de la distancia al foco de la lente.	32
Gráfica 7.5 Comparación experimental con valor teórico (líneas verdes) de anchura de haz gaussiano. Tres condiciones de grabado cambiadas con la velocidad de los motores para variar el tiempo de grabado equivalente a la variación en el tiempo de exposición, equivalentes a cambiar en tres órdenes de magnitud la energía.	33
Gráfica 7.6 Radio de haz con desviación estándar.....	34
Gráfica 7.7 Medidas de profundidad de ablación láser dependientes de la velocidad o tiempo de exposición.	37
Gráfica 10.1 Espectro de fluorescencia de CellTraker CM Dil. En azul excitación. En rojo emisión.....	59

10.3 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1 Etapas de la migración celular (Eynard et al., 2016).	9
Figura 5.2 Aumento de superficie del frente de migración en una célula (Eynard et al., 2016).	9
Figura 5.3 Interacciones moleculares que determinan la motilidad celular (Eynard et al., 2016).	10
Figura 5.4 Proceso de generación de un haz láser.	12
Figura 5.5 Haz gaussiano de menor orden (modo TEM _{0,0}) (Malacara, 2015).	13
Figura 5.6 Parámetros de un haz gaussiano. Z distancia del foco. w ₀ diámetro de la cintura. theta ángulo de convergencia o divergencia.	14
Figura 5.7 Haz de un láser después de una lente.....	14
Figura 5.8 Cráter generado por ablación láser (Jiménez, 2012).....	16
Figura 7.1 Láser 532nm DPSS diodo láser de estado sólido (izquierda), fuente de alimentación (derecha) [imagen proporcionada por Hangzhou Brandnew Technology Co.].	23
Figura 7.2. Diagrama esquemático del arreglo experimental para mejorar la calidad óptica.	26
Figura 7.3 Técnica de la navaja para determinar el diámetro de un haz. A) El primer paso es medir el 100% de la potencia. B) En el segundo paso se mueve el filo de una navaja hasta medir el 86% de potencia y ese será el primer punto de referencia. C) El tercer paso consiste en mover la navaja hasta obtener el 13% de la potencia, ese es el segundo punto de referencia. La navaja tiene que estar colocada en un sistema que ayude a medir la diferencia de posición entre el punto A y el punto B.	27
Figura 7.4 Medidas en el esquema de potencia y diámetro.	28
Figura 7.5 Esquema del sistema con polarizadores.	29
Figura 7.6 A) Foto de la celda grabada y sin grabar B) Esquema de grabado para determinar el diámetro en función del tiempo de exposición debida a la velocidad de los motores.	32
Figura 7.7 Captura de pantalla de la toma de 6 medidas.....	34
Figura 7.8 Microscopio AmScope (izquierda), tornillos para cambiar el foco (derecha). Punto de referencia (flecha morada), 20 unidades de giro (flecha roja).	35
Figura 7.9 Grabado sobre celda, capturado con el software del microscopio AmScope. A) Vista superior fuera del canal en los bordes del grabado. B) Vista en plano normal sobre la celda. C) Vista inferior dentro del canal.	36

Figura 7.10 Planos de referencia en moldes de grabado. A) Molde negativo (celda y PDMS). B) Molde positivo (resina).	36
Figura 8.1 Esquema general del diseño de un biochip.. En rojo medio de cultivo de las células y en amarillo el quimioattractor. La flecha roja indica la dirección de migración celular.	38
Figura 8.2 Etapas de diseño de un biochip de migración celular.....	39
Figura 8.3 Diagrama de requerimientos para el diseño del biochip.....	40
Figura 8.4 Etapa de diseño de un biochip.	41
Figura 8.5 Proceso de grabado para canales de más de 13 μm . Las flechas indican la dirección del grabado.	42
Figura 8.6 Configuraciones propuestas de biochips.	42
Figura 8.7 Etapa de manufactura. El recuadro azul representa el molde que se empleara para la fabricación en serie.	43
Figura 8.8 Etapa de producción en serie y pruebas de migración.....	45
Figura 8.9 Proceso completo de diseño de un biochip de migración celular.....	46
Figura 9.1 Esquema de proceso general de fabricación de biochips.....	47
Figura 9.2 A) Celdas de espectroscopia de poliestireno. B) Pintado de celda con marcador negro. C) Celda pintada para realizar dos grabados.	48
Figura 9.3 A) y B) Proceso de perforación de celdas con un Dremel. C) Celda perforada con entradas y salidas para dos grabados.	48
Figura 9.4 Ablandamiento de bordes de pozos. A) Pozo perforado sin ninguna modificación, A1 parte superior del pozo, A2 parte inferior del pozo. B) Proceso de ablandamiento de bordes para quitar imperfecciones. C) Pozo después de ablandar bordes, C1 parte superior de pozo ablandado, C2 parte inferior de pozo ablandado.	49
Figura 9.5 Configuración del sistema de grabado de la celda de poliestireno. A) Láser apagado. B) Celda en proceso de grabado.	49
Figura 9.6 A1, A2) Grabado de 100 μm atravesando el pozo, imágenes tomadas en diferente foco del microscopio. B1, B2) Grabado de 13 μm atravesando el pozo, imágenes tomadas en diferente foco del microscopio. C) Celda con grabados que conectan la entrada y salida de los pozos.	50
Figura 9.7 A) Grabados cortados. B) Grabados limpios.	51
Figura 9.8 A) Configuración experimental de atmósfera con acetona. B) Grabado, B1 grabado antes de ponerlo en atmósfera con acetona, B2 grabado después de exponerlo a atmósfera con acetona.....	51

Figura 9.9 A) Lavado de moldes de poliestireno en isopropanol. B) Inmovilización de moldes. C) Materiales de uso. D) Grabados sumergidos en resina epóxica. E) Remoción de burbujas mediante vacío. F) Resina epóxica desmoldada con grabados.	53
Figura 9.10 A) Lavado de grabados. B) Moldes de resina epóxica acomodados en recipiente. C) Materiales de uso, PDMS. D) Moldes de resina epóxica sumergidos en PDMS. E) Vacío para quitar burbujas. F) PDMS polimerizado con moldes de resina epóxica en su interior....	54
Figura 9.11 A) Moldes de resina epóxica con PDMS antes de desmoldar. B) PDMS ensamblado en sustrato de vidrio.....	55
Figura 9.12 A) Pruebas de fluidos, se puede observar que el último del lado derecho se inundó un pozo rompiendo la barrera del canal. B) Canal con entrada y salida accesibles para el fluido. C) Canal con paso de fluido correcto.	55
Figura 9.13 Biochip ensamblado con puntas en los pozos de entrada y salida de fluido. ..	56
Figura 10.1 Partes de un biochip ensamblado.....	57
Figura 10.2 Esquema de la metodología para migración celular en biochips. A) Retirado de puntas de micropipeta. B) Se colocaron células en uno de los pozos en RPMI sin suero (rojo). C) El canal de migración se llenó con RPMI. D) En el otro pozo se colocó SBF (amarillo). E) Una de las puntas de micropipeta fue llenada con RPMI sin suero y la otra con SBF. F) Se colocaron las puntas en su pozo correspondiente y se incubaron por 12 horas.	58
Figura 10.3 Biochip ensamblado con células. A) El biochip fue metido en una caja Petri y posteriormente en la incubadora. B) Acercamiento al biochip.....	59
Figura 10.4 Biochips observados con un de un filtro de luz verde. A) y B) Biochips colocados en microscopio Olympus. C) Imagen obtenida con el microscopio Olympus.	60
Figura 10.5 Imagen de biochip con canal de 12 μm tomada con microscopio Olympus. A) Imagen sin excitación. B) Imagen con excitación en rojo para observar la fluorescencia de las células.	60

11 ANEXOS

11.1 ANEXO A

```
%%% chip forma escalera vertical
% considerar el limite de area de grabado
inicioX=0; % valor de inicio en X
inicioY=7.6; % valor de inicio en Y
inicioZ=16.2; % valor de inicio en Z, valor de posición del foco
% dimensiones de movimiento
Y1=6;
X1=0.01;
Y2=1;
Y3=2;
X2=1.02;
X3=2;
% temporizadores o pausas
PX1=20;
PY1=320;
PX2=70;
PY2=70;
PZ=10;
PX3=140;
PY3=140;

% Inicializar los motores
x.SetVelParams(0, 0.02, 0.002, 0.02); % canal, vel_min(1mm/s), acel(5mm/s/s), velmax(1mm/s)
y.SetVelParams(0, 0.02, 0.002, 0.02);
z.SetVelParams(0, 0.1, 0.01, 0.1);

X0=inicioX;Y0=inicioY;Z0=inicioZ;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
z.SetAbsMovePos(0,Z0);
z.MoveAbsolute(0,1==0);
pause

X0=X0+X3;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)

Y0=Y0+Y1;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY1)

X0=X0-X3;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)

Y0=Y0-X1;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX1)

X0=X0+(X3-X1);
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)
```

Y0=Y0-(Y1-X1-X1);
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY1)

X0=X0-(X3-X1);
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)

Y0=Y0+X1;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX1)

X0=X0+(X3-X1-X1);
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)

Y0=Y0+(Y1-X1-X1-X1-X1);
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY1)

X0=X0-(X3-X1-X1);
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)

Y0=Y0+X1+X1;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX1)

X0=X0+(X3-X1);
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)

%%%%%%%% cambio foco
Z0=16.4;
z.SetAbsMovePos(0,Z0);
z.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PZ)
%%%%%%%%

Y0=Y0-Y2;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY2)

X0=X0+X2;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX2)

Y0=Y0-Y2;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY2)

X0=X0-X2;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX2)

```
Y0=Y0-Y2;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY2)
```

```
X0=X0+X2;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX2)
```

```
Y0=Y0-Y2;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY2)
```

```
X0=X0-X2;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX2)
```

```
Y0=Y0-Y2;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY2)
```

```
X0=X0+X2;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX2)
```

```
Y0=Y0-Y2;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY2)
```

```
%%%% cambio foco
Z0=16.2;
z.SetAbsMovePos(0,Z0);
z.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PZ)
%%%%%%%%%
```

```
X0=X0+(X3-X1);
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)
```

```
X0=X0-X3;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)
```

```
Y0=Y0+Y1;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PY1)
```

```
X0=X0+X3;
x.SetAbsMovePos(0,X0);
x.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX3)
```

```
Y0=Y0-X1;
y.SetAbsMovePos(0,Y0);
y.MoveAbsolute(0,1==0);
pause (PX1)
```

```
X0=X0-(X3-X1);  
x.SetAbsMovePos(0,X0);  
x.MoveAbsolute(0,1==0);  
pause (PX3)
```

```
Y0=Y0-(Y1-X1-X1);  
y.SetAbsMovePos(0,Y0);  
y.MoveAbsolute(0,1==0);  
pause (PY1)
```

```
X0=X0+(X3-X1);  
x.SetAbsMovePos(0,X0);  
x.MoveAbsolute(0,1==0);  
pause (PX3)
```

```
Y0=Y0+X1;  
y.SetAbsMovePos(0,Y0);  
y.MoveAbsolute(0,1==0);  
pause (PX1)
```

```
X0=X0-(X3-X1-X1);  
x.SetAbsMovePos(0,X0);  
x.MoveAbsolute(0,1==0);  
pause (PX3)
```

```
Y0=Y0+(Y1-X1-X1-X1-X1);  
y.SetAbsMovePos(0,Y0);  
y.MoveAbsolute(0,1==0);  
pause (PY1)
```

```
X0=X0+(X3-X1-X1);  
x.SetAbsMovePos(0,X0);  
x.MoveAbsolute(0,1==0);  
pause (PX3)
```

12 REFERENCIAS

1. Bachs, L., Cuesta, J., & Careles, N. (1988). Aplicaciones industriales del láser. Marcombo.
2. Benedetti, I., & Reyes, N. (2015). Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Latreia*, 28(4), 420–433.
3. Cheng, J., & Kricka, L. J. (2003). *Biochip Technology*. CRC Press.
4. Chen, X., Li, T., & Gao, Q. I. (2018). A novel method for rapid fabrication of PMMA microfluidic chip by laser cutting and sealing integration. *Surface Review and Letters*, 18, 1950042.
5. Chen, X., Li, T., Zhai, K., Hu, Z., & Zhou, M. (2017). Using orthogonal experimental method optimizing surface quality of CO2 laser cutting process for PMMA microchannels. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 88(9-12), 2727–2733.
6. Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2016). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. Ed. Médica Panamericana.
7. Fernández, B. A. (2010). *El láser, la luz de nuestro tiempo*. Globalia.
8. Hamad, A. H. (2016). Effects of Different Laser Pulse Regimes (Nanosecond, Picosecond and Femtosecond) on the Ablation of Materials for Production of Nanoparticles in Liquid Solution. In R. Viskup (Ed.), *High Energy and Short Pulse Lasers*. InTech.
9. Hong, T.-F., Ju, W.-J., Wu, M.-C., Tai, C.-H., Tsai, C.-H., & Fu, L.-M. (2010). Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO2 laser. *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol. 9, pp. 1125–1133. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0633-0>
10. Huang, Y. L., Tung, C.-K., Zheng, A., Kim, B. J., & Wu, M. (2015). Interstitial flows promote amoeboid over mesenchymal motility of breast cancer cells revealed by a three dimensional microfluidic model. *Integrative Biology*, 7(11), 1402–1411.
11. Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, 21(12), 745–754.
12. Hu, Z. L., & Chen, X. Y. (2018). Fabrication of Polyethylene Terephthalate Microfluidic Chip Using CO2 Laser System. *International Polymer Processing*, Vol. 33, pp. 106–109. <https://doi.org/10.3139/217.3447>

13. Irimia, D., & Toner, M. (2009). Spontaneous migration of cancer cells under conditions of mechanical confinement. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 1(8-9), 506–512.
14. Jiménez, A. K. Z. (2012). Fabricación de microsistemas y máscaras de alta resolución con tecnología láser (Ingeniero Eléctrico Electrónico, Universidad Nacional Autónoma de México; M. Hautefeuille, Ed.). Retrieved from <http://132.248.9.195/ptd2012/mayo/0679605/Index.html>
15. Kim, S.-J., Baker, C. H., Kitadai, Y., Nakamura, T., Kuwai, T., Sasaki, T., ... Fidler, I. J. (2009). The pathogenesis of cancer metastasis: relevance to therapy. In *Principles of Cancer Biotherapy* (pp. 17–40). Springer, Dordrecht.
16. Klank, H., Kutter, J. P., & Geschke, O. (2002). CO₂-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems. *Lab on a Chip*, Vol. 2, p. 242. <https://doi.org/10.1039/b206409j>
17. Li, J., Jia, Z., Kong, J., Zhang, F., Fang, S., Li, X., ... Liu, T. (2016). Carcinoma-Associated Fibroblasts Lead the Invasion of Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma Cells by Creating an Invasive Track. *PloS One*, 11(3), e0150247.
18. Liotta, L. A., & Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Research*, 51(18 Suppl), 5054s – 5059s.
19. Mak, M., Reinhart-King, C. A., & Erickson, D. (2013). Elucidating mechanical transition effects of invading cancer cells with a subnucleus-scaled microfluidic serial dimensional modulation device. *Lab on a Chip*, 13(3), 340.
20. Malacara, D. (2015). *Optica Basica*. Fondo de Cultura Economica USA.
21. Manenkov, A. A. (2014). Fundamental mechanisms of laser-induced damage in optical materials: today's state of understanding and problems. *Organizational Ethics: Healthcare, Business, and Policy: OE*, 53(1), 010901.
22. Ma, Y.-H. V., Middleton, K., You, L., & Sun, Y. (2018). A review of microfluidic approaches for investigating cancer extravasation during metastasis. *Microsystems & Nanoengineering*, 4, 17104.
23. Montenegro, M. A., & Rojas, M. A. (2001). Epithelial-mesenchymal transformation during embryonic development. *Revista Chilena de Anatomía*, 19(3), 301–310.
24. Ng, J. H., & Ilag, L. L. (2003). Biochips beyond DNA: technologies and applications. *Biotechnology Annual Review*, 9, 1–149.

25. Qi, H., Wang, X., Chen, T., Ma, X., & Zuo, T. (2009). Fabrication and characterization of a polymethyl methacrylate continuous-flow PCR microfluidic chip using CO₂ laser ablation. *Microsystem Technologies*, 15(7), 1027–1030.
26. Ristau, D., Li, L., Sargent, R., & Sytchkova, A. (2017). The Optical Society's 2016 topical meeting on optical interference coatings: introduction. *Applied Optics*, 56(4), OIC1–OIC4.
27. Roussos, E. T., Condeelis, J. S., & Patsialou, A. (2011). Chemotaxis in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 11(8), 573–587.
28. Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(1), 87–96.
29. Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 2(6), 442–454.
30. Troncoso, D., Madariaga, I., & Aldana, S. (2017). Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Universitas Médica*, 54(4). <https://doi.org/>
<https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed58-4.temm>