



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MATERIALES POLIMÉRICOS

FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CHIP DE INFLAMIENTO PARA PROPORCIONAR ESTÍMULOS  
MECÁNICOS A CÉLULAS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
YASAB RUIZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE  
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR:  
DR. FRANCISCO SÁNCHEZ ARÉVALO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO  
FACULTAD DE CIENCIAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, FEBRERO DE 2020



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.

<b>Agradecimientos técnicos</b>	<b>5</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
1.1 Antecedentes	7
1.1.1 Ejemplos de dispositivos que utilizan la presión para generar un estímulo sobre células	8
1.1.2 Lista de conceptos útiles	11
1.1.3 Comportamiento de una membrana circular sujeta a inflamamiento	13
1.1.4 Materiales utilizados en la fabricación del dispositivo de inflamamiento	22
Polidimetilsiloxano (PDMS)	22
Polimetilmetacrilato (PMMA)	23
Intermediate Polimer Stamp (IPS)	23
Loctite 3525	23
Hidrogel de poliacrilamida	24
1.1.5 Técnicas de fabricación utilizadas en el dispositivo de inflamamiento	26
Litografía suave	26
Molde réplica	26
Sellado del chip de PDMS por exposición a un plasma de aire	27
Micromaquinado por CNC para la obtención de un molde para la técnica de molde réplica	28
Fabricación de membranas utilizando spin-coating	29
Microestructuración de un polímero por litografía por nanoimpresión	30
Uso de Loctite 3525 como promotor de adhesión para hidrogeles de Poliacrilamida	30
1.2 Planteamiento del problema	31
1.3 Hipótesis	31
1.4 Objetivos	32
Objetivo general	32
Objetivos particulares	32
<b>2. Metodología experimental</b>	<b>33</b>
2.1 Fabricación del dispositivo de inflamamiento biaxial	33
2.1.1 Desglose de cada componente del dispositivo	33
2.1.2 Protocolo para la fabricación del dispositivo de inflamamiento biaxial	36
Descripción breve del método	36
Descripción detallada del procedimiento	37
2.2 Caracterización del dispositivo	45
2.2.1 Dispositivo experimental para la caracterización del dispositivo	45
Descripción breve del método	45

Materiales y equipos requeridos	45
Descripción detallada del procedimiento	46
<b>3. Resultados obtenidos</b>	<b>51</b>
3.1 Chip con membrana de Loctite 3525	52
3.2 Chip con membrana de Loctite 3525 y recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida	58
<b>4. Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>5. Perspectivas y trabajo a futuro</b>	<b>67</b>
Mejoras a los procesos presentados en este trabajo	67
Cultivo celular y pruebas biológicas	68
Inflamamiento junto con pruebas de indentación mecánica	69
Modelado teórico del dispositivo	69
Versatilidad del diseño	69
Aplicación: Caracterización de crecimiento celular a través del cambio en el patrón de difracción de PDMS microestructurado	71
<b>6. Referencias</b>	<b>71</b>



*A mi mamá Luz María y a mi hermana Yanil.*

# Agradecimientos técnicos

Al Dr. Mathieu Hautefeuille, por la asesoría durante este proyecto.

Al Dr. Francisco Sánchez Arévalo y al Dr. Genaro Vázquez Victorio por la discusión aportada como miembros de mi Comité Tutor.

A los miembros de mi jurado: Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez (Presidenta), Dr. Mathieu Hautefeuille (Primer Vocal), Dr. Luis Fernando Olguín Contreras (Segundo Vocal), Dr. Naser Qureshi (Tercer Vocal), Dr. Juan Arnaldo Hernández Cordero (Secretario).

A la Lic. en NT. Fernanda López García, por la colaboración experimental en este proyecto.

A la Fís. Cindy Viridiana Peto Gutiérrez por las réplicas en litografía por nanoimpresión.

Al Fís. Francisco Páez Larios por la microfabricación por microfresado por control numérico por computadora del molde de polimetilmetacrilato, y la experiencia transmitida en fabricación de *chips* y microfluídica.

Al MCIM Daniel Pérez Calixto por la experiencia transmitida en el uso de hidrogeles y discusión de la mecánica del dispositivo.

A la Fís. Ana Ximena Monroy Romero y Dra. Beatriz Díaz Bello por la experiencia transmitida en el uso de Loctite 3525 con hidrogeles.

A la Fís. Ana Lucía Cábriales Torrijos por la experiencia transmitida en uso de PDMS, en fabricación por spin coating y en manejo de las bombas microfluídicas Fluigent.

Al grupo donde realicé mi trabajo de investigación: Grupo de Micro y Nanotecnología (uNTec) del Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT), de la Facultad de Ciencias, de la UNAM.

A los proyectos PAPIIT IT102017, CONACyT por los apoyos del Laboratorio Nacional LaNSBioDyT entre 2016 y 2018, CONACyT FORDECyT #272894, y por la beca para los estudios de Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales (PNPC # 00124, beca # 494093).

# Resumen

Los sustratos para cultivo celular tradicionales carecen de propiedades fisicoquímicas importantes del ambiente nativo de las células estudiadas. Por ejemplo, la rigidez es uno de los estímulos críticos que las células perciben en su entorno *in vitro* e *in vivo* y que dictan su desempeño y destino en cultivo: la respuesta celular a la mecánica impacta ampliamente la función y fenotipo de las células. No sólo la rigidez estática, sino también impulsos variables produciendo un estado dinámico de esfuerzo deben introducirse en plataformas de cultivo celular para simular el ambiente nativo. En este trabajo, se presenta la fabricación y caracterización de un *chip* del tamaño de un portaobjetos capaz de producir estados biaxiales de fuerza/deformación a través de una prueba de micro-inflamamiento de una membrana polimérica, para poder aplicarlo a cultivo celular con esfuerzos mecánicos locales controlables. Una membrana de adhesivo fotocurable Loctite 3525 recubierto con hidrogel de poliacrilamida, colocado sobre un soporte de polidimetilsiloxano (PDMS) se infla de forma controlada, en rangos de presión de 0-500 mbar, logrando deformaciones fuera del plano entre 0 y 1.7 mm de altura del casquete de inflamamiento para transmitir estímulos de estiramiento a células sembradas en la parte exterior de la membrana. Esta plataforma, de diseño versátil, provee una metodología para generar estímulos mecánicos de tensión biaxial en células utilizando un estímulo mecánico controlado de una membrana fabricada con un material biocompatible, con propiedades mecánicas cercanas a las presentes en el entorno celular natural, compatible con técnicas de microscopía óptica, útil para el estudio de mecanobiología en células epiteliales o endoteliales.

# Abstract

Traditional cell culture substrates lack important physicochemical properties from the native environment of the studied cells. For example, stiffness is one of the critical stimuli that cells perceive in their surroundings, both *in vivo* and *in vitro*, and that dictate their performance and destination in cell culture: cellular response to mechanics widely impacts cell function and phenotype. Not only static stiffness but also several variable impulses that generate a dynamical state of stress must be introduced in cell culture platforms to emulate the native environment of the cells. In this work, the fabrication and characterization of a microscope slide-sized chip capable of producing stress-strain biaxial configurations by a test of micro-bulging of a polymeric membrane, applicable to cell culture with locally controlled mechanical stress. A photocurable glue Loctite 3525 membrane, coated with polyacrylamide hydrogel, placed on top of a polydimethylsiloxane (PDMS) support is inflated in a controlled fashion, in a pressure range from 0-500 mbar, achieving out-of-plane deformations from 0 to 1.7 mm in the height of the bulge, to transmit stretching stimuli to cells cultured on top of the external part of the membrane. This platform, with a versatile design, provides a method to generate biaxial stretching mechanical stimuli in cells, using controlled deformation on a membrane fabricated with biocompatible materials with mechanical properties similar to the ones present in the natural cell environment, compatible with optical microscopy techniques, useful for mechanobiology studies in epithelial or endothelial cells.

# 1. Introducción

## 1.1 Antecedentes

Los sustratos de cultivo celular tradicionales *in vitro* tales como las cajas Petri de vidrio o poliestireno, no proporcionan un microambiente similar al encontrado *in vivo*, debido a que carecen de características importantes que impactan a las células como rigidez, flujo, geometría, estructura presentes dentro de los tejidos. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar e incursionar en la investigación de dispositivos que permitan simular ciertas características que la célula percibiría en su microambiente original, para poder estudiar correctamente las respuestas celulares adecuadas ante ciertos estímulos.

El desarrollo de tecnología de Sistemas Micro-Electro-Mecánicos (MEMS) y su integración en sistemas complejos para aplicaciones biológicas ha generado un nuevo campo de estudio, llamado BioMEMS. La tecnología MEMS ofrece la ventaja de construir estructuras bidimensionales (2D) o tridimensionales (3D), con precisión micrométrica, incorporando diferentes materiales con distintas propiedades físicas o químicas tales como polímeros, metales y materiales dieléctricos. La complejidad de soluciones que se puede generar con la tecnología MEMS se correlaciona con los requerimientos de las aplicaciones biomédicas [1]. Debido a la disponibilidad en aumento de dichas herramientas, los investigadores de ciencias de la vida y bioingeniería han empezado a utilizar MEMS como plataformas para cultivo celular con el propósito de responder algunas preguntas biológicas fundamentales [1].

En un ambiente *in vivo*, las células están sujetas a múltiples estímulos que varían espacial y temporalmente. La tecnología utilizada para la fabricación de MEMS es útil para generar sistemas microfabricados capaces de provocar en las células este tipo de estímulos en una manera controlable y reproducible que no es posible obtener por técnicas estándares de cultivo celular. Además, esta tecnología puede ser utilizada para relacionar cultivo celular con dispositivos analíticos integrados que pueden analizar los procesos bioquímicos que gobiernan el comportamiento celular [2]. Estos dispositivos se han visto ampliamente implementados en investigación biomédica básica y aplicada, principalmente porque la litografía suave ha colocado a la microfluídica al alcance de laboratorios de investigación enfocados en biología. Los materiales elastoméricos utilizados en la litografía suave, principalmente el Polidimetilsiloxano (PDMS), son relativamente fáciles de fabricar y compatibles con la mayoría de ensayos biológicos [2].

El bioanálisis a nivel celular proporciona información directa de una célula individual o un grupo de células, lo que juega un papel esencial en el entendimiento de cada elemento celular y su correlación con un sistema biológico complejo. Debido a que el tamaño de los *chips* microfluídicos tienen compatibilidad con las células, los sistemas microfluídicos son plataformas ideales para la manipulación y análisis *in vitro* de células singulares o en grupo [3]. Los sistemas microfluídicos ofrecen la habilidad de crear interacciones célula-célula, célula-sustrato y célula-medio con un alto grado de precisión. A medida que ha aumentado la popularidad de los ensayos con células utilizando sistemas microfluídicos, la caracterización de cultivos celulares dentro de sistemas microfluídicos ha adquirido importancia [3].

En este trabajo, se presenta un dispositivo que emula las características de rigidez, curvatura y estímulos mecánicos durante el cultivo por medio de cambios de presión controlados por bombas de presión. El dispositivo se pretende utilizar para estudiar células que se encuentran continuamente expuestas a un estímulo mecánico, tales como células epiteliales y endoteliales de pulmón, de intestino o de vasos sanguíneos, y por lo tanto tiene que cumplir con los siguientes requisitos: debe ser un dispositivo que en la sección donde se realizará el cultivo celular, tenga rigideces similares a las encontradas en dichos tejidos; debe estar fabricado de materiales biocompatibles, sobre los cuales se pueda realizar cultivo celular; debe ser capaz de soportar las presiones que se encuentran en estos tejidos y debe de ser compatible con la forma en la que se observan los cultivos biológicos. A grandes rasgos, el dispositivo consiste en un soporte de polidimetilsiloxano (PDMS), con una membrana del adhesivo fotocurable Loctite 3525 que se infla de manera controlada, cambiando así la rigidez y la curvatura locales, y que permite colocar sobre ella un recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida para que la deformación sea ejercida sobre este material suave. Como se mencionará más adelante, los hidrogeles de poliacrilamida son efectivamente un material ampliamente utilizado en cultivo celular, debido a que se puede ajustar la rigidez de este material.

### 1.1.1 Ejemplos de dispositivos que utilizan la presión para generar un estímulo sobre células

El dispositivo presentado en este trabajo utiliza cambios de presión para generar cambios en la curvatura del sustrato. En la literatura existen varios dispositivos que, a partir de cambios en la presión, provocan cambios en la rigidez o curvatura del material y así proporcionan estímulos mecánicos para ver los efectos en tejidos o cultivos celulares. A continuación se mencionan algunos de ellos:

Huh *et al.* presentan un microsistema biomimético que reconstruye la interfaz alvéolo capilar funcional crítica [4]. El dispositivo reproduce respuestas a nivel de órgano ante bacteria y citoquinas inflamatorias introducidas en el espacio alveolar, investigando el efecto del esfuerzo mecánico en las respuestas inflamatorias del pulmón a nanopartículas de sílice. El esfuerzo mecánico también potencia la absorción epitelial y endotelial de nanopartículas y estimula su transporte en el canal microvascular subyacente. El dispositivo se muestra en la Fig. 1. Este dispositivo consiste en un *chip* de PDMS compartimentalizado para formar una barrera alveolo-capilar en una membrana delgada y porosa, recubierta con matriz extracelular. El dispositivo recrea movimientos fisiológicos de respiración al aplicar vacío a las cámaras laterales y causar estiramiento mecánico de la membrana de PDMS formando la barrera alvéolo-capilar. Se cultivaron células humanas epiteliales alveolares y células humanas endoteliales de microvasculatura pulmonar. [4]

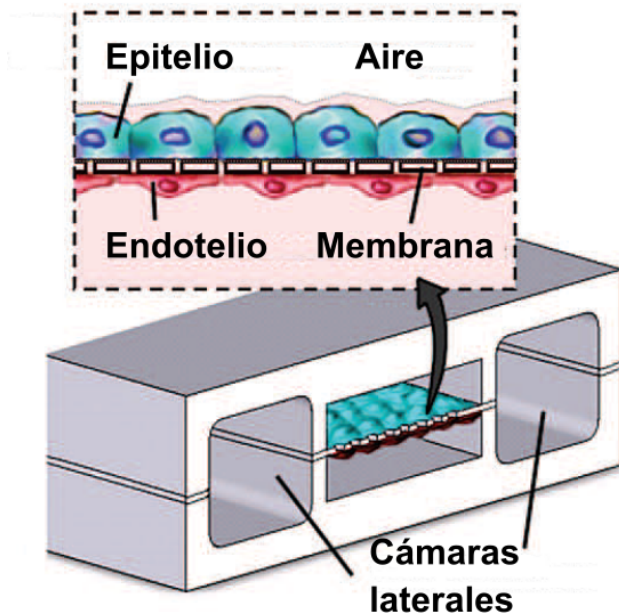


Figura 1: Diseño de un *chip* donde se utilizan modulaciones de presión para ejercer esfuerzos de estiramiento y contracción sobre un cocultivo celular de células alveolares y de la vasculatura de pulmón. Imagen adaptada de [4].

Por otro lado, Walker *et. al* presentan en [5] un estirador de microtejidos operado por vacío para estudiar el comportamiento celular dentro de un ambiente multicelular compuesto de proteína de matriz extracelular, y en respuesta a estiramiento uniaxial continuo, que se muestra en la Fig. 2. Este dispositivo consiste en un arreglo de 50 microarreglos fabricado en PDMS de postes en los cuáles se cultivan microtejidos de líneas celulares NIH3T3 y NIH3T3-GFP, ambas fibroblastos de ratón. Estos postes están conectados a canales microfluídicos independientes, lo que permite realizar estiramientos oscilatorios a los microtejidos cultivados.

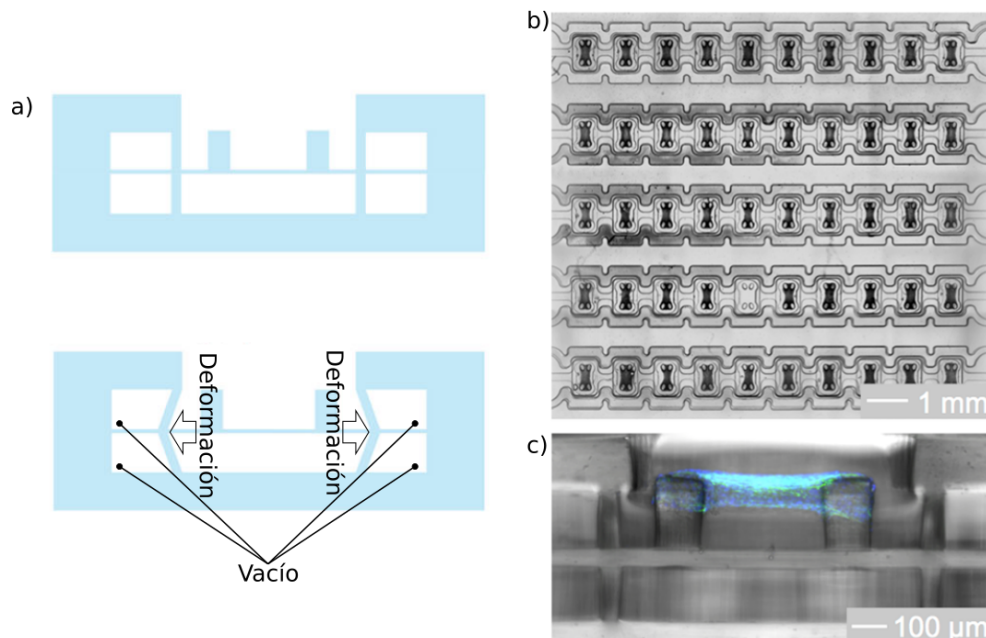


Figura 2: a) Diagrama transversal del dispositivo de PDMS activado por vacío para realizar estiramientos oscilatorios en una matriz de microtejidos, a partir de la deformación de pilares. b) Micrografía de la matriz de 50 microtejidos. c) Sección transversal de los microtejidos. Figura adaptada de [5].

Por otro lado, se ha observado que la curvatura del sustrato afecta las propiedades de las células, tales como forma, orientación y polarización [6]. Teniendo esto en cuenta, se ha utilizado también el control de presión y el efecto que tiene sobre la curvatura para fabricar dispositivos para cultivo celular y controlar una característica en particular del dispositivo desde el momento de la fabricación.

Por ejemplo, Hsieh *et al.* [7] generaron un intervalo de esfuerzos estáticos en gradiente sin ningún control externo para la simulación de comportamiento celular dentro de microambientes de hidrogeles tridimensionales. Ellos utilizan un *chip* microfluídico con una membrana flexible de PDMS. Insertan dentro del *chip* un hidrogel de gelatina metacrilatada (GelMA) cargado con células, fotopolimerizable. Posteriormente, polimerizan de forma localizada el GelMA en forma de círculos concéntricos. Para ello, utilizan una fotomáscara y a partir de exposición a luz UV, logran establecer un gradiente de esfuerzos sobre las células una vez que la presión es retirada del *chip*. En la Fig. 3 se muestra el procedimiento de forma más detallada.

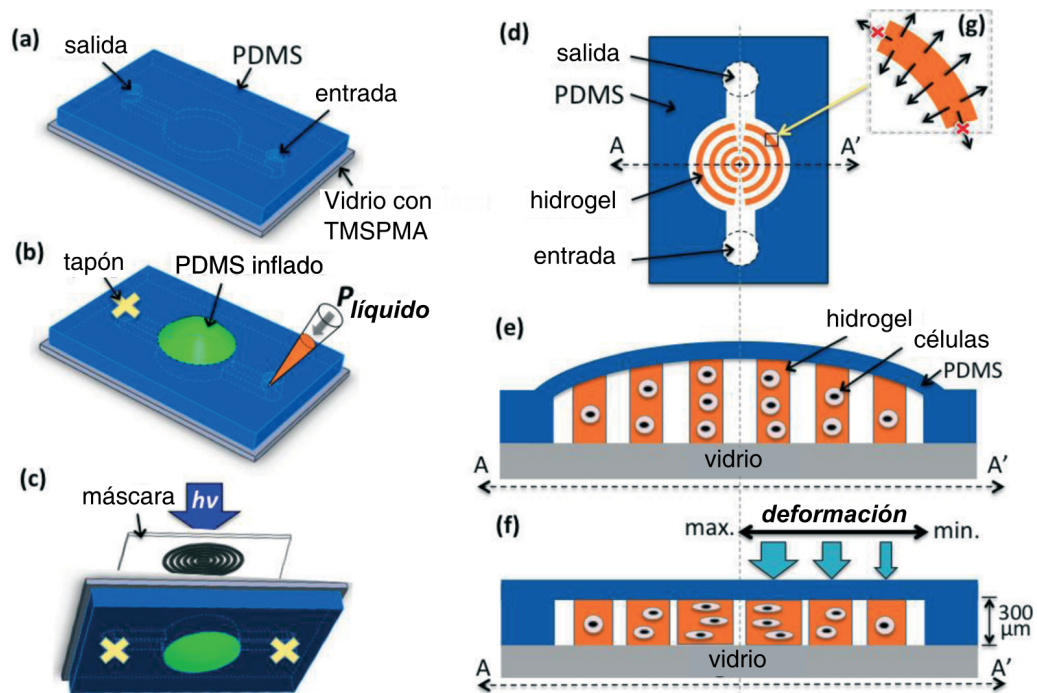


Figura 3: Esquema de la fabricación para hidrogeles con gradiente de esfuerzos en un chip microfluídico de PDMS. Dentro de un chip microfluídico de PDMS, con un pozo de inflamación y una membrana (a), se encuentra un hidrogel fotopolimerizable cargado de células. Cuando se provoca un aumento en la presión hidrostática dentro del chip, el hidrogel se estira e infla la membrana de PDMS (b). Debido a la polimerización seleccionada a través de una fotomáscara (c), se forman círculos concéntricos (d) de hidrogel polimerizado. Al retirarse la presión y relajarse el PDMS, (f) se obtiene un gradiente de esfuerzos sobre los hidrogeles que encapsulan a las células, siendo de mayor intensidad aquellos círculos más cercanos al centro del dispositivo, con los esfuerzos en una dirección radial con respecto de los círculos concéntricos. (g) Imagen adaptada de [7].

Cabe mencionar que el diseño del dispositivo utilizado para esta aplicación es similar al que se presenta en el presente trabajo, como se verá más adelante, en la sección [2.1.1 Desglose de cada componente del dispositivo](#).

Como se puede apreciar, existen diversas aplicaciones de dispositivos activados por cambios de presión para generar estímulos mecánicos sobre ciertos cultivos celulares, o que aprovechan el cambio en la curvatura generado por la presión durante la fabricación, por lo que un dispositivo que puede cambiar el radio de curvatura, y por lo tanto su rigidez local, permitiría el estudio de ciertos estímulos mecánicos sobre las células que se cultiven sobre él.

## 1.1.2 Lista de conceptos útiles

A continuación, se enlista una serie de definiciones útiles de conceptos de mecánica de materiales que se utilizarán a lo largo de este trabajo:

- Esfuerzo [8] [en inglés, *stress*]: En una deformación de un material, se ejercen fuerzas o cargas que provocan cambios de forma en el material. Las fuerzas internas a las que las partículas están sujetas debido a sus partículas vecinas se conocen como esfuerzo ( $\sigma$ ), y están normalizadas al área sobre la que se ejercen estas fuerzas. En mecánica de medios continuos, se define un tensor de esfuerzos, consistente de nueve componentes  $\sigma_{ij}$  que definen completamente el estado de esfuerzos en un punto del material en las diferentes direcciones de las coordenadas espaciales elegidas [9].
- Deformación [8] [en inglés, *strain*]: Medida del cambio de forma de un material debido a un esfuerzo representando el desplazamiento entre partículas en el objeto relativas a una longitud de referencia. Es una cantidad adimensional, generalmente expresada en fracción o porcentaje de las dimensiones originales del material. Se representa por la letra  $\epsilon$ . En mecánica de medio continuo, la deformación es una cantidad tensorial, conocida como tensor de esfuerzos de Cauchy, donde cada componente  $\epsilon_{ij}$  representa la deformación de un punto del material en la dirección de las coordenadas espaciales elegidas [9]. La relación entre esfuerzo y deformación permite conocer el comportamiento de los materiales ante una fuerza que lo deforme. En la Fig. 4 se muestra una curva de esfuerzo-deformación típica para un metal.

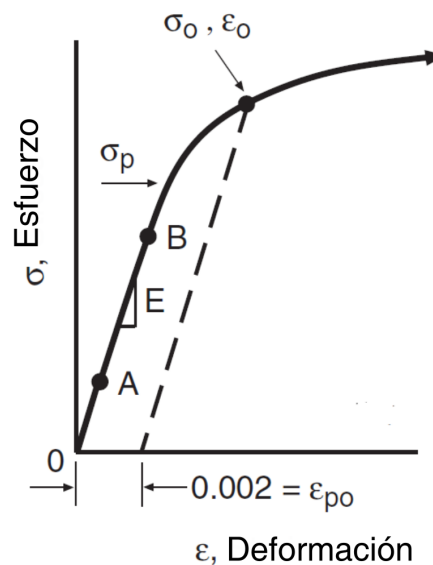


Figura 4: Curva de esfuerzo-deformación para un metal en una prueba de tensión uniaxial. Imagen adaptada de [10].



- Material elástico [8]: Material que regresa a su forma y tamaño original después de retirar una fuerza que ocasiona una deformación. Existen diferentes tipos de comportamientos elásticos:
  - Comportamiento linealmente elástico [8]: Presenta una relación entre esfuerzo y deformación lineal, de la forma  $\sigma = E\varepsilon$ . La constante de proporcionalidad  $E$  se conoce como módulo de Young. En la Fig. 4, se puede ver como la pendiente entre los puntos A y B, donde la relación entre esfuerzo y deformación es lineal. En SI se mide en Pa.
  - Elastómero o material tipo goma [11]: Material que puede recuperarse de deformaciones grandes rápidamente sin la necesidad de aplicar fuerza externa, y pueden soportar una alta deformación ( $\sim 300 - 500\%$ ) antes de romperse.
  - Material plástico [8]: Material sólido que presenta un cambio de forma irreversible en respuesta a una fuerza deformante. Al retirar la fuerza, el material no regresa a su forma original. A fuerzas pequeñas, dependiendo de las propiedades del material, ciertos materiales con comportamiento plástico pueden presentar un comportamiento elástico. Por ejemplo, en la Fig. 4, el comportamiento plástico se da después de pasar el esfuerzo al límite de proporcionalidad,  $\sigma_p$ . Después de este punto, la relación entre esfuerzo y deformación deja de ser lineal, y la deformación es irreversible.
- Coeficiente de Poisson [8]: Se representa por la letra  $\nu$ . Razón negativa entre la deformación transversal y la deformación longitudinal a la dirección de compresión o elongación.  $\nu = -\frac{d\varepsilon_{trans}}{d\varepsilon_{long}}$ . En la Fig. 5, se muestran las deformaciones que se utilizan para obtener el coeficiente de Poisson, siendo  $x$  la dirección longitudinal, mientras que  $y$  y  $z$  son las direcciones laterales. En la Fig. 5, si se ejerce un esfuerzo sobre el material en la dirección  $x$ , aumentará la longitud  $L$  en la dirección  $x$  y reducirá su diámetro en las direcciones  $y$  y  $z$ . Para este caso, un material elástico e isotrópico,  $\varepsilon_y = \varepsilon_z$ , y al graficar cualquiera de ellos con respecto a  $\varepsilon_x$ , se obtiene una recta con pendiente negativa. El coeficiente de Poisson  $\nu$  corresponde al negativo de esta pendiente. Para la mayoría de los materiales  $\nu > 0$ .

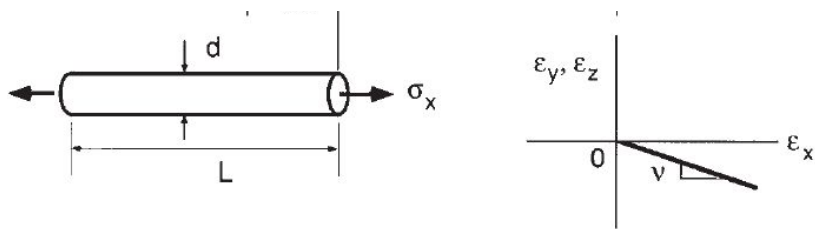


Figura 5: Extensión longitudinal y contracción lateral utilizadas para obtener el coeficiente de Poisson ( $\nu$ ) para un material linealmente elástico, isotrópico y homogéneo. Imagen adaptada de [10].

- Módulo biaxial [12]: En una deformación biaxial, por ejemplo un inflamiento, se define como 
$$Y = \frac{E}{1-\nu}$$

### 1.1.3 Comportamiento de una membrana circular sujeta a inflamiento

El *chip* que se presenta en este trabajo consiste en una membrana sobre la que se ejercen esfuerzos a partir de cambios de presión por medio de un canal microfluídico. Se decidió que la geometría que debía tener la sección de la membrana sujeta al esfuerzo tendría que ser circular, debido a las razones que se enumeran enseguida:

- En un principio, se consideró una geometría donde los canales a través de los cuales se ejercería la presión y la sección donde la membrana sería inflada presentarían una geometría rectangular, porque presentaba una forma de fabricación aparentemente sencilla, pues las formas con ángulos cuadrados son, en general, más fáciles de fabricar con las técnicas a nuestro alcance. Sin embargo, esta idea se descartó debido a que se encontró en la literatura que el esfuerzo que presenta una membrana cuadrada o rectangular es mayor con respecto a una membrana circular, ambas sujetas de los bordes [13].
- Por otro lado, en una membrana circular se tiene una condición de axisimetría con respecto a la distribución de esfuerzos; condición que no se tiene para una membrana cuadrada. Por ejemplo, en la Fig. 6 se muestra la distribución de esfuerzos de una membrana cerámica sometida a una presión [14], en lo que se conoce como prueba de abultamiento (*bulge test*), de la cual se hablará más adelante. Es evidente la condición de axisimetría de los esfuerzos en la membrana. Si bien, la membrana de la Fig. 6 es cerámica, mientras que la que se utiliza en esta tesis es polimérica, se utiliza este caso como ejemplo, ya que las propiedades mecánicas de membranas metálicas y algunas cerámicas permiten un tratamiento teórico más sencillo con respecto a membranas poliméricas.

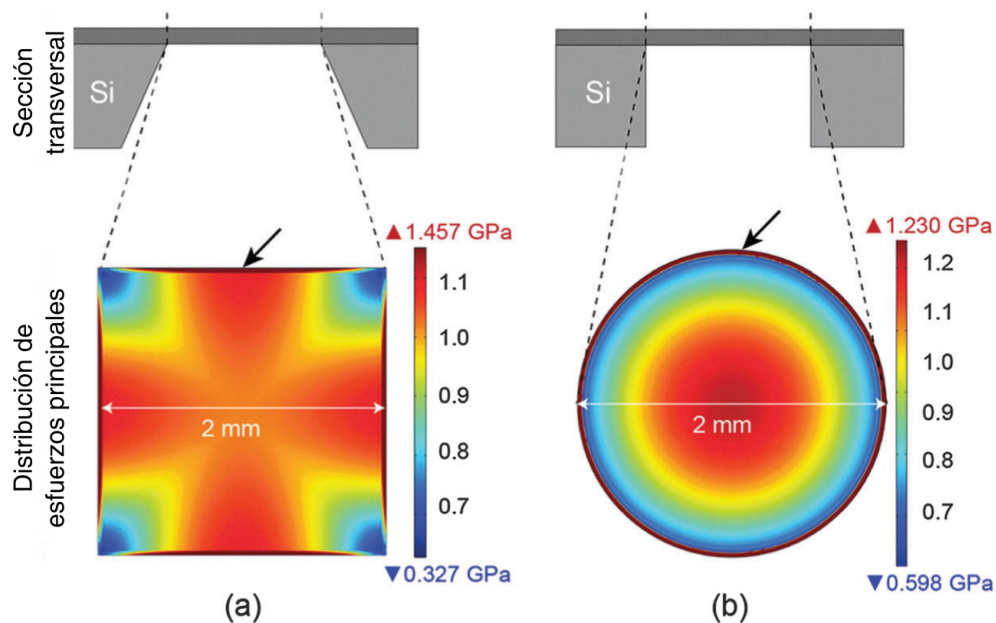


Figura 6: Distribución de esfuerzos principales en membranas cerámicas (circonia estabilizada con itrio) de forma cuadrada y circular. a) Membrana cuadrada de 2 mm de lado. b) Membrana circular de 2 mm de diámetro. Imagen obtenida de [14].

- Ya que el propósito del dispositivo es proporcionar estímulos mecánicos en células, la condición de axisimetría facilita la correlación del comportamiento cultivo celular con la geometría del dispositivo, una vez que las células se encuentren adheridas al dispositivo. Por ejemplo, se ha observado que las células modifican su comportamiento en respuesta a las condiciones mecánicas locales del sustrato sobre el que se encuentran [15]. Por otro lado, un sustrato circular permite una mayor uniformidad de las células al momento del sembrado [16]. Además, se ha visto que existen otros *chips* para cultivo celular que aprovechan la condición de axisimetría en la generación de esfuerzos para realizar cultivo [7].

Debido a las razones anteriormente expuestas se eligió una geometría circular para la sección de la membrana que se sometería a los esfuerzos transmitidos mediante la presión. El problema de una membrana circular sujeta por los bordes ha sido ampliamente abordado, tanto teórica como experimentalmente. El someter una membrana a un aumento de presión, y a partir de ello, obtener las propiedades mecánicas del material deformado es algo que se conoce como la prueba de abultamiento (*bulge test*, en inglés), e incluso se encuentra estandarizado para pruebas en producciones industriales de láminas metálicas [17]. El esfuerzo ejercido sobre una membrana en la prueba de abultamiento es biaxial, es decir que se generan esfuerzos en dos direcciones por cada punto de la membrana. El principio de operación de la prueba de abultamiento es el mismo que el dispositivo que se expone en esta tesis; con la diferencia de que la prueba de abultamiento está más enfocada hacia la caracterización de los materiales, y el *chip* de inflamamiento que se desarrolló está más enfocada a la generación de esfuerzos en el material para provocar un estímulo mecánico en las células que se llegaron a cultivar sobre el mismo. En lo que resta de esta sección, se expondrán distintos modelos teóricos que se han utilizado para caracterizar la prueba de abultamiento; de forma que se tenga una perspectiva más amplia para interpretar los resultados obtenidos de la caracterización del *chip* de inflamamiento. Cabe mencionar que los modelos más sencillos de la prueba de abultamiento están enfocados en materiales elásticos, tales como metales y cerámicos y que para la descripción de materiales poliméricos, se deben realizar suposiciones más fuertes.

La prueba de abultamiento fue propuesta por Beams en 1959 [18] y a partir de ella, se han realizado diversas modificaciones a dicha prueba. En [12], Small y Nix hacen un análisis de las ecuaciones planteadas para diversas consideraciones de una prueba de abultamiento para una membrana circular. Primeramente, hacen un estudio de las soluciones analíticas propuestas para este problema. El modelo más sencillo, propuesto por Beams [18], parte de la suposición de una membrana inicialmente plana, sin esfuerzos.

Para este caso, los esfuerzos en la membrana están dados por la ecuación

$$\sigma = \frac{PR}{2t} \quad (1)$$

Donde  $\sigma$  es el esfuerzo,  $P$ , la presión,  $R$  el radio de curvatura de la membrana, y  $t$  el espesor de la misma, asumiendo que se infla en forma de un casquete esférico, de acuerdo al diagrama que se muestra en la Fig. 7 [12].

Es importante comentar que a lo largo de este capítulo se utilizará el término presión como la presión en el interior de la membrana  $P_{int}$ , considerando una presión  $P = 0$  en el exterior de la membrana. Sin

embargo, se puede hacer una equivalencia si se considera presión exterior  $P_{ext} \neq 0$ , tomando  $P = P_{int} - P_{ext}$ .

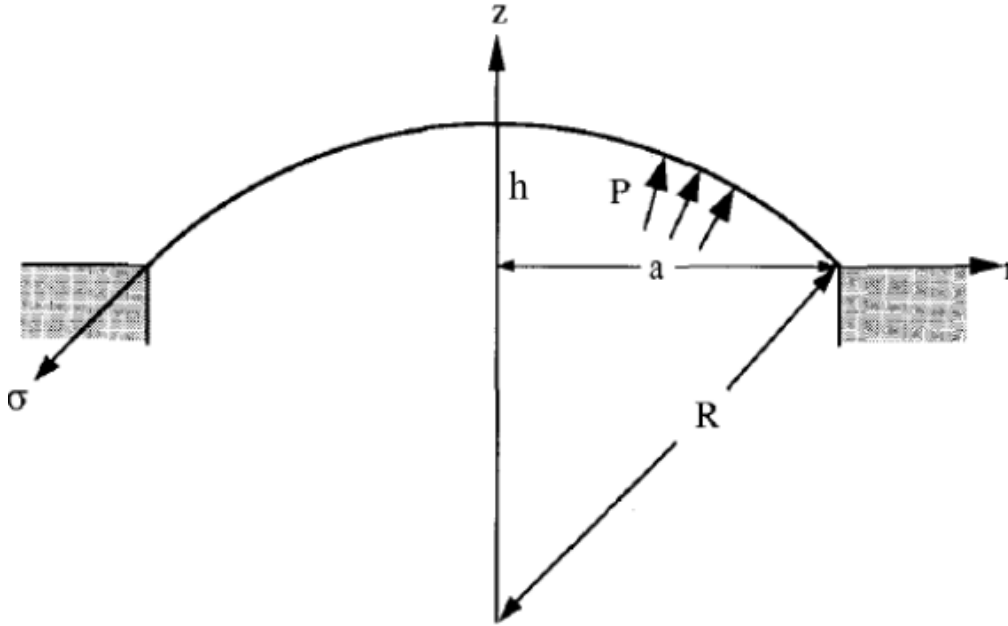


Figura 7: Casquete esférico utilizado para el inflamiento del modelo de Beams. Imagen obtenida de [12].

La ecuación (1) se puede expresar en términos de la altura del casquete esférico  $h$ , siempre y cuando la altura sea mucho menor que el radio ( $a$ ) de la membrana sin estirar [19].

$$\sigma = \frac{Pa^2}{4ht} \quad (2)$$

Y la deformación está dada por

$$\varepsilon = \frac{2h^2}{3a^2} \quad (3)$$

Según este modelo, la relación entre la presión y deformación para un material elástico es:

$$P = \frac{8Yt}{3a^4}h^3 \quad (4)$$

Siendo  $Y$  el módulo biaxial, definido como

$$Y = \frac{E}{1-\nu} \quad (5)$$

Donde  $E$  es el módulo de Young y  $\nu$ , el coeficiente de Poisson del material.

De acuerdo con Small y Nix, un número de autores han apuntado que las suposiciones del modelo de Beams, correspondientes a una membrana inicialmente plana y sin esfuerzos es solamente un caso especial, y que más comúnmente habría esfuerzos residuales en la membrana que causarían que ésta se encuentre tensa o flácida. Catlin y Walker [19] tomaron en cuenta el efecto de una membrana flácida al expresar la deformación debido a la presión como la diferencia entre la deformación debida a la altura total del abultamiento y la deformación aparente calculada a partir de la altura del bulto inicial debido a la flacidez  $h_0$ , que se resume en la Ec. (6) y se muestra en la Fig. 8.

$$\varepsilon = \frac{2}{3a^2}(h^2 - h_0^2) \quad (6)$$

El esfuerzo es una función de la presión, el radio de curvatura y la altura del casquete esférico, por lo que la Ec. (2) sigue teniendo validez, pero la presión necesaria para llegar a una altura dada, será menor a aquella necesaria para una membrana inicialmente plana.

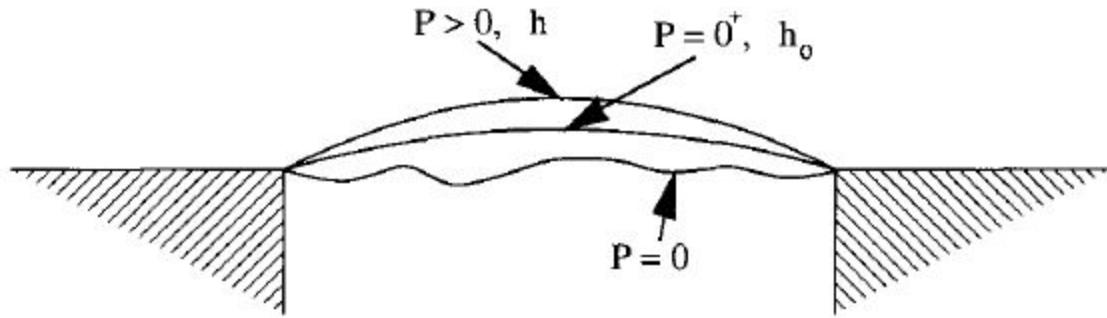


Figura 8: Prueba de abultamiento para una membrana flácida. Imagen obtenida de [13].

Estas consideraciones teóricas parten de la suposición de que la altura del casquete esférico se conoce exactamente. Sin embargo, experimentalmente es difícil conocer con precisión la altura del casquete, siendo los métodos interferométricos la forma más precisa para medir la altura de este casquete. El enfoque de Itozaki [20] para resolver este problema propuso que la altura total del bulto debería estar expresada como la suma del desplazamiento medido durante la prueba,  $\eta$ , y la altura al inicio de la prueba,  $h_i$ , como se muestra en la Fig. 9.

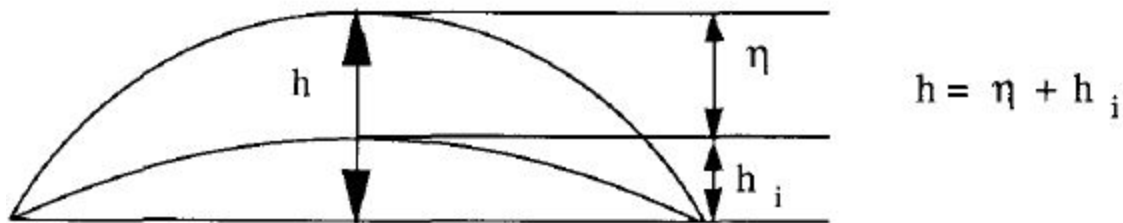


Figura 9: Distinción entre el desplazamiento medido ( $\eta$ ), y la altura real de la membrana ( $h$ ). Imagen obtenida de [12].

Con estas suposiciones, las ecuaciones (2) a (6) se resumen en la siguiente ecuación:

$$P = \frac{4Yt}{a^2}(h_i + \eta)\left[\frac{2}{3a^2}(h_i + \eta)^2 + A\right] \quad (7)$$

Siendo  $A$  un término para considerar la tensión o flacidez inicial de la membrana. Esta solución propone ajustar la ecuación (7) a los datos experimentales para reducir la incertidumbre en la medición de la altura.

Todas las ecuaciones anteriores fueron obtenidas bajo la suposición de que una membrana circular sujeta por los bordes se podría aproximar como la sección de una esfera, pero existen fallas en esta suposición. La primera de estas es que la ecuación para el esfuerzo en la película es indefinida para una película delgada ( $R = \infty$ ) a presión cero. Esta falla surge de que, para una película sin esfuerzos de torsión, ésta no presentaría resistencia a la deformación. Por lo tanto, se espera que las ecuaciones aplicables a una sección esférica no sean muy precisas para desplazamientos muy pequeños. Además, las ecuaciones de membrana esféricas están basadas en la suposición de un estado de esfuerzo y deformación equi-biaxiales en la totalidad de la película. Este estado no se encuentra presente en la prueba de abultamiento porque la restricción de sujeción en los bordes requiere que el esfuerzo a lo largo de la circunferencia sea cero en el borde. Hill [21] mostró que una película puede adoptar la

geometría de un casquete circular en una prueba de abultamiento, solamente si el esfuerzo en la película varía exponencialmente con la deformación (i.e.  $\sigma = \sigma_0 \exp(\varepsilon)$ , con  $\sigma_0$  una constante). Una curva de esfuerzo deformación de este estilo no es el comportamiento esperado para materiales reales [12].

Por otro lado, Small y Nix muestran otro enfoque propuesto por Tsakalakos [22], en donde los esfuerzos y curvaturas en la membrana son determinados directamente al resolver un equilibrio de fuerzas en un elemento de la superficie deformada. El resultado es una serie de ecuaciones diferenciales que se resolvieron numéricamente utilizando las condiciones de frontera: que el centro esté plano, es decir, que un plano horizontal sea tangente al centro; y que el borde de la membrana permanezca fijo a lo largo del borde. En este modelo, la forma de la membrana y las distribuciones de esfuerzos y deformaciones en la película son calculados, en lugar de asumidos. Sin embargo, el método no provee una solución analítica simple y no es fácilmente modificable para tomar en cuenta modificaciones a las condiciones iniciales no lineales.

Otro enfoque para abordar la prueba de abultamiento en una membrana esférica, propuesta por Timoshenko [23], consiste en asumir la forma de la membrana y obtener la distribución de esfuerzos y deformaciones al minimizar la energía de deformación del sistema con respecto a constantes dadas por la geometría del sistema. La relación que se obtiene para la presión con respecto a la altura, suponiendo un arco circular es:

$$P = \frac{Y(7-\nu)t}{3a^4} h^3 \quad (8)$$

El análisis por minimización de energía provee una mejor aproximación que el análisis partiendo de la membrana esférica [12].

Después de explorar estos métodos de abordaje del problema, Small y Nix proponen una formulación para determinar el comportamiento de una membrana delgada en una prueba de abultamiento [12]. Para ello, primero definen las condiciones de frontera. Primeramente, utilizan una suposición axisimétrica para reducir el problema tridimensional a un problema bidimensional. Y definen las condiciones de frontera de la siguiente manera:

$$u = 0 \quad \frac{dw}{d\xi} = 0, \text{ en } r = 0 \quad (9.1)$$

$$u = 0 \quad w = 0 \quad \frac{dw}{d\xi} = 0, \text{ en } r = a \quad (9.2)$$

Donde  $u$  y  $w$  son desplazamientos en las direcciones  $r$  y  $z$ ; y  $\xi$  es la distancia a lo largo de la membrana desde  $r = 0$ . Las condiciones de frontera (9.1) dictan que el centro de la membrana permanecerá a lo largo del eje de simetría y que la parte superior de la membrana se encontrará plana. Las condiciones (9.2) modelan el efecto de la sujeción a los bordes, al mantener el eje fijo e impidiendo que la membrana rote en esos puntos. Para este modelo, se parte de la suposición de una membrana linealmente elástica, y se utilizan las constantes mecánicas del aluminio, por ser un metal elástico de propiedades mecánicas conocidas, y realizan tres suposiciones iniciales: membrana sin esfuerzo inicial, membrana flácida y membrana estirada. En el estudio, se aumenta la presión en un lado de la membrana hasta que la membrana llegue a la altura deseada, y a partir del comportamiento, se pueden obtener curvas de esfuerzo deformación, en las direcciones normales y tangenciales a la circunferencia de la membrana. Small y Nix realizaron la simulación [12] utilizando el programa MARC [24].

A partir de su modelo de elementos finitos, para mejorar la precisión de la prueba de abultamiento proponen que se use la ecuación,

$$P = \frac{4Yt}{a^2}(h_i + \eta)\left[\frac{2}{3a^2}(h_i + \eta)^2 + \frac{\sigma_0}{Y}\right] \quad [10]$$

como una modificación a la ecuación de Itozaki. Esta ecuación se puede utilizar para ajustar los datos en una prueba de abultamiento, y obtener la altura inicial ( $h_i$ ), el módulo biaxial ( $Y$ ) y el esfuerzo inicial ( $\sigma_0$ ) sobre la membrana. Posteriormente, se puede utilizar la ecuación siguiente para corregir el módulo biaxial:

$$Y = \frac{Y_{cac}}{1-0.24\nu-0.00027(1-\nu)\sigma_0} \quad [11]$$

Un punto a resaltar que mencionan Small y Nix, consiste en que, para una prueba de abultamiento para una membrana circular, el realizar la prueba sobre una membrana con arrugas, la suposición de axisimetría no es válida. El modelo de elementos finitos presentado en el análisis de Small y Nix muestran una dependencia de la presión con la altura de la membrana a la tercera potencia ( $P \sim h^3$ ), mientras que diversos datos experimentales obtenidos en membranas arrugadas, muestran una dependencia cuadrática ( $P \sim h^2$ ). Los modelos disponibles no son suficientes para modelar una membrana con arrugas. [12] Cabe recalcar que el desarrollo realizado por Small y Nix está enfocado a la prueba de abultamiento en membranas metálicas, delgadas, y en el límite elástico.

Los modelos mostrados en [12] parten de la suposición de una membrana delgada, es decir, donde el espesor de la membrana es despreciable con respecto al radio de la membrana, y enfocado a membranas metálicas, por ser un material elástico. En otro modelo presentado en [25] por Jianbing *et al.* muestran un análisis de las propiedades mecánicas de una membrana circular polimérica ante presión uniforme, considerando una membrana con espesor. Ellos parten de un modelo constitutivo, publicado en [26] a partir de la modificación a un modelo de Gao [27], para la función de energía de deformación para materiales tipo goma incompresibles:

$$W = A[(I_1^n - 3^n) + \alpha(I_2^n - 3^n)] \quad [12]$$

Donde:

$W$  : Energía de deformación

$A, n, \alpha$  : Constantes del material

$I_1, I_2$  : Primer y segundo invariantes del tensor izquierdo de deformación de Cauchy–Green.

A partir de esta energía de deformación, Jianbing *et al.*, modelan una membrana polimérica hiperelástica sometida a presión uniforme, que se asemeja más al problema que nos interesa. Un material hiperelástico consiste en un material cuyo comportamiento se puede derivar de una función de densidad de energía de deformación ( $W$ ). Ellos obtienen ecuaciones constitutivas de la membrana, así como el comportamiento de los esfuerzos normales y tangenciales en la membrana. Se muestra a continuación un resumen de este modelo:

Primeramente, definen un sistema de referencia sobre la membrana a partir de coordenadas cilíndricas. En la configuración del observador, la geometría de la membrana polimérica está descrita en términos de coordenadas polares cilíndricas ( $R, \Theta, Z$ ), mientras que en el sistema de referencia de la membrana,

la geometría está descrita en términos de las coordenadas polares cilíndricas  $(r, \theta, z)$ , como se ve en la Fig. 10 [25].

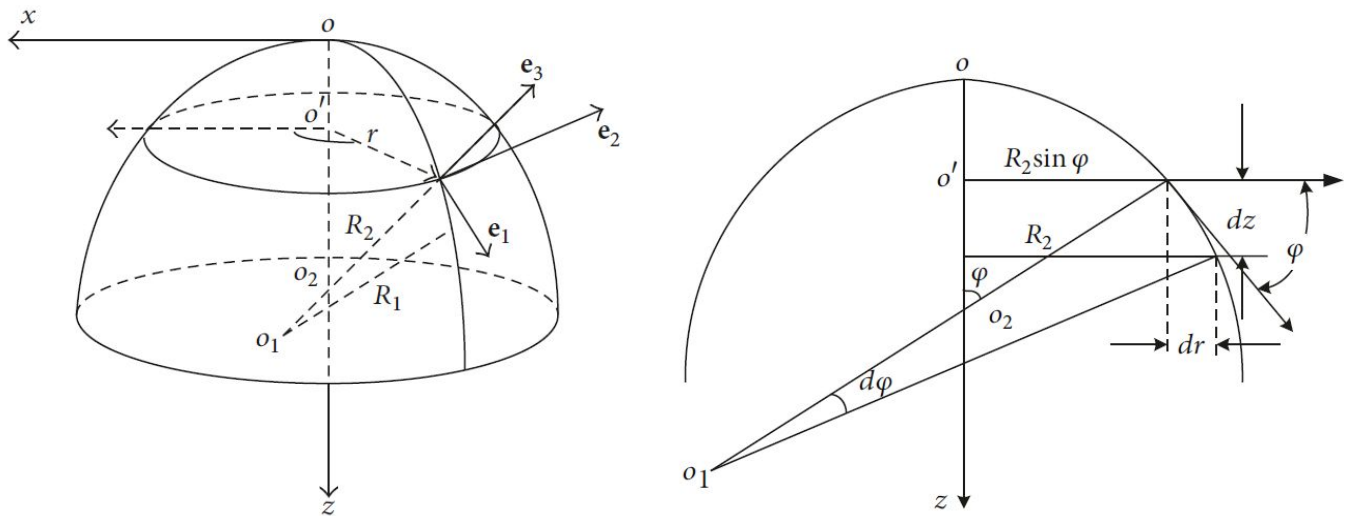


Figura 10: Izq. Diagrama de la membrana deformada bajo presión. Der: Sección transversal del cascarón formado por la membrana después de inflarse. Figuras obtenidas de [25].

Antes de la deformación, el radio de la membrana circular es  $a$  y su espesor  $H$ . Después de la deformación, la membrana se transforma en un cascarón delgado. En el sistema de referencia de la membrana las deformaciones principales se pueden definir como:

$$\begin{aligned}\lambda_1 &= \frac{ds}{dR} = \frac{dr}{\cos \varphi dR} \\ \lambda_2 &= \frac{r}{R} \\ \lambda_3 &= \frac{h}{H}\end{aligned}\quad (13)$$

Así,  $\lambda_1$  es la deformación principal a lo largo de la dirección tangencial de longitud,  $\lambda_2$  es la deformación principal a lo largo de la dirección tangencial de latitud y  $\lambda_3(R)$  es la deformación principal a lo largo de la dirección normal al cascarón.

Para una membrana sometida a una presión  $P$ , se obtienen las siguientes ecuaciones gobernantes:

$$\begin{aligned}\frac{d}{dr}(rT_1) &= T_2 \\ \frac{dz}{dr} &= \tan \varphi \\ \frac{d\lambda_2}{dr} &= \frac{\lambda_2}{r} \left(1 - \frac{\lambda_2}{\lambda_1 \cos \varphi}\right) \\ \sin \varphi &= \frac{rP}{2T_1}\end{aligned}\quad (14)$$

donde  $T_i = H \lambda_3 \sigma_i$ , siendo  $\sigma_i$  el esfuerzo en la dirección  $i$ .

A partir de este modelo, obtienen el comportamiento para el desplazamiento vertical de la membrana, el estrés radial y el estrés perimetral, que se muestran en la Fig. 11. En esta figura, los desplazamientos se encuentran normalizados con respecto al radio de la membrana antes del inflamiento  $a$ ; mientras



que las presiones y esfuerzos se encuentran normalizados a la constante  $A$ , que en este formalismo es una constante del material [25].

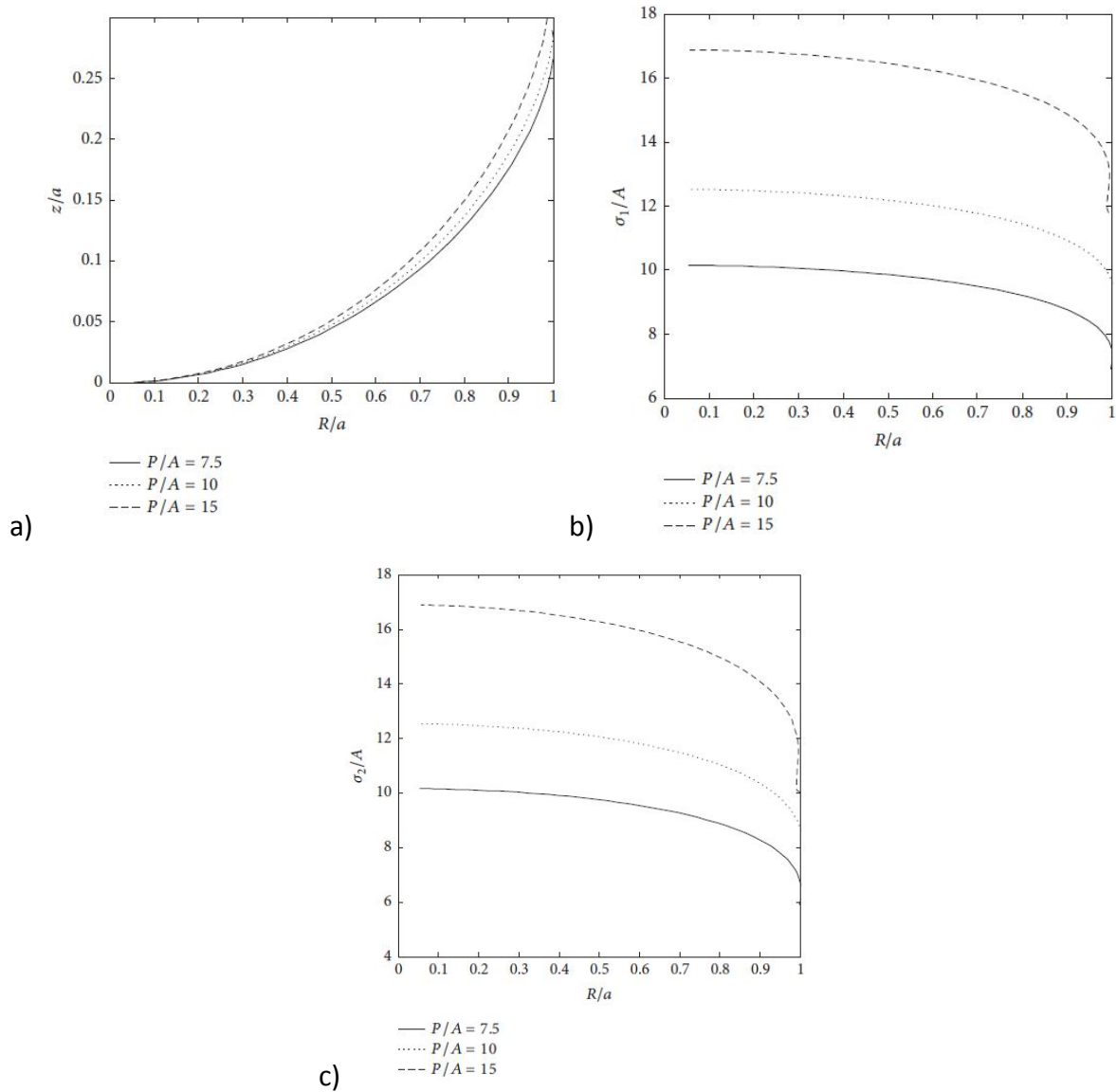


Figura 11: Comportamiento de las propiedades de una membrana hiperelástica, en función de la distancia del punto al eje vertical ( $R/a$ ), para diferentes presiones ( $P/a$ ). a) Desplazamiento vertical. b) Esfuerzo radial. c) Esfuerzo tangencial. Los parámetros se hicieron adimensionales. Figuras obtenidas de [25].

La prueba de abultamiento se ha utilizado principalmente para realizar pruebas sobre membranas metálicas y semiconductoras, pero también, en menor medida, se ha utilizado para medir las propiedades mecánicas de membranas poliméricas [28,29]. Esto es debido a que, como se mencionó a lo largo de esta sección, se deben de tener en cuenta muchos más factores en el análisis de la prueba de abultamiento para membranas poliméricas que para membranas de metales o semiconductores. La prueba de abultamiento no solamente es útil para caracterizar las propiedades de membranas metálicas o poliméricas, sino que también se ha adaptado esta prueba para caracterizar las propiedades mecánicas de tejidos biológicos, por ejemplo, piel [30–33].

Los modelos teóricos presentados en esta sección parten de la suposición de una única membrana que es sometida a un proceso de inflamamiento. El modelaje de una membrana multicapa debe tomar en consideración las propiedades individuales de cada uno de los materiales componentes: espesor, comportamiento mecánico del material; así como el acoplamiento entre los dos componentes de la membrana. Por ejemplo, Finot y Suresh [34] modelan diversas variaciones de un sistema multicapa, de dos y tres capas sujeta a expansión termoelástica. Exploran primero el caso de ambos materiales con respuesta elástica y pequeñas deformaciones, luego el de deformaciones grandes, pasan al caso en donde se empieza a tener un comportamiento plástico, posteriormente consideran el caso donde se aumenta el espesor de las membranas, y abordan posteriormente un caso donde se considera una membrana intermedia con un gradiente de rigideces entre las dos membranas iniciales. Como se mencionará a lo largo de este trabajo, el dispositivo que se presenta en esta tesis se compone de una membrana que presenta un comportamiento plástico, con un recubrimiento elástico de baja rigidez, y al ejercer las deformaciones, éstas son mayores al espesor de la membrana. Por lo tanto, para realizar el modelaje teórico del dispositivo presentado en este trabajo se debe tener en consideración todos estos elementos.

Por último, con respecto al comportamiento de una membrana polimérica de dos capas, se ha observado que cuando una de dichas capas presenta una deformación más allá de su límite elástico, y otra de ellas tiene un comportamiento elástico, la energía elástica almacenada en la parte elástica puede proveer una fuerza restitutiva que revierta la deformación plástica para cierto rango de deformaciones [35].

Cabe mencionar que esta tesis se enfocó en la fabricación del dispositivo de inflamamiento; y no en la realización de una prueba de abultamiento. Sin embargo, el modelaje de la prueba de abultamiento con una membrana circular resulta útil para interpretar el comportamiento final de la respuesta del *chip* a una presión de inflamamiento que se presenta en este trabajo. En particular, se utiliza la suposición de casquete esférico mostrado en la Fig. 6; la consecuencia de la flacidez de la membrana sobre el comportamiento de inflamamiento mostrado en la Fig. 8 y las consideraciones que se acaban de mencionar sobre que la membrana se componga de dos materiales con distintos comportamientos individuales.

## 1.1.4 Materiales utilizados en la fabricación del dispositivo de inflamamiento

En esta sección se presenta una breve descripción de los materiales utilizados para la fabricación del *chip*. El método más desglosado se presenta en la sección [2.1.2 Protocolo para la fabricación del dispositivo de inflamamiento biaxial](#):

### Polidimetilsiloxano (PDMS)

Elastómero perteneciente a un grupo de compuestos organosilícicos, conocidos como siliconas. Es un polímero en general químicamente inerte, biocompatible, transparente a la luz visible no tóxico y no flamable [36].

Presenta la estructura química que se presenta en la Fig. 12.

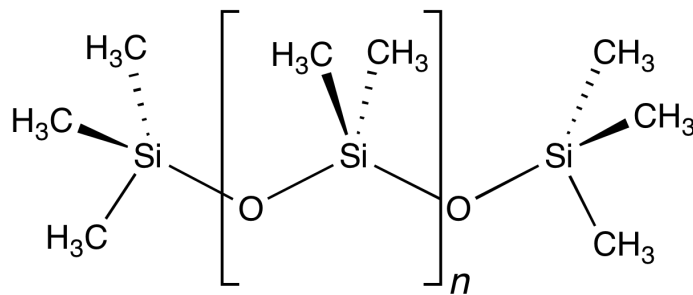


Figura 12: Estructura química del Polidimetilsiloxano

Se utiliza en técnicas de molde réplica de litografía suave, debido a la capacidad de réplica de unos cuantos nanómetros de las estructuras de un molde micromaquinado [37]. Es un material muy utilizado para la fabricación de dispositivos microfluídicos. En particular, la formulación que se utilizó en este proyecto consiste en el PDMS Sylgard™ 184 de Dow Corning®, para realizar los canales microfluídicos. Este material se polimeriza por medio de energía térmica, con temperaturas de curado que pueden ir desde 25°C hasta 150°C, según las especificaciones del fabricante. [38]

El PDMS presenta una elasticidad de tipo goma con un módulo de Young  $E \sim 1.3 \text{ MPa}$  y de Poisson  $\nu \sim 0.5$  reportados para la presentación y tipo de preparación que utilizamos [39]. En este trabajo, se utiliza para la fabricación del *chip* de inflamamiento con canales microfluídicos, sobre el cuál se colocará la membrana del adhesivo fotocurable Loctite 3525 con el recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida.

## Polimetilmetacrilato (PMMA)

Poly (metil methacrilato) (PMMA) es un polímero sintético del monómero metil metacrilato, cuya estructura química se presenta en la Fig. 13.

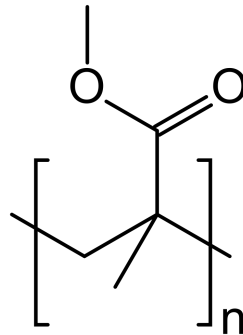


Figura 13: Estructura química del polimetilmetacrilato (PMMA).

Es un termoplástico transparente, utilizado ampliamente como un sustituto de vidrio inorgánico, debido a que muestra alta resistencia al impacto, es ligero, resistente al impacto y exhibe condiciones favorables de procesamiento [40].

El PMMA se ha utilizado como un molde para realizar réplicas dentro del marco de la litografía suave [41]. En este trabajo se utiliza para fabricar los moldes maestros para la réplica del *chip* de inflamamiento, a partir del procesamiento por microfresado.

## Intermediate Polymer Stamp (IPS)

Polímero patentado por Obducat®, para su uso en técnicas de litografía por nanoimpresión (NIL), proceso del que se hablará más adelante. Este polímero se utiliza como un intermediario para transferir el diseño del molde duro en un proceso de NIL a este polímero, para después ser transferido al sustrato rígido sobre el cual se desea realizar la litografía [42].

En este proyecto, este material fue utilizado para obtener la réplica del patrón de difracción de un DVD; para después ser transferido al *chip* de inflamamiento. Esta réplica fue obtenida mediante la técnica de litografía por nanoimpresión, con la finalidad de probar que es posible la microestructuración de una membrana de Loctite 3525 en el *chip* de inflamamiento. Además, aprovechando sus propiedades antiadherentes, se utilizó este material para lograr que el recubrimiento del hidrogel sobre el *chip* sea plano.

## Loctite 3525

Adhesivo fotocurable basado en acrilatos, optimizado para adhesión de alta resistencia para unir vidrio, metales y plásticos para aplicaciones industriales. Se ha utilizado previamente en nuestro laboratorio para adherir hidrogeles de poliácridamida a sustratos de PDMS [43], o para fabricar cajas de cultivo recubiertas con hidrogel de poliácridamida [44]. El Loctite 3525 es compatible con microscopía de fluorescencia, y prueba de esto es que, en las referencias mencionadas se utilizan distintos fluorocromos para el marcaje de los andamios celulares, tales como: calceína y yoduro de propidio, kit para detectar

apoptosis con fluoresceína, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594. La resina Loctite fluoresce fuertemente en el espectro UV [43]. No obstante, se puede utilizar microscopía confocal para generar un mejor contraste en la señal, si las imágenes que se están tomando así lo requieren.

En el dispositivo que se presenta en este trabajo el Loctite 3525 se utiliza como un sustrato que se adhiere al bloque de PDMS donde se encuentran los canales microfluídicos y la cámara de inflamamiento, y sobre el cual se polimeriza el hidrogel de poli(acrilamida) que será sujeto del inflamamiento. Como se mencionó anteriormente, el PDMS, se puede polimerizar desde una temperatura de 25°C hasta una temperatura de 150°C. Cuando el PDMS y el Loctite 3525 se utilicen en conjunto, se debe mantener la temperatura durante los procesos de fabricación en un intervalo compatible con ambos materiales; es decir, a una temperatura inferior a los 50°C, que corresponde a la temperatura de transición vítrea del Loctite 3525. El Loctite 3525 tiene un módulo de Young esperado de 175 MPa [45].

## Hidrogel de poli(acrilamida)

Desde su introducción, los hidrogeles de poli(acrilamida) han probado ser muy útiles para estudios de interacciones mecánicas en la interfaz célula-sustrato, y se han ido utilizando frecuentemente para el estudio de mecánica celular [46]. Estos geles producen una deformación lineal en respuesta a un intervalo amplio de esfuerzos y muestran una rápida y completa recuperación al eliminar el esfuerzo. Los hidrogeles de poli(acrilamida) son transparentes y no fluorescentes, lo que facilita la visualización por microscopía de procesos celulares. Además es posible enlazar covalentemente proteínas de interés a la superficie del sustrato; superficie que, de lo contrario, es no adherente [46]. El entrelazamiento de proteínas a la superficie del hidrogel se ha utilizado ampliamente para estudios de cultivo celular [47–52].

La reacción estándar de polimerización de la acrilamida se menciona enseguida. La acrilamida, y su entrecruzante, bis-acrilamida, se combinan en solución con iniciadores (TEMED y persulfato de amonio) para disparar una polimerización por radicales libres de dobles enlaces en los monómeros de acrilamida y bis-acrilamida. Debido a que el oxígeno actúa como una trampa de radicales libres y puede alentar o incluso impedir la reacción de polimerización, la solución se coloca en una cámara de vacío antes de la adición de los iniciadores para remover el oxígeno disuelto en las soluciones de los geles. [46] Para preparar una capa delgada de hidrogel, una pequeña cantidad de mezcla se deposita sobre un sustrato hidrofílico, típicamente un cubreobjetos activado por glutaraldehído, colocando un cubreobjetos encima. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles se pueden controlar variando la concentración de bis-acrilamida en la mezcla. En particular, existe un protocolo [53] que muestra una tabla con las cantidades de acrilamida y bis-acrilamida necesarias para obtener cierta rigidez necesaria. Las cantidades necesarias se muestran en la Fig. 14.

Acrilamida %	Bis-acrilamida %	Acrilamida de una solución de reserva al 40% (ml)	Bis-acrilamida de una solución de reserva al 2% (ml)	Agua (ml)	$E \pm \text{St. Dev.}$ (kPa)
3	0.03	0.75	0.15	9.1	$0.20 \pm 0.03$
3	0.06	0.75	0.3	8.95	$0.48 \pm 0.16$
3	0.1	0.75	0.5	8.75	$1.10 \pm 0.34$
3	0.15	0.75	0.75	8.5	$1.37 \pm 0.22$
3	0.225	0.75	1.125	8.125	$1.67 \pm 0.14$
3	0.3	0.75	1.5	7.75	$1.78 \pm 0.19$
4	0.03	1	0.15	8.85	$0.71 \pm 0.24$
4	0.06	1	0.3	8.7	$1.16 \pm 0.54$
4	0.1	1	0.5	8.5	$2.01 \pm 0.75$
4	0.15	1	0.75	8.25	$2.55 \pm 0.17$
4	0.225	1	1.125	7.875	$3.13 \pm 0.42$
4	0.3	1	1.5	7.5	$3.24 \pm 0.58$
5	0.03	1.25	0.15	8.6	$1.00 \pm 0.31$
5	0.06	1.25	0.3	8.45	$1.80 \pm 0.44$
5	0.1	1.25	0.5	8.25	$3.15 \pm 0.85$
5	0.15	1.25	0.75	8	$4.47 \pm 1.19$
5	0.225	1.25	1.125	7.625	$8.44 \pm 0.82$
5	0.3	1.25	1.5	7.25	$8.73 \pm 0.79$
8	0.048	2	0.24	7.76	$2.61 \pm 0.82$
8	0.264	2	1.32	6.68	$19.66 \pm 1.19$
8	0.48	2	2.4	5.6	$40.40 \pm 2.39$
10	0.03	2.5	0.15	7.35	2.83
10	0.06	2.5	0.3	7.2	7.43
10	0.1	2.5	0.5	7	10.61
10	0.15	2.5	0.75	6.75	16.70
10	0.225	2.5	1.125	6.375	23.43
10	0.3	2.5	1.5	6	34.88

Esta tabla muestra las concentraciones relativas de acrilamida y bis-acrilamida y su módulo de elasticidad esperado después de la polimerización en agua. La acrilamida y la bis-acrilamida pueden mantenerse premezcladas en solución por durante semanas o meses a 4°C. Al menos 3 hidrogeles por muestra y 50 indentaciones por hidrogel fueron realizadas para estas mediciones.

Figura 14: Valor esperado del Módulo de Elasticidad después de la polimerización de concentraciones relativas de Acrilamida y Bis-Acrilamida. Tabla adaptada de [53].

En este trabajo, se consideró importante poder ejercer un estímulo biaxial de inflamamiento a un hidrogel de poliacrilamida; y que además pudiera modificarse dicho estímulo una vez establecido. Por lo tanto, se desarrolló un *chip* de inflamamiento que pudiera ser utilizado con hidrogeles de poliacrilamida. Esto con vistas a que en un futuro se pueda realizar cultivo celular sobre estos hidrogeles, y se tenga un mecanismo de ejercer este tipo de señales mecánicas sobre las células.

## 1.1.5 Técnicas de fabricación utilizadas en el dispositivo de inflamamiento

A continuación, se mencionan las técnicas de fabricación utilizadas durante la fabricación del dispositivo presentado en este trabajo:

### Litografía suave

La microfabricación es el proceso de fabricar estructuras miniaturas de escalas micrométricas e inferiores. Históricamente, los procesos más tempranos fueron utilizados para la fabricación de circuitos integrados [54]. Hoy en día, la microfabricación utiliza una variedad de técnicas de estructuración, siendo la más poderosa de estas la fotolitografía; tecnología que se utiliza en la fabricación de circuitos integrados [55,56]. A pesar de que la fotolitografía es la tecnología dominante, incluso para estructuras micrométricas, no siempre es la mejor o la única opción para todas las aplicaciones. Por ejemplo, es una tecnología cara, la fabricación de estructuras no planares no es la óptima, provee un control muy pequeño sobre la química de superficie, por lo que no es muy flexible en la generación de patrones de funcionalidades químicas específicas en la superficie, sólo puede generar microestructuras bidimensionales, y es directamente aplicable únicamente a un conjunto limitado de materiales fotosensibles (fotorresinas) [37].

Whitesides y su grupo desarrollaron un conjunto alternativo, no fotolitográfico de métodos de microfabricación, que ellos le llamaron litografía suave, porque todos sus miembros comparten la característica en común de utilizar un elastómero estructurado como el sello, molde o máscara, a diferencia de una fotomáscara rígida para generar micropatrones y microestructuras [37].

### Molde réplica

Dentro de las técnicas pertenecientes a la litografía suave, se encuentra la técnica de molde réplica. En esta técnica, se obtiene una réplica de un polímero orgánico (p. ej. PDMS) contra un molde. La litografía suave provee una estrategia para la fabricación de micropatrones complejos en superficies [57].

El PDMS utilizado en estos experimentos viene en dos componentes: una base y un agente curante. Los grupos silanos presentes en el agente curante reaccionan con los grupos vinilos presentes en la base y forman un sólido elastomérico entrecruzado. Para producir una réplica, se mezclan las dos partes juntas, típicamente en una proporción 10:1 (v/v) base:agente curante, se vierte el prepolímero líquido sobre el molde, y se polimeriza. El prepolímero de PDMS líquido adquiere la forma del molde y replica las estructuras del molde con alta resolución, del orden de decenas de nm. La baja energía libre de superficie y elasticidad del PDMS le permiten ser retirado de los moldes sin causar daño al molde o a sí mismo [58].

La técnica de molde réplica se utiliza en este trabajo para obtener el *chip* de PDMS a partir de un molde de PMMA.

## Sellado del *chip* de PDMS por exposición a un plasma de aire

Una ventaja del PDMS es que puede sellarse a sí mismo, o a otras superficies, reversible o irreversiblemente sin ninguna distorsión de los canales. El sello de los canales de PDMS es sustancialmente más simple que el sellado de canales en vidrio, silicio o termoplásticos. El PDMS que ha sido moldeado contra una superficie lisa puede conformarse a un contacto con otras superficies lisas, incluso si estas superficies no sean planas, debido al hecho que el PDMS es un elastómero. Un sello reversible proporcionado por simples fuerzas de van der Waals es hermético para agua, pero no puede soportar presiones mayores a 5 psi. Una cinta adhesiva también sella los canales de PDMS reversiblemente [58]. Para formar un sello irreversible, se expone el PDMS y la superficie a sellar a un plasma de aire por 1 min [59]. Este tratamiento genera grupos silanol (Si-OH) en la superficie del PDMS, por la oxidación de grupos metilo. El PDMS con la superficie oxidada puede generar un sello a sí mismo, vidrio, poliestireno, polietileno o nitruro de silicio, siempre y cuando estos materiales también hayan sido expuestos a un plasma de aire [58].

Como se verá más adelante, en la sección Fabricación del dispositivo de inflamamiento biaxial, estas capacidades de sellado se utilizan para fabricar el dispositivo presentado en este trabajo: irreversiblemente, para adherir el PDMS al portaobjetos de vidrio, el PDMS a la membrana de Loctite 3525; y reversiblemente para sellar uno de los canales del *chip* durante el inflamamiento.

En la Fig. 15, se muestra el proceso de molde-réplica y sellado de un *chip* microfluídico utilizando PDMS [58]. En la figura, se utiliza un molde de Silicio microestructurado. Sin embargo, se pueden utilizar otros moldes; por ejemplo para el dispositivo que se presenta en este trabajo, se utiliza un molde de PMMA.



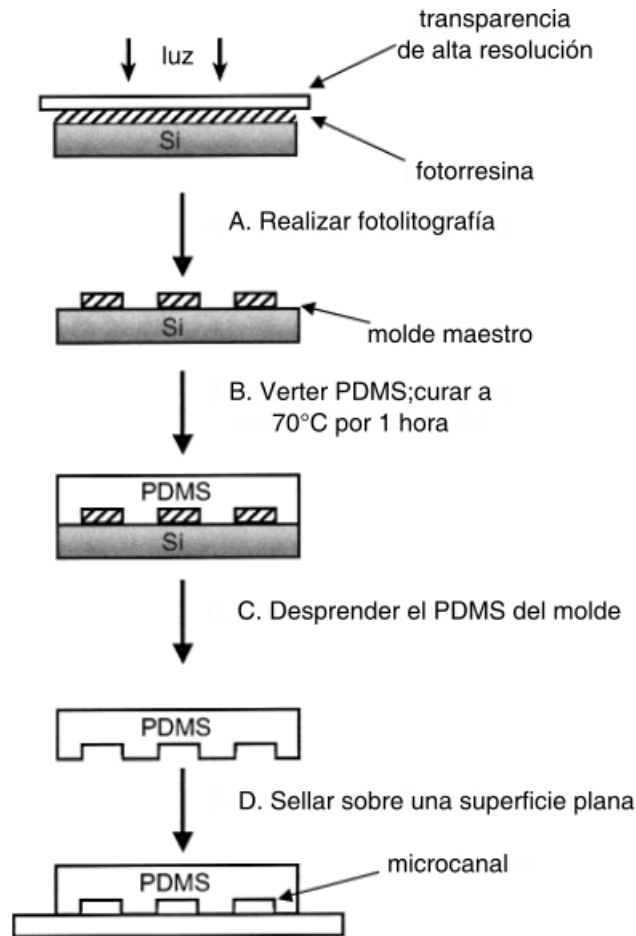


Figura 15: Diagrama del proceso de molde réplica utilizando PDMS sobre un molde y el sellado de los canales en otra superficie. Imagen adaptada de [58].

## Micromaquinado por CNC para la obtención de un molde para la técnica de molde réplica

Para el proceso de molde réplica, el molde representa un papel fundamental durante la fabricación. Hoy en día, existen una variedad bastante amplia de materiales y técnicas para obtener estos moldes. De todos los materiales comúnmente utilizados en microfluídica, los plásticos permanecen como una primera opción debido a sus diversas propiedades favorables y en particular la compatibilidad con aplicaciones biológicas. Los plásticos son un material de bajo costo y sus procesos de manufactura son escalables a manufacturas de alto volumen [60]. Diferentes métodos de fabricación y estructuración de plásticos se encuentran disponibles hoy en día, con cada uno de ellos ofreciendo distintas ventajas y limitaciones.

Uno de estos métodos de fabricación que se ha utilizado en este proyecto consiste en el microfresado (en inglés *micromilling*). El microfresado es una técnica de manufactura sustractiva, es decir en donde las estructuras se producen al eliminar el material de un bloque sólido para obtener el diseño deseado. El microfresado utiliza herramientas de corte rotativas para remover material de una pieza inicial, generalmente conocida como la pieza de trabajo. El sistema de fresado se compone de: una mesa de trabajo para posicionar la pieza de trabajo, una herramienta de corte (generalmente una fresa de

acabado) y un rotor que opera en una posición superior a la pieza, que asegura y hace rotar la herramienta de corte [60].

Los equipos de fresado actuales utilizan control numérico por computadora (CNC), que automatiza el proceso, ajustando las posiciones de la mesa de trabajo (ejes X y Y) y del rotor (eje Z). Esto permite la conversión directa de diseño asistido por computadora (CAD, por sus siglas en inglés) en estructuras terminadas, haciendo más fácil y rápida la conversión del diseño en prototipos funcionales, con una resolución que puede llegar a la escala micrométrica [60]. El microfresado puede ser utilizado en aplicaciones microfluídicas para dos funciones principales: el maquinado del molde [61] utilizado en subsecuentes etapas de fabricación para replicar el diseño en otro material o el maquinado de microcanales directamente en la pieza final.

Para este trabajo, se utiliza el maquinado CNC para fabricar un molde de polimetilmetacrilato (PMMA) para su uso como molde para la técnica de molde réplica. El PMMA se ha utilizado anteriormente para realizar moldes para la técnica de molde réplica, tanto en otros grupos de trabajo [41] como dentro del laboratorio donde se ha realizado el presente trabajo [62].

## Fabricación de membranas utilizando spin-coating

El proceso de recubrimiento por giro (*spin coating*) se utiliza para la fabricación de películas delgadas. En este proceso, un pequeño volumen (gota) del material que se va a utilizar para recubrir se deposita en el centro del sustrato, que después es girado a velocidad controlada. En el proceso de *spin coating*, el sustrato gira alrededor de un eje que debe ser perpendicular al área a recubrir. Como resultado, el recubrimiento se esparce hacia el borde, y eventualmente, fuera de este dejando una película delgada del recubrimiento sobre la superficie. El espesor final y otras propiedades del recubrimiento dependerán de la naturaleza del líquido utilizado (esencialmente su viscosidad), tasa de secado, porcentaje de sólidos, tensión superficial, etc, y los parámetros elegidos para el proceso de recubrimiento, tales como la velocidad de rotación y las rampas de aceleración y desaceleración de inicio y término del proceso [63]. En general, el espesor ( $t$ ) del proceso de recubrimiento por giro se modela considerando la viscosidad del líquido ( $\eta$ ) y la velocidad de giro ( $\omega$ ), de acuerdo a la ecuación (15) [64]:

$$t \sim \eta^{1/2} \omega^{-1/2} \quad (15)$$

En este trabajo, se utilizó el proceso de recubrimiento por giro para depositar una membrana de Loctite 3525 sobre una membrana microestructurada de IPS.

## Microestructuración de un polímero por litografía por nanoimpresión

La litografía por nanoimpresión (NIL, por sus siglas en inglés, *nanoimprint lithography*) se refiere a la transferencia inducida por presión de un molde rígido, usualmente de silicio, en una película polimérica de un termoplástico o resina fotosensible según el método empleado para transferir patrones. En el primer caso, la muestra es calentada por arriba de la temperatura de transición vítrea [65] y en el otro se usa luz ultravioleta para polimerizar el material que replica el molde. En un proceso estándar de litografía por nanoimpresión, una muestra delgada del material a imprimir se coloca en el equipo. El molde, que tiene patrones topológicos predefinidos, se pone en contacto con la muestra y se ejerce presión sobre ellos. Cuando la muestra es calentada a una temperatura superior a la temperatura de transición vítrea del polímero o expuesta a la luz UV (según el caso), el patrón en el molde se transfiere por presión en la película del polímero antes de endurecerlo [66].

En este trabajo, la membrana de Loctite 3525 presente en el *chip* se microestructura realizando *spin coating* sobre un sustrato de una membrana IPS que fue microestructurada por litografía por nanoimpresión.

## Uso de Loctite 3525 como promotor de adhesión para hidrogeles de Poliacrilamida

El adhesivo fotocurable por UV Loctite 3525 se ha utilizado como un promotor de adhesión sobre el cual se pueden polimerizar hidrogeles de poliacrilamida de manera muy estable y resistente [43,44]. Esta resina se puede utilizar como un material biocompatible y transparente para estudios de mecanobiología con alta reproducibilidad en fabricación, simplicidad en el uso, gran accesibilidad y bajo costo [44]. En [43] se utilizan unas gotas de Loctite 3525 como una capa intermedia de adhesión para hidrogeles de poliacrilamida, tanto en sustratos de vidrio, como bloques de PDMS sin ningún otro tratamiento previo a la adhesión del hidrogel.

En este trabajo, se utiliza el Loctite 3525 como una membrana que se adhiere al soporte microfluídico de PDMS, sobre la cual se polimeriza el hidrogel de poliacrilamida.

## 1.2 Planteamiento del problema

Los métodos de cultivo más utilizados, tales como el cultivo en cajas Petri, pozos o sustratos planos de poliestireno o vidrio, no presentan un entorno ideal para las células bajo estudio y esto modifica su fenotipo. Esto es debido a que existen una serie de estímulos que las células perciben *in vivo*, que no se pueden imitar en formas de cultivo tradicionales, tales como rigidez, estructura, flujo, entre otros. Lo anterior provoca que las células no respondan en estos modelos de la misma forma que lo hacen dentro del cuerpo y limita el resultado y alcance de los experimentos *in vitro*. Debido a esto, durante los últimos años se ha buscado mimetizar algunas de estas propiedades en dispositivos biomiméticos *in vitro*, para conocer, de una manera más fidedigna, las respuestas que tienen las células con respecto a estos estímulos y así controlar mejor su desempeño durante los estudios de interés.

En esta línea de pensamiento, en este trabajo se diseñó, caracterizó y fabricó un dispositivo de inflamiento biaxial, que a partir de cambios de presión pueda proporcionar un estímulo mecánico que se traduce en un cambio de curvatura local, de manera controlada. Este estímulo es similar al que células pueden percibir en órganos que presentan un estímulo mecánico, tales como pulmón e intestino por ejemplo. El dispositivo, que permitirá realizar estudios de mecanobiología de forma controlada, se construyó con materiales biomiméticos que permiten que sea utilizado para cultivo celular, de rigideces similares a la que las células perciben en sus órganos de origen, y está diseñado para ser portátil, adaptable y compatible con técnicas de caracterización biológica.

## 1.3 Hipótesis

Se puede fabricar un dispositivo de tensión biaxial, con materiales biocompatibles suaves, capaz de proporcionar un cambio de la curvatura local mediante cambios de presión controlados por una bomba programable de precisión. Este *chip* microfluídico tendrá un diseño que se puede adaptar a distintas aplicaciones biológicas que requieran un estímulo mecánico relacionado con un cambio de curvatura local.

# 1.4 Objetivos

## Objetivo general

Fabricar y caracterizar un *chip* microfluídico que permita inflamamiento biaxial que pueda ser utilizado para proporcionar un estímulo mecánico controlado a cultivo celular, a través de la modificación de presiones sobre una membrana deformable.

## Objetivos particulares

- Diseñar el dispositivo de inflamamiento biaxial de acuerdo a las técnicas disponibles en el laboratorio, considerando un diseño modificable, que pueda usarse como respuesta a distintas aplicaciones de la línea de investigación *lab-on-a-chip*.
- Fabricar dicho dispositivo, considerando la integración de canales microfluídicos, cámara de variación de presión, membrana deformable, y superficie de contacto con la muestra que recibirá el estímulo mecánico. Utilizar para la fabricación materiales biomiméticos, ampliamente utilizados en la tecnología *lab-on-a-chip*, de propiedades mecánicas conocidas y personalizables, siendo estos polidimetilsiloxano (PDMS), adhesivo Loctite 3525 e hidrogeles de poliacrilamida.
- Caracterizar el dispositivo, en cuanto a rangos de presión accesibles y radios de curvatura logrables.

## 2. Metodología experimental

### 2.1 Fabricación del dispositivo de inflamamiento biaxial

#### 2.1.1 Desglose de cada componente del dispositivo

Se planteó tener un dispositivo que fuera capaz de proporcionar estímulos mecánicos a partir de cambios de presión. Se requería que el dispositivo fuera realizado con materiales biocompatibles, con una membrana fácilmente deformable y que se pudiera controlar la deformación de la membrana a partir de los cambios en la presión de una cámara, abajo de ella, conectada a las bombas vía canales.

De manera general, el funcionamiento de dicho dispositivo se enuncia a continuación. A través de un canal, se realizan cambios de presión sobre la membrana del dispositivo, y esta se infla. A partir del control de la presión, se puede controlar la altura a la que llega este inflamamiento, y el radio de curvatura del inflamamiento, ya que está relacionado directamente con la altura del casquete.

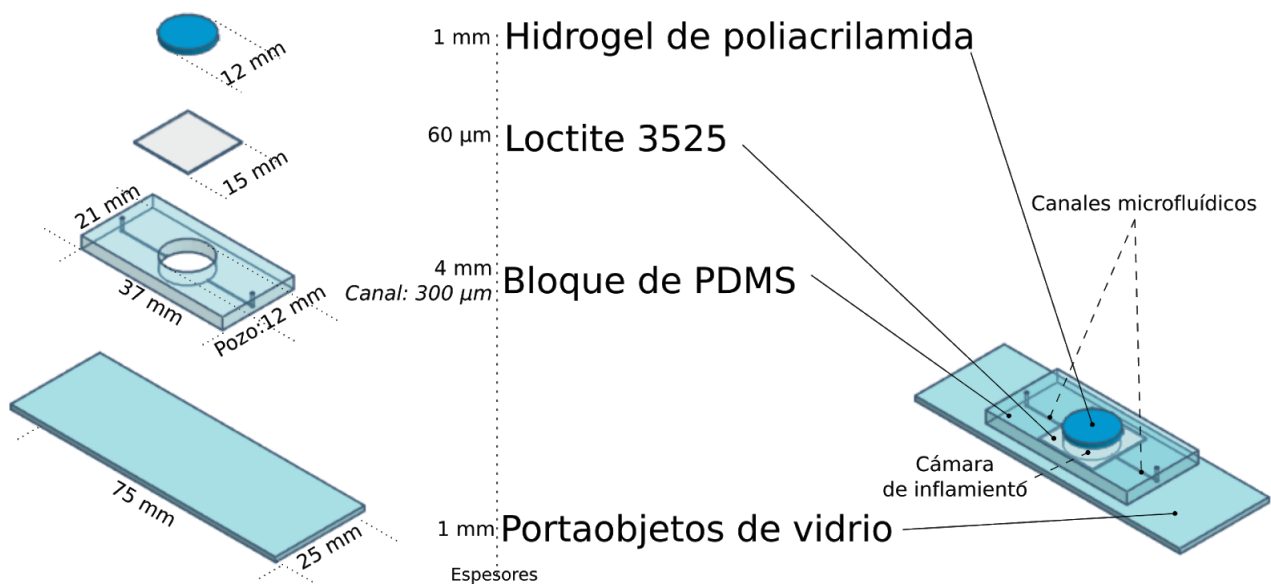


Figura 16: Diseño del dispositivo, en forma explotada (izq) y agrupada (der). Se muestran los distintos materiales que componen el dispositivo y las dimensiones del mismo.

A continuación se enlistan dichos componentes, describiendo, de forma general, sus características y los procesos involucrados en la fabricación de cada uno de los componentes. El diagrama del dispositivo se encuentra en la Fig. 16. La explicación a detalle del protocolo estandarizado para la fabricación de este dispositivo se encuentra en la sección [2.1.2 Protocolo para la fabricación del dispositivo de inflamamiento biaxial](#).

- **Sustrato de vidrio:** Portaobjetos estándar (25 x 75 mm) que sirve de soporte al *chip* de inflamamiento biaxial.
- **Bloque de PDMS con canales microfluídicos:** Se realiza mediante la técnica de molde réplica, a partir de verter PDMS Sylgard 184 proporción 10:1 en un molde de acrílico. El soporte se adhiere al sustrato de vidrio por medio de descarga corona. Este soporte incorpora:

- **Dos canales microfluídicos**, uno de entrada y uno de salida, cada uno de 300  $\mu\text{m}$  de ancho x 100  $\mu\text{m}$  de alto. Cada uno de estos canales microfluídicos incorpora dos inlets que fueron integrados en el diseño del molde al momento de fabricar. Uno de estos inlets se utiliza para conectar las bombas microfluídicas para el control de la presión y el otro como desagüe para la limpieza del *chip*.

En este trabajo, el fluido para transmitir la presión que se utiliza es aire; sin embargo, por la parte interior de este dispositivo se podía utilizar para hacer pasar medio de cultivo y medio por dentro del *chip*, y así poder utilizarse para distintos tipos celulares.

- **Una cámara de inflamamiento.** Sobre este compartimento, se realizará el esfuerzo sobre la membrana para deformarla a partir de cambios de presión. La cámara consiste en un cilindro de 12 mm de diámetro. Esta característica se debe a que se buscó que el esfuerzo fuera realizado en una geometría similar a un portaobjetos circular de 12 mm de diámetro. Esta cámara de inflamamiento está hueca en la parte superior, de tal forma que se sella con la membrana de Loctite 3525.

El dispositivo se diseñó con una cámara de inflamamiento de 4 mm de altura y 12 mm, lo que da un volumen en la cámara de inflamamiento de 0.452 ml. que es suficiente para contener el volumen de 0.19 – 0.285 ml recomendado para hacer cultivo celular en placas de 48 pozos (con un diámetro de 11 mm). [67] El *chip* que se presenta en este trabajo está planteado para encontrarse recubierto por hidrogel de poliacrilamida en la parte superior. No obstante, en la concepción del diseño, se ideó que, con las modificaciones pertinentes, se pudiera realizar cultivo tanto dentro, como fuera del mismo. En consecuencia, es que se decidió que la cámara de inflamamiento tuviera esta altura.

La forma cilíndrica de la cámara de inflamamiento permite obtener cambios en el radio de curvatura a partir de cambios pequeños de presión. Además, si la parte de la membrana que se infla es un círculo, obtenemos una condición de axisimetría, lo que facilita el análisis del comportamiento del dispositivo.

Se podría pensar que el hidrogel de poliacrilamida se puede depositar directamente sobre el PDMS. En esta línea de ideas, podría considerarse viable integrar una membrana de PDMS directamente en el *chip* y sobre ésta depositar el hidrogel. Sin embargo, el PDMS inhibe la polimerización del hidrogel de poliacrilamida, por lo que, de todas formas sería necesario colocar sobre la membrana de PDMS un recubrimiento de Loctite 3525.

- **Membrana de Loctite 3525:** El hidrogel de poliacrilamida requiere un sustrato para poder polimerizarse, por lo tanto se utiliza una membrana del adhesivo fotocurable Loctite 3525, que se adhiere al PDMS y sobre la cual se coloca un recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida.

El Loctite 3525 se estructura haciendo *spin coating* sobre una membrana antiadherente Obducat Intermediate Polymer Stamp, que contiene la réplica del patrón de difracción de un DVD, obteniendo un espesor de 60  $\mu\text{m}$ . Se polimeriza por exposición a radiación UV. Se adhiere por medio de la técnica de descarga corona al bloque de PDMS. La membrana de Loctite 3525 se encuentra microestructurada con la réplica de una rejilla de difracción, para generar un patrón que se puede utilizar para caracterizar las deformaciones. Esta membrana es el componente sobre el cual actúan los esfuerzos necesarios para realizar la deformación. Después de activar la membrana de Loctite 3525 con luz UV, el hidrogel de poliacrilamida se puede adherir al dispositivo.

La microestructuración de la membrana de Loctite 3525 es de interés a otro proyecto del laboratorio [68], y se usa para que la deformación del *chip* pudiera ser caracterizada con técnicas de interferometría. La caracterización del patrón de difracción se desarrolló por Fernanda López García (FLG), como parte de sus estudios de Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales, por parte de la UNAM.

- **Recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida:** Se recubre el dispositivo con un bloque de hidrogel de poliacrilamida. El hidrogel se polimeriza directamente sobre la superficie activada de Loctite 3525. El hidrogel tiene un espesor aproximado de 1mm. La rigidez del hidrogel se puede controlar de acuerdo a las condiciones de preparación, como podemos ver en el protocolo [53], y para este trabajo se consideró utilizar hidrogel con un módulo de Young esperado de 20 kPa.

Este diseño de dispositivo está ideado para colocarse dentro de una caja Petri con medio de cultivo, y hacer cultivo celular sobre la capa de hidrogel y que las deformaciones de la membrana se realicen con aire. Sin embargo, cabe mencionar que el diseño es fácilmente adaptable, dependiendo del experimento que se requiere, incluyendo el inflamiento utilizando otros fluidos para la transmisión de presión, tales como medio de cultivo. Los materiales utilizados son transparentes, y el tamaño del mismo lo hacen un dispositivo compatible con microscopía óptica. Asimismo, tanto el Loctite 3525 como los hidrogeles de poliacrilamida se pueden utilizar con fluorocromos [43,44] El proceso para la fabricación permite modificar fácilmente el diseño y realizar la fabricación de un nuevo *chip*, en un lapso breve de tiempo de acuerdo a las nuevas necesidades que vayan surgiendo. Más adelante, en la sección [Versatilidad del diseño](#), del capítulo [5. Perspectivas y trabajo a futuro](#), se mencionan algunas necesidades que se han identificado y los posibles cambios en el diseño que responden a estas necesidades.



## 2.1.2 Protocolo para la fabricación del dispositivo de inflamamiento biaxial

A continuación se presenta el protocolo que se obtuvo para la fabricación de este dispositivo. Se incluyen las técnicas utilizadas, equipos, materiales, así como observaciones (📄) que surgieron durante los distintos procesos de fabricación de este dispositivo. En aquellos pasos donde es pertinente, también se incluye una forma de verificación (🔍) de dicha etapa de fabricación.

### Descripción breve del método

El método de fabricación consiste de las siguientes etapas:

1. Estructuración por *spin coating* de la membrana de Loctite 3525 sobre una membrana IPS.
2. Réplica en PDMS por medio de la técnica de molde-réplica del molde de PMMA.
3. Adhesión de la membrana de Loctite 3525 al bloque de PDMS.
4. Recubrimiento del dispositivo con hidrogel de Poliacrilamida.

Estructuración por *spin coating* de la membrana de Loctite 3525 sobre una membrana IPS

Reactivos:

- Adhesivo Henkel Loctite 3525

Material:

- Membrana antiadherente IPS microestructurada por NIL
- Cinta adhesiva (3M Scotch 810 'Cinta Mágica')
- Portaobjetos de vidrio
- Bloque de PTFE (Teflón)

Equipos

- Spin coater (Laurell WS-650-23 B)
- Equipo Entrecruzador por UV ( UVP™ Trans Linker)

Réplica en PDMS por medio de la técnica de molde-réplica del molde de PMMA

Reactivos:

- PDMS Dow Corning Sylgard 184 kit (base y agente curante)
- Acetona

Material:

- Molde de PMMA, microestructurado por microfresado por CNC
- Vaso de precipitados
- Varilla para mezclado
- Perforadora de 0.5 mm

Equipos

- Herramienta mezcladora de mano (Dremel)

- Bomba de vacío con desecador

Adhesión de la membrana de Loctite 3525 al bloque de PDMS

Material:

Bloque de PDMS prepolimerizado con canales microfluídicos integrados

Bloque de PTFE con membrana IPS y membrana de Loctite 3525 microestructurada

Bloque adicional de PTFE

Caja petri de vidrio de 10 cm

Cinta adhesiva (3M Scotch 810 'Cinta Mágica')

Equipos:

- Limpiador por plasma (Plasma Etch Inc. PE-52) ó
- Bobina Tesla (Arbor Scientific P6-3550)

Recubrimiento del dispositivo con hidrogel de Poli(acrilamida).

Reactivos:

- Solución de acrilamida 40% (v/v en agua) [Sigma Aldrich A3553]
- Solución de bis acrilamida 2% (v/v en agua) [Sigma Aldrich M7279]
- Agua MiliQ
- TEMED [Sigma Aldrich T9281]
- APS [Sigma A3678]

Material:

Círculo de 12 mm de diámetro de membrana IPS.

Juego de micropipetas


Equipos

- Equipo Entrecruzador por UV ( UVP™ Trans Linker)

## Descripción detallada del procedimiento

Estructuración por *spin coating* de la membrana de Loctite 3525 sobre una membrana IPS

1. Utilizar cinta mágica para adherir una membrana del polímero IPS, microestructurada por NIL con la réplica de una rejilla de difracción, a un portaobjetos de vidrio. Tener cuidado que el lado microestructurado se encuentre orientado hacia arriba. Procurar que la membrana IPS permanezca lo más plana posible.

 En este trabajo se presenta el patrón de una rejilla de difracción fabricado sobre la membrana de Loctite 3525. Esto es para demostrar que el Loctite 3525 se puede microestructurar y utilizar en el dispositivo de inflamamiento. Esta microestructuración dependerá de la aplicación en particular a la que responda el dispositivo. En particular, se incorporó una rejilla de difracción por ser de interés a otro proyecto, donde se requiere observar cambios controlados de deformación que se ven reflejados en el cambio del patrón de difracción. [68]

2. Realizar *spin coating* de Loctite 3525 sobre la membrana IPS microestructurada. Los parámetros de operación del *spin coating* que se utilizaron son

$$\omega = 3000 \text{ rpm}$$

$$\alpha = 1000 \text{ rpm/s}$$

$$t = 60 \text{ s}$$

Esto genera una membrana de aproximadamente 60 micras de espesor. Es importante que el Loctite cubra por completo el área enmarcada por la cinta mágica. Puede incluso sobrepasar esta área, ya que después de la polimerización se retirará el sobrante.

■ A pesar de que el Loctite 3525 es un adhesivo fotocurable, no es necesario trabajar en cuarto oscuro. La intensidad luminosa de un ambiente de laboratorio ordinario no es suficiente para desencadenar la reacción de polimerización.

3. Irradiar la membrana de Loctite 3525 bajo el equipo entrecruzador por UV durante 5 minutos, para polimerizarla.
4. Con un bisturí, cortar la membrana de Loctite de tal forma que quede ligeramente mayor al área cubierta por la membrana IPS. Tener cuidado de no dañar la membrana IPS, sin embargo, la cinta mágica con la que el portaobjetos se encuentra adherida se puede cortar sin ningún inconveniente.
5. Desprender el conjunto de membrana IPS y Loctite 3525 del portaobjetos. Esto se puede realizar con la parte gruesa de un bisturí, entre la membrana IPS y el portaobjetos con cuidado y poco a poco.

■ No desprender la membrana de Loctite 3525 de la membrana IPS, pues esto dificulta su manipulación y fomenta la aparición de arrugas.

6. Adherir el conjunto de membrana IPS y Loctite 3525 a un bloque grueso de PTFE (Teflón) con cinta mágica, con el Loctite 3525 hacia arriba. De preferencia, utilizar la misma cinta del paso anterior siempre y cuando no esté muy dañada. No es necesario adherirlo de los cuatro lados, pero se debe asegurar que la membrana no saldrá disparada debido al vacío al irradiarla con el Plasma Etcher, en caso de utilizarlo.

Réplica en PDMS por medio de la técnica de molde-réplica del molde de PMMA

En la Fig. 17 se resume este proceso.

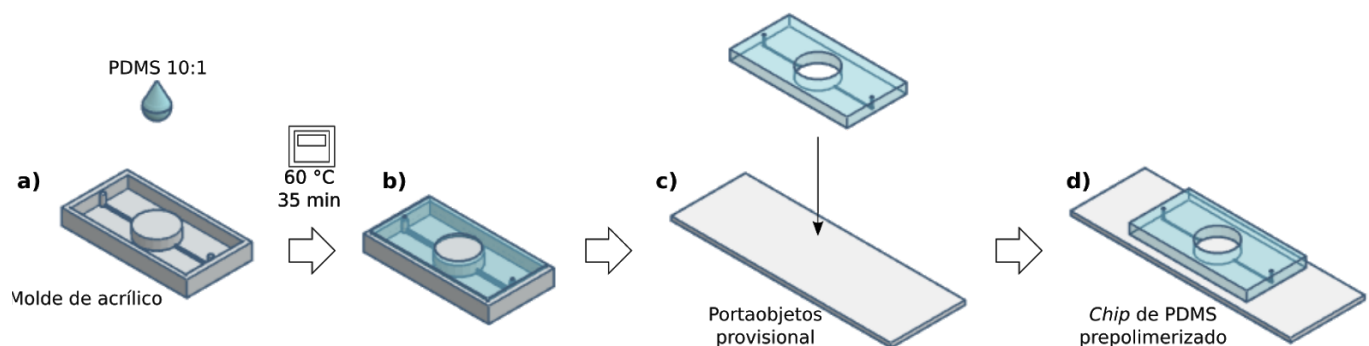


Figura 17: Esquema donde se muestra el proceso de fabricación para obtener el *chip* de PDMS prepolimerizado.

7. Limpiar con alcohol isopropílico y un paño de tareas delicadas el molde de acrílico a utilizar, como el que se muestra en la Fig. 18. El molde de acrílico fue fabricado por medio de un proceso de microfresado por CNC. Para este proceso, se realiza el diseño en un archivo .stl. Este es

interpretado por la máquina Minitech Mini-Mill/4 y a partir de desbastar el sustrato por medio de una punta, se obtiene el diseño deseado. Posteriormente se somete a una exposición a vapor de acetona para disminuir la rugosidad del molde.



Figura 18: Molde de acrílico utilizado para realizar las réplicas de PDMS.

■ Una explicación más a detalle del proceso se puede encontrar en [62].

🔍 Si se necesita mucha precisión en las dimensiones del *chip*, se puede realizar una verificación por perfilometría para verificar que las dimensiones de los canales microfluídicos son consistentes con el diseño, y si las dimensiones medidas entran dentro de los límites de tolerancia. En este trabajo no se consideró necesario, ya que principalmente está enfocado a la presentación del método de fabricación y de caracterización.

8. Agregar 2.7 g de PDMS Sylgard 184 en proporción base:agente curante 10:1 (masa:masa) en el molde de acrílico, con cuidado de verter el PDMS sin tocar la parte central del dispositivo. (Fig. 17.a)

■ El molde está diseñado para que el dispositivo de PDMS sea fabricado con una membrana de PDMS integrada dentro del mismo molde. Sin embargo, en este caso se decidió utilizar el molde sin integrar la membrana. Para polimerizar el dispositivo sin la membrana integrada, se vierten 2.7 g de PDMS al molde de acrílico, procurando no depositar PDMS en la parte central del molde, que daría lugar al pozo en el dispositivo de PDMS. Para polimerizar el dispositivo con membrana integrada, se vierten 2.8 g, procurando cubrir el *chip* en su totalidad, incluyendo el poste.

■ Se exploró fabricar la membrana de PDMS por separado en el desarrollo de este trabajo, sin embargo, se encontró que estructurar la membrana directamente en el *chip* resultaba en un proceso más sencillo.

■ Se debe evitar que haya burbujas en el dispositivo, principalmente alrededor de los canales microfluídicos. Para ello, se puede exponer el PDMS antes de verterlo a una fuente de vacío dentro de un desecador. Al momento de verter el PDMS sobre el *chip*, se pueden romper las burbujas restantes con una aguja de jeringa.

■ Una explicación más a detalle del proceso de preparación de PDMS utilizado en este laboratorio se puede encontrar en [69].

9. Hornear el PDMS a 60°C por 35 minutos, para polimerizarlo parcialmente. Se polimeriza parcialmente para poder adherir la membrana de Loctite 3525, ya que si se encuentra totalmente polimerizado, la membrana no se adhiere. (Fig. 17.b)

■ Es importante que el proceso de polimerización, para esta geometría y cantidad de material, sea lo más cercano a este tiempo. Para un tiempo de 30 minutos o menor, el dispositivo se deforma al desprenderlo del molde y con un tiempo de 40 minutos o mayor, la adhesión de la membrana de Loctite 3525 no funciona.

10. Retirar el *chip* del horno y desmoldarlo. Colocarlo provisionalmente con delicadeza sobre un portaobjetos de acrílico limpio. (Fig. 17.c-d)

■ El portaobjetos de acrílico evitará que el PDMS se adhiera. No es recomendable realizar las perforaciones de los inlets en este punto ya que el *chip* no ha terminado de polimerizarse.

🔍 Se puede realizar la verificación del bloque de PDMS con un microscopio estereoscópico. Se debe verificar que el *chip* no presente burbujas cerca de los canales o cerca del compartimento de inflamamiento. Si las burbujas comprometen la hermeticidad del dispositivo, se deberá descartar y rehacer la polimerización del PDMS. Si las burbujas no comprometen la hermeticidad, p. ej. están en una zona del bloque de PDMS alejada de los canales microfluídicos, se puede seguir utilizando el dispositivo.

### Adhesión de la membrana de Loctite 3525 al bloque de PDMS

En la Fig. 19 se resume este proceso.

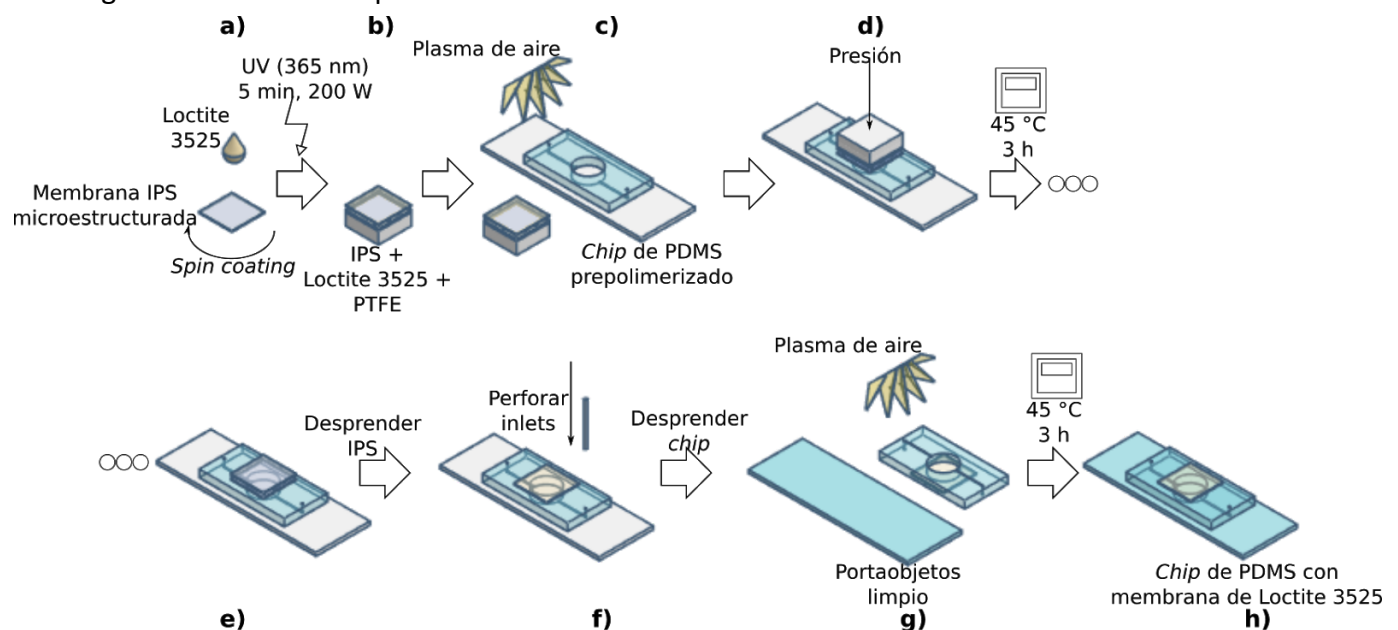


Figura 19: Esquema donde se muestra el proceso de fabricación para la obtención del *chip* con una membrana de Loctite 3525 adherida.

11. Colocar en el fondo de una caja Petri de 10 cm el *chip* prepolimerizado de PDMS, y el bloque de teflón del paso 6 b) con la membrana de Loctite 3525 hacia arriba. (Fig 19.a-b) Irradiar con el limpiador de plasma durante 5 minutos a potencia media (Potencia=200 W, Presión=200 mTorr). (Fig 19.c)

■ Es importante que lo que se introduzca al limpiador de plasma esté lo más limpio posible (bloque de teflón, caja Petri de vidrio, etc.) para evitar que el equipo se ensucie.

■ El procedimiento recomendado consiste en utilizar un limpiador de plasma. Si no se encuentra disponible, se puede utilizar una bobina Tesla, e irradiar el material, a una distancia aproximada de 1 cm del mismo, lentamente, de forma que se exponga la totalidad del material al campo electromagnético por 45 s.

12. Colocar el portaobjetos de acrílico en el fondo de una caja Petri de vidrio de 10 cm, con el PDMS parcialmente polimerizado hacia arriba. Poner en contacto el bloque de PTFE al cual está adherido la membrana de Loctite 3525, con la membrana de Loctite 3525 hacia abajo, con el

bloque de PDMS. Procurar que la membrana de Loctite 3525 se encuentre centrada con respecto al pozo dentro del bloque de PDMS. Colocar un segundo bloque de PTFE sobre el primero. Cubrir con la tapa de la caja Petri, sellar la caja Petri con ayuda de una cinta adhesiva para asegurar que estén en contacto la membrana de Loctite 3525 con el PDMS prepolimerizado. Hornear a 45°C, durante 3 horas. (Fig. 19.d)

■ Para una polimerización más controlada del PDMS, y por lo tanto, una mejor adhesión de la membrana, se puede utilizar una temperatura de 60°C por una hora. Sin embargo, esta temperatura es mayor a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del Loctite 3525, que es de 50 °C [70], por lo que si se utiliza este método, la membrana de Loctite se arrugará.

13. Retirar del horno la muestra. Con cuidado, retirar la tapa de la caja Petri y el bloque de teflón. Desprender, con cuidado, la membrana IPS, que se encontrará en la parte superior del *chip*. Para esto, se puede introducir la parte gruesa de un bisturí entre la membrana IPS y la membrana de Loctite y desprenderlo poco a poco. En este momento, la membrana de Loctite ya debe estar completamente adherida al bloque de PDMS. Retirar el resto de cinta mágica que haya quedado adherida al borde de la membrana de Loctite. Si es necesario, se puede utilizar un bisturí para cortar la frontera entre Loctite y cinta mágica. Almacenar la membrana IPS, ya que se puede utilizar para estructuraciones posteriores. (Fig 19.f-g)

🔍 Se puede verificar la adhesión de la membrana de Loctite 3525 utilizando unas pinzas. Para ello, se intenta levantar una de las esquinas de la membrana de Loctite 3525. La membrana de Loctite no deberá levantarse. Si la adhesión no se realizó adecuadamente, la membrana se desprenderá con facilidad. Si este es el caso, se deberá descartar el dispositivo, y reiniciar el proceso de fabricación desde, ya que para que la membrana de Loctite 3525 se adhiera al PDMS, el PDMS debe estar prepolimerizado. La membrana de Loctite 3525 no se adherirá a PDMS completamente polimerizado.

14. Desprender el *chip* con cuidado, delicadamente a poco y procurando no arrugar la membrana de Loctite en el proceso, del portaobjetos de acrílico. Realizar las perforaciones en los *inlets* del *chip* utilizando una perforadora de 0.5 mm.
15. Colocar el bloque de PDMS, sobre un bloque de PTFE, con la membrana de Loctite hacia abajo en el fondo de una caja Petri de vidrio de 10 cm. Colocar un portaobjetos limpio dentro de la caja Petri de vidrio.
16. Irradiar el bloque de PDMS y el portaobjetos de vidrio en el plasma etcher por 5 minutos, a potencia media ( $P=200$  mTorr).

■ Nuevamente, se puede utilizar una bobina Tesla si no se tiene disponible un limpiador por plasma, de forma similar a lo mencionado en el paso 11.

17. Colocar el *chip* de PDMS sobre el portaobjetos de vidrio, cubrir con la tapa de la caja Petri, y hornear por 3 horas a 45°C mínimo. (Fig. 19.h) El *chip* de PDMS con la membrana de Loctite microestructurada se muestra en la Fig. 20.

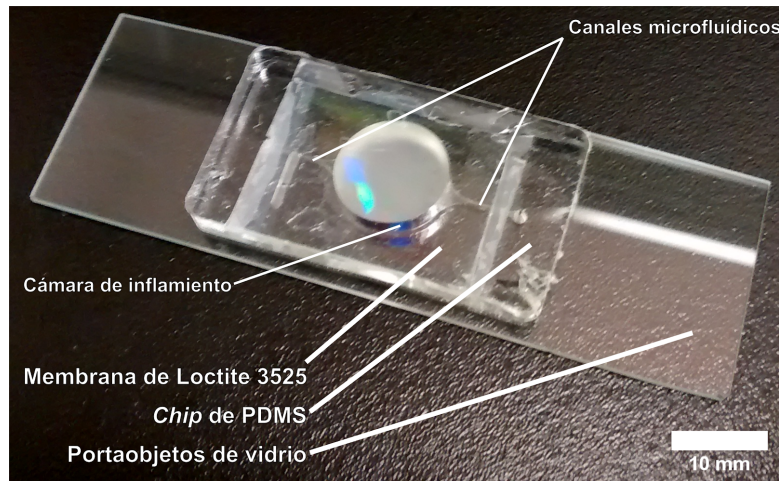


Figura 20: Bloque de PDMS con membrana de Loctite 3525 microestructurada.

■ Nuevamente, se utiliza una temperatura menor a la  $T_g$ .

🔍 Se puede verificar la adhesión del PDMS al portaobjetos de vidrio intentando desprenderlo con unas pinzas. Si el PDMS no se encuentra correctamente adherido al portaobjetos, en particular en la zona alrededor de los canales microfluídicos y de la cámara de inflamamiento, se deberá descartar, el dispositivo completo. Esto debido a que si la adhesión no es adecuada, no se puede asegurar que no se presenten fugas en el dispositivo.

18. Recortar el portaobjetos en las esquinas tamaño del *chip* utilizando un cortador de vidrio.

■ Esto servirá para almacenar posteriormente el dispositivo con hidrogel en una caja Petri de 1 cm con división, de tal forma que de un lado de la caja Petri se almacene el *chip* y del otro lado, la caja Petri contenga agua. De esta forma, el hidrogel que se le colocará posteriormente al dispositivo no se deshidratará.



## Recubrimiento del dispositivo con hidrogel de Poli(acrilamida)

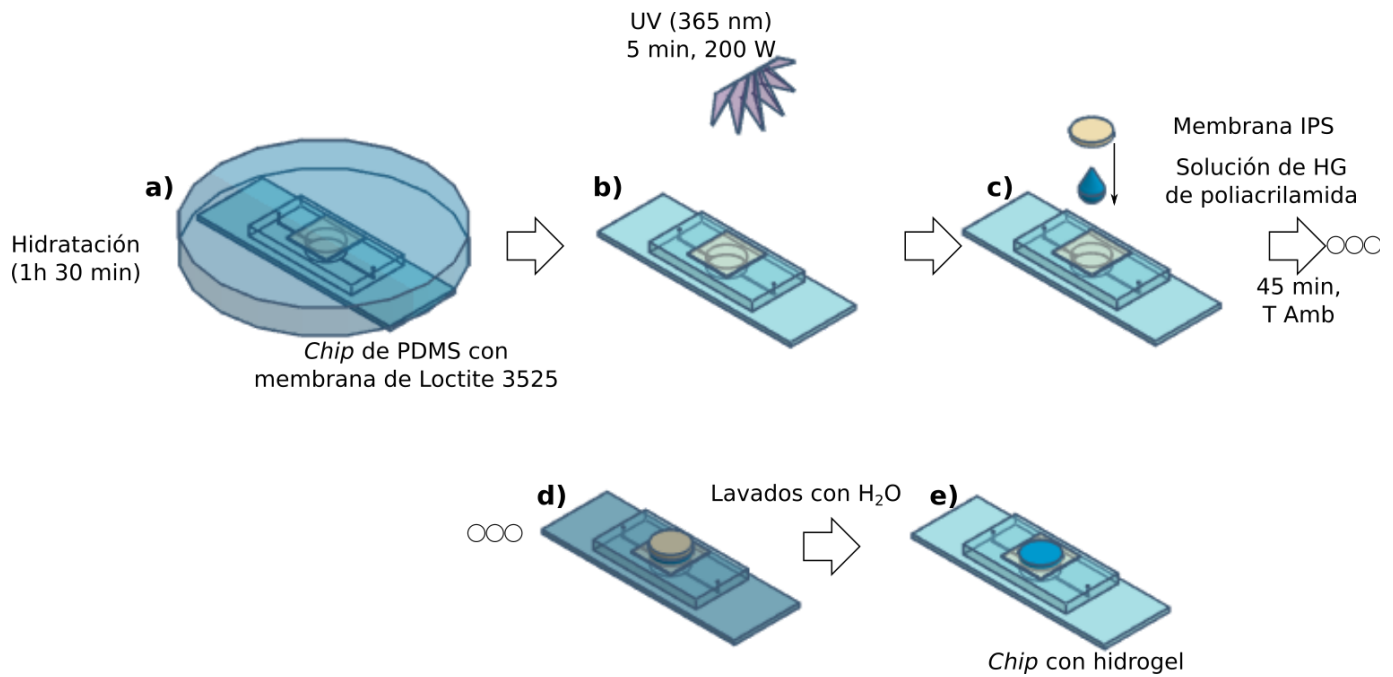


Figura 21: Esquema donde se muestra el proceso de fabricación para obtener el *chip* de inflamación con un recubrimiento de hidrogel.

- Hidratar el dispositivo durante 90 minutos, con agua MilliQ, para evitar que el Loctite se hinche al momento de colocar el hidrogel y se generen arrugas. Tapar las entradas de los canales microfluídicos con dos trozos de cinta adhesiva. Retirar el agua MilliQ. (Fig. 21.a)
- Irradiar el *chip* por 5 minutos en UV utilizando la lámpara UV Crosslinker, para activar el adhesivo Loctite 3525. (Fig. 21.b)
- Recortar un círculo de 12 mm de diámetro de una membrana IPS.  
■ Para mayor control en el corte, se puede utilizar un equipo de *plotter* de corte para realizar estos recortes.
- Realizar 1 ml de solución de hidrogel de poli(acrilamida), de acuerdo a la rigidez deseada, mezclando la solución de acrilamida, solución de bis-acrilamida, de acuerdo a la tabla mostrada en el protocolo [53].
- Agregar APS y TEMED a la solución de hidrogel. Colocar con cuidado, previniendo que no se desborde, una gota de hidrogel de 50  $\mu$ l en el centro de la membrana de Loctite 3525.  
■ Este tamaño de gota es el que se usa en el laboratorio para recubrir cubreobjetos de 12 mm, que corresponde a la dimensión del dispositivo.
- Colocar la membrana circular de IPS sobre el hidrogel, para delimitar el área sobre la que el hidrogel se polimerizará y aplanar la parte superior del hidrogel. Evitar que el hidrogel se introduzca en las perforaciones. (Fig. 21.c)
- Dejar que el hidrogel polimerice. La polimerización del hidrogel se puede monitorizar en los tubos eppendorf donde se realiza la mezcla. El tiempo de polimerización varía, dependiendo de la rigidez. A mayor rigidez del hidrogel, más tiempo de polimerización. En un tiempo de 45 minutos, los hidrogeles ya polimerizaron completamente. (Fig. 21.d)
- Enjuagar con agua desionizada 3 veces para retirar los residuos de la polimerización. En este punto, el *chip* ya está recubierto con hidrogel. (Fig. 21.e)



🔍 Después del lavado se puede retirar el excedente de agua y observar a simple vista si el hidrogel se encuentra adherido a la membrana de Loctite 3525. Si durante el lavado se desprendió el hidrogel, se deberá preparar nuevamente una solución de hidrogel (paso 22) para adherir nuevamente la poliacrilamida a la membrana de Loctite 3525,

27. En caso de que no se vaya a utilizar inmediatamente, almacenar el dispositivo en cámara húmeda. Para este efecto, se puede almacenar en una caja Petri de 10 cm con división, almacenando en uno de las divisiones el *chip*, y en la otra llenarla de agua MiliQ y sellar con Parafilm.

En la Fig. 22 se muestra el *chip* después de este proceso de fabricación.

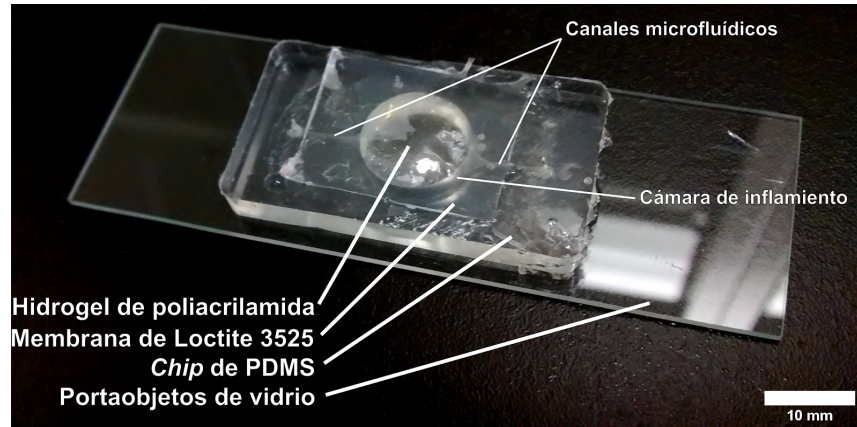


Figura 22: Dispositivo de inflamación, con una membrana de Loctite 3525 y un recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida.

Cabe mencionar que el alcance de este trabajo llega a la elaboración del *chip* con un recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida. Los hidrogeles de poliacrilamida han sido ampliamente usados para emular rigideces en el rango fisiológico, para realizar posteriormente cultivo celular sobre ellos [30–33]. Para realizar cultivo celular, se necesita funcionalizar proteína al hidrogel para promover la adherencia celular. Esto daría lugar a etapas adicionales en el proceso de fabricación, así como de almacenamiento. Sin embargo, en el laboratorio donde se desarrolló este proyecto, se tiene bastante experiencia con el trabajo con hidrogeles de poliacrilamida, por lo que se piensa que el *chip* presentado en este trabajo será fácilmente adaptable a pruebas con células, como se verá más adelante en la sección [Cultivo celular y pruebas biológicas](#) del Capítulo [5. Perspectivas y trabajo a futuro](#).

## 2.2 Caracterización del dispositivo

### 2.2.1 Dispositivo experimental para la caracterización del dispositivo

#### Descripción breve del método

Para caracterizar el dispositivo, se buscó obtener la relación entre la presión de entrada en el dispositivo y la altura de inflamamiento, a partir de la cual se puede calcular el radio de curvatura. Esta caracterización se realizó de esta forma, porque es de interés conocer cómo se comporta el dispositivo a distintas presiones, ya que la idea es utilizar el dispositivo para emular estímulos de cambio de curvatura y rigidez local, por medio del inflamamiento. Para el análisis, se tomó la aproximación más sencilla para realizar el análisis de una prueba de abultamiento: la aproximación de casquete completamente esférico, que se muestra en la Fig. 7. Se muestra a continuación el procedimiento para realizar la caracterización por microscopía a partir de pruebas de inflamamiento con presión positiva para el *chip* de inflamamiento biaxial, por medio de bombas microfluídicas. Conforme se cambió la presión, se observó en tiempo real el inflamamiento del *chip*.

El dispositivo experimental para la caracterización de presión del dispositivo consiste en:

- Soporte para el *chip* microfluídico, que incluye una pantalla para observar el inflamamiento del dispositivo.
- Microscopio estereoscópico y microscopio USB para tomar imágenes laterales y apicales del *chip* durante el inflamamiento.
- Bomba de microfluídica para realizar las rampas de presión, controladas por computadora, conectada al *chip*.

La caracterización del dispositivo se comprende de tres etapas:

- Montaje del dispositivo experimental
- Modulación de la presión y toma de imágenes
- Análisis de imágenes

#### Materiales y equipos requeridos

Materiales:

- Soporte microfluídico para el *chip* de inflamamiento biaxial
- *Chip* de inflamamiento biaxial
- Cinta adhesiva (3M Scotch 810 'Cinta Mágica')
- Conexiones de microfluídica
- Papel milimétrico

Equipos:

- Microscopio estereoscópico (Nikon SMZ/745T )
- Microscopio USB (Dino-Lite AM4113ZT)
- Bombas de control microfluídico, por control de presión (Fluigent MFCS-EZ)

Programas utilizados:

- Programa para obtener imágenes del microscopio estereoscópico (Pixelink Capture)
- Programa para obtener imágenes del microscopio USB (DinoCapture, del fabricante del microscopio)
- Programa de control de bombas microfluídicas (Fluigent MAESFLO, del fabricante de las bombas)
- Programa para programar las bombas microfluídicas (Fluigent Script Module, del fabricante de las bombas)
- Programa de análisis científico de imágenes (FIJI)

## Descripción detallada del procedimiento

1. Primeramente, se debe preparar el montaje de observación como se muestra en la Fig. 23.

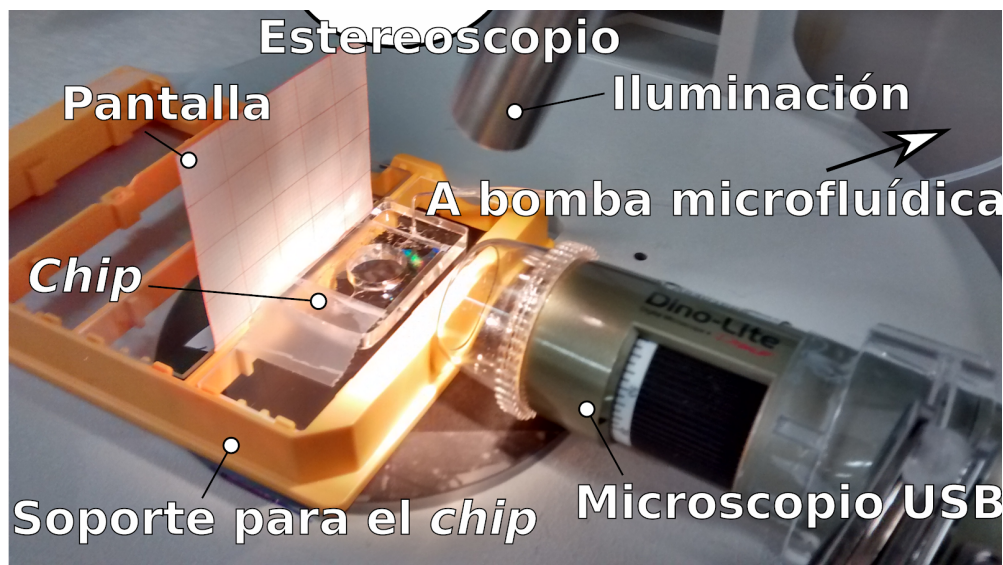


Figura 23: Diagrama experimental para caracterizar el dispositivo de inflamación biaxial.

Para realizar el montaje se realiza lo siguiente:

- a. Colocar el soporte para el *chip* en la platina del microscopio estereoscópico.
- b. Colocar el *chip* en el soporte de observación
- c. Colocar una pantalla de papel milimétrico en la parte de atrás del *chip*, para que funja como referencia. Esta pantalla se puede adherir a un portaobjetos colocado en el soporte atrás del *chip*. Procurar que la cuadrícula de la pantalla quede alineada horizontalmente con respecto al plano del *chip* de inflamación.
- d. Posicionar el microscopio USB en contacto con la pared del soporte para *chips*: Utilizando el programa DinoCapture, ajustar el enfoque del microscopio USB de tal forma que la parte central del *chip* esté enfocado. Esto se puede lograr posicionando unas pinzas cercanas al centro del dispositivo y enfocar el microscopio USB sobre ellas.

■ El enfoque, la alineación y la iluminación son importantes en este tipo de mediciones. El método de enfoque presentado aquí, funciona, pero para una caracterización más fina, lo ideal sería desarrollar un sistema más desarrollado para la toma de imágenes, en donde la mayor cantidad de variables; tales como enfoque, alineación e iluminación no dependan de la persona que está realizando el experimento.

- e. Conectar el microscopio USB Dino Lite a la computadora. Utilizando el programa, rotar el microscopio, de tal forma que el plano horizontal del *chip* de inflamiento quede alineado con respecto al plano horizontal en la pantalla de la computadora. Fijar el microscopio USB a la platina del microscopio, utilizando el soporte incluido con él.
  - f. Utilizando el programa Pixelink Capture, centrar y alinear el conjunto de microscopio USB y de *chip*, de tal forma que se aprecie el centro del dispositivo coincida con el centro del campo de visión de la cámara del microscopio estereoscópico.
  - g. Fijar el soporte del *chip* y el microscopio USB con cinta adhesiva mágica.
  - h. Encender el sistema de iluminación del microscopio estereoscópico, y ajustarlo, de tal forma que se aprecie un buen contraste entre el *chip* y la pantalla en la cámara del microscopio USB.
  - i. Sellar una de las entradas del canal con cinta mágica.
    - La cinta adhesiva es una de las formas con las que los chips microfluídicos de PDMS se pueden sellar reversiblemente, y es suficiente para que, en el intervalo de presiones que se están utilizando, no se presenten fugas dentro del *chip*.
  - j. Conectar la otra entrada del *chip* microfluídico con las bombas de control microfluídico, y el reservorio de fluido con el que se realizará la caracterización de la presión, utilizando las conexiones destinadas para ello.
  - k. Encender la bomba microfluídica y el programa de operación, y calibrarlo, de acuerdo al manual de operación del equipo.
2. Una vez realizado el montaje experimental, se puede proceder a realizar las pruebas de presión positiva en el dispositivo. Para ello:
- a. Utilizando la rutina de las bombas microfluídicas Fluigent, programar las bombas microfluídicas para hacer el incremento de la presión hasta la presión deseada. Si es necesario, programar también el descenso de la presión.
  - b. Utilizando el programa Pixelink Capture, programar la cámara del microscopio estereoscópico para tomar una foto cada cierto intervalo de tiempo.
    - Se recomienda programar esto de tal forma que cada intervalo de aumento o disminución de presión sea fotografiado varias veces, para poder descartar una foto que se haya tomado en el momento en el que el dispositivo esté reaccionando al cambio en la presión.
  - c. Realizar lo mismo que el paso anterior, utilizando el programa DinoCapture, para el microscopio USB.
  - d. Colocar un cronómetro cerca del dispositivo experimental.
  - e. Iniciar el cronómetro, las cámaras y la rutina de aumento de presión. Registrar los tiempos a los que sucede cada uno de estos eventos, y el momento en el que se llega a ciertas presiones de referencia, para poder realizar después el análisis de imágenes.
    - Tener en consideración que el tiempo programado en la rutina para que el sistema alcance cierta presión puede no ser el mismo con respecto al tiempo en el que efectivamente es alcanzada esta presión, debido al tiempo de comunicación entre la computadora y la bomba microfluídica.
    - Tener en cuenta que las bombas microfluídicas utilizadas son del tipo conocido como modulación de presión'. Esto quiere decir que la presión ejercida por las bombas se mantiene en el dispositivo, independientemente si el dispositivo tiene una fuga. De

hecho, como son bombas optimizadas para su utilización en flujos dinámicos, no estáticos, la condición de la presión constante se mantendrá a pesar de que el dispositivo tenga una fuga. Por lo tanto, para que los datos sean válidos, es importante verificar que el dispositivo no presente alguna fuga.

Debido a que las bombas están diseñadas para operar con un flujo dinámico, es posible que la presión ejercida por las bombas llegue a un límite máximo, definido por la resistencia mecánica del mismo dispositivo.

- f. Realizar más rampas de presión, si así se requiere.
3. Una vez realizada la modulación de presión se debe realizar el análisis de imágenes.
    - a. De cada conjunto de imágenes, etiquetar las imágenes correspondientes a cada incremento de presión en el nombre de archivo. Para este punto, resultarán útiles las anotaciones que se realizaron al realizar las rampas de subida y bajada.

Se tomaron dos tipos de imágenes: laterales y apicales. Las laterales servirán para caracterizar el inflamamiento y las apicales servirán principalmente para verificar que no haya habido ningún problema con el inflamamiento, por ejemplo desprendimiento parcial o total de la membrana.

En particular, en las fotografías apicales, como prueba de la microestructuración de la membrana de Loctite 3525, se puede observar el patrón de difracción y el cambio de sus dimensiones con respecto al inflamamiento de la membrana. La caracterización del estiramiento de la membrana partir del cambio en el patrón de difracción, será abordada con detalle en [68].
    - b. Seleccionar las imágenes correspondientes para cada valor de presión, y transferirlas a una carpeta nueva.
    - c. Con el programa FIJI, abrir las imágenes como secuencia de imágenes.
    - d. Rotar las imágenes de tal forma que el plano horizontal del *chip* coincida con el plano horizontal de la pantalla, como se ve en la Fig. 24.

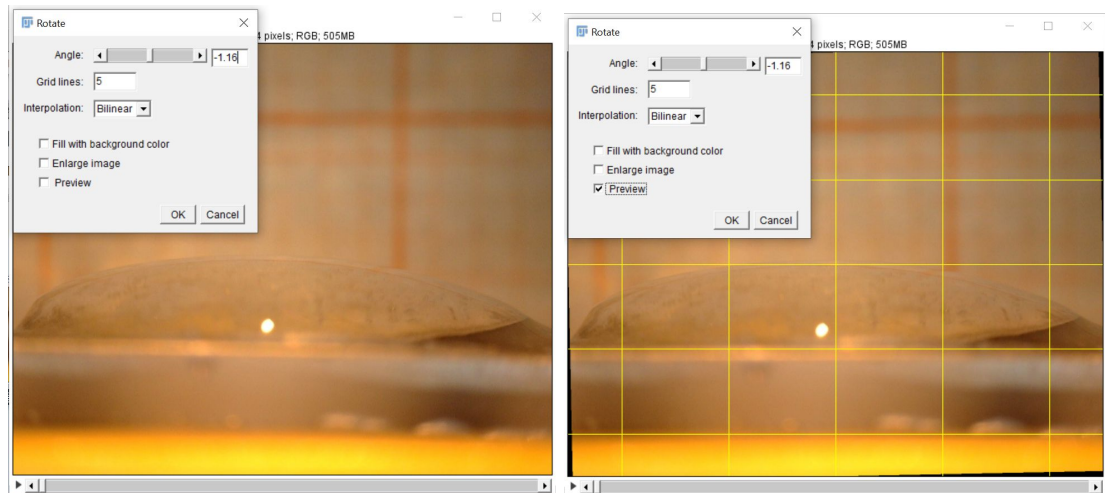


Figura 24: Rotación de la imagen del dispositivo de inflamamiento para su análisis utilizando FIJI.

- e. Cortar la imagen para eliminar los bordes provenientes del proceso de rotación, como se observa en la Fig. 25. Utilizando las regiones de interés (ROI), calibrar la escala de la secuencia de imágenes, utilizando los extremos de la cámara de inflamamiento como

referencia. Para calibrar la escala, se escoge una distancia conocida utilizando la región de interés (ROI) en forma de línea recta. Una vez seleccionada, se utiliza el comando 'Analyze-> Set scale' para establecer la relación entre los píxeles y dimensión real.

■ Para calibrar la escala, se utilizó la dimensión del diámetro de la cámara de inflamación, ya que es fácilmente identificable, y tiene una dimensión conocida de 12 mm.

■ El enfoque, la alineación y la iluminación afectan el análisis de imágenes. Si la muestra se encuentra mal enfocada, si no hay una correcta alineación y si no hay una iluminación adecuado el análisis de imágenes puede ser impreciso debido a los errores que estos factores pueden acarrear, tales como imágenes borrosas en la zona de interés, errores de paralaje y falta de nitidez debido a un contraste bajo. Como se mencionó anteriormente, la forma de caracterización presentada aquí funciona, pero tiene muchas características que se pueden mejorar,

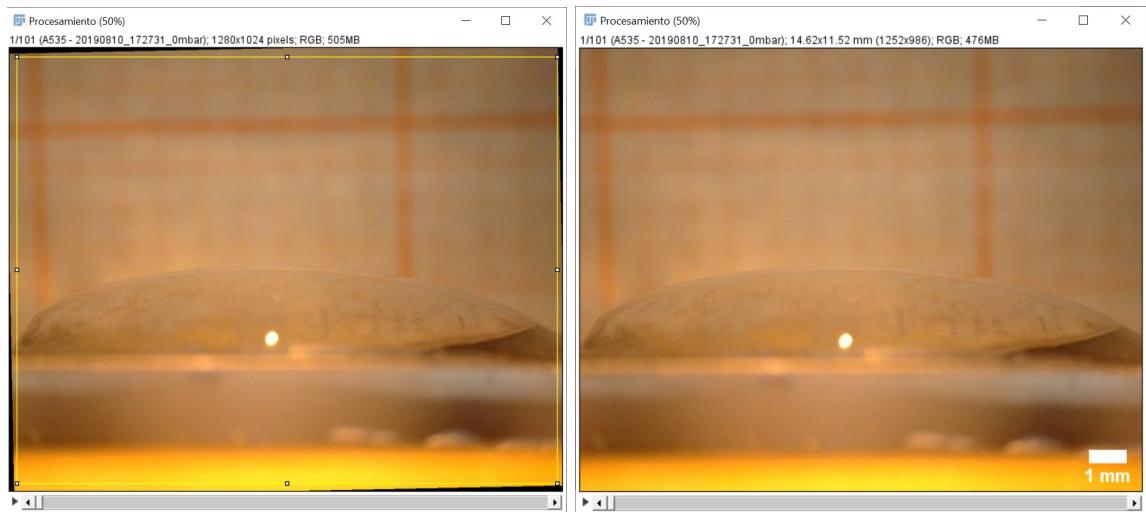


Figura 25: Recorte y ajuste de la escala para el análisis de imágenes utilizando FIJI.

- f. Realizar anotaciones en las imágenes con la presión correspondiente, de tal forma que cada cierto número de imágenes la presión esté anotada en la imagen correspondiente.
- g. En el menú 'Set measurements', seleccionar 'Fit ellipse'
- h. Utilizando la selección de elipse, forzar a una selección circular y dibujarla de tal forma que coincida con la membrana, como se ve en la Fig. 26.

■ Se utilizará la aproximación de un casquete esférico, mostrada por [12].

■ Se debe tener en cuenta que el lienzo de ImageJ debe abarcar el círculo en su totalidad. De lo contrario, las mediciones en FIJI no considerarán la región circular completa.



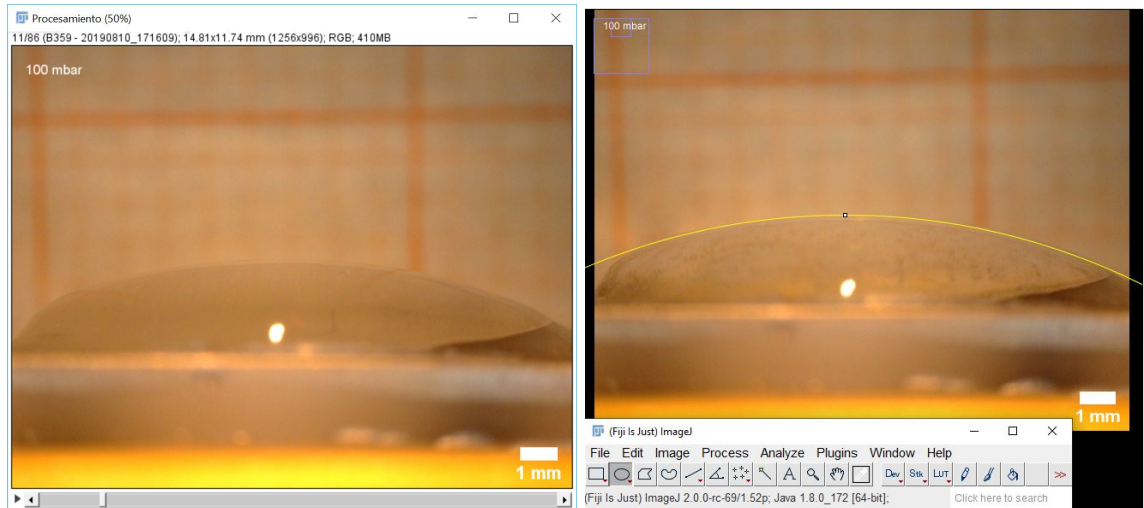


Figura 26: Ajuste de la elipse, forzando una selección circular. para realizar la medición de inflamamiento con el programa FIJI

- i. Tomar nota del dato de radio. Este corresponderá al radio de curvatura de la membrana.
  - Como se seleccionó 'Fit ellipse' para realizar las mediciones, y se forzó a una selección circular, los datos de eje menor y eje mayor deben coincidir. Si estos no coinciden, verificar que el tamaño del lienzo abarque completamente la sección circular. Si no es así, ajustarlo con Image>Adjust>Canvas Size.
- j. Realizar la medición de la altura del casquete esférico con la selección de línea, trazando una línea horizontal en la imagen de la membrana sin inflar, y a partir de ahí, medir el punto máximo de la circunferencia.
- k. Realizar los pasos h a j por cada uno de las imágenes de la secuencia.
- l. Realizar la interpretación de los datos, de acuerdo a las condiciones de inflamamiento.

### 3. Resultados obtenidos

Con este montaje experimental y procedimiento de caracterización, se caracterizaron dos diferentes versiones del *chip* de inflamación. Cabe recordar que la cámara de inflamación se encuentra sin tapa, y fue sellada con la membrana de Loctite. Las versiones que se caracterizaron fueron las siguientes:

- *Chip* con membrana de Loctite 3525.
- *Chip* con membrana de Loctite 3525 y recubrimiento de hidrogel de poli(acrilamida) con un módulo de Young esperado de 20 kPa. Se utilizó esta rigidez en la fabricación debido a que, al ser un hidrogel rígido, tendría menos problemas al fabricarse.

La caracterización se realizó en un intervalo de presiones de 0 a 500 mbar (0 a 375 mmHg), en rampas de subida y bajada. Se escogió este intervalo de presión porque se pretendía observar cómo se comportaba la altura de inflamación de la membrana y el radio de curvatura del dispositivo en un rango de presiones amplias, llegando a una presión ligeramente mayor a la registrada en un ser humano (370 mmHg) [71]. La caracterización se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Como comparación, se toma una de las caracterizaciones del dispositivo fabricado en su totalidad de PDMS, incluyendo la membrana, que se muestra en la Fig. 27 [68].

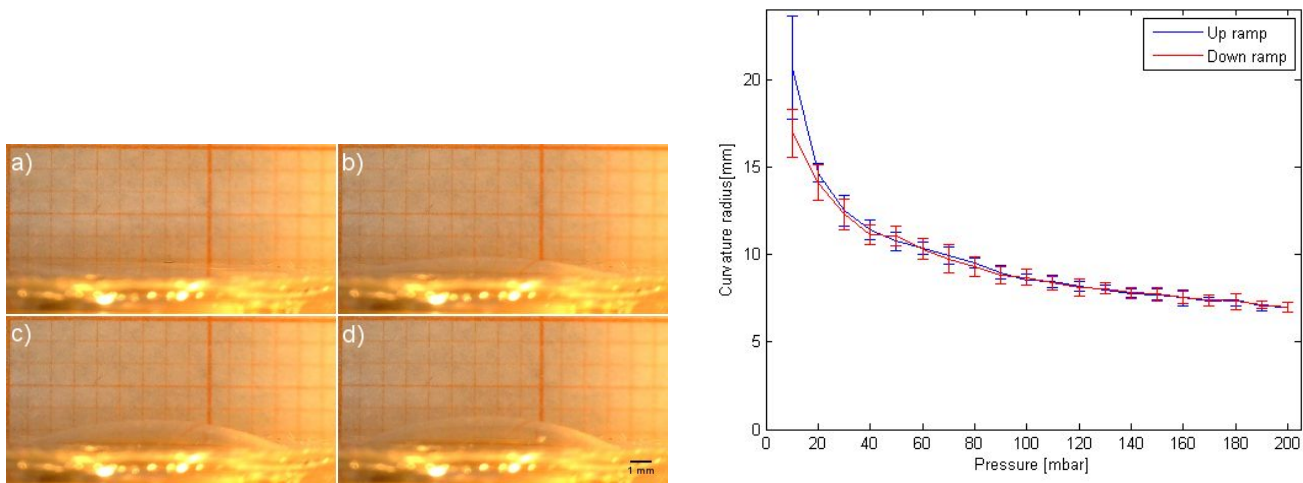


Figura 27: Izquierda: Vista lateral del dispositivo de inflamación biaxial. Vista lateral de una membrana de PDMS a a) 0 bar, b) 10 mbar, c) 20 mbar y d) 30 mbar. Derecha: Radio de curvatura de una membrana presiones entre 10 y 200 mbar en incrementos de 10 mbar. Se muestra rampa de ascenso (azul) y de descenso (rojo). Imágenes tomadas de [68].



### 3.1 *Chip* con membrana de Loctite 3525

A continuación, se muestra las pruebas con presión positiva del dispositivo de inflamiento biaxial, con una membrana de Loctite 3525. Para realizar la caracterización, se tomó la aproximación de casquete esférico, que se muestra en la Fig. 7. En la Fig. 28 se muestra la deformación de la membrana de Loctite tomada desde la cámara lateral, mientras que en la Fig. 29 se muestran las imágenes apicales de las pruebas con presión positiva. En la Fig. 30 se muestra la medición de la altura del casquete esférico debido al inflamiento de la membrana y la traducción de esta medición como un radio de curvatura. Las barras de error corresponden a la incertidumbre asociada con el establecimiento de la escala, y a la propagación de incertidumbres. Como se mencionó al exponer el método de caracterización del dispositivo, la escala se estableció utilizando los extremos de la cámara de inflamiento, debido a que tiene una dimensión conocida de 12 mm. Sin embargo, las condiciones de la imagen permitieron que esta incertidumbre se estableciera en  $\delta l = 0.1 \text{ mm}$  para todas las dimensiones obtenidas de la imagen. De acuerdo con la Fig. 7, la relación entre la altura del casquete y el radio de curvatura se relaciona con la siguiente ecuación:

$$R = \frac{a^2+h^2}{2h} \quad (16)$$

Donde  $R$  es el radio de curvatura;  $a$ , el radio de la membrana antes de inflarse, y  $h$  la altura del casquete esférico.

Por lo tanto, la incertidumbre asociada al radio de curvatura se expresa con la siguiente expresión:

$$\delta R = \sqrt{\left(\left(\frac{1}{2} - \frac{a^2}{2h^2}\right)\delta h\right)^2 + \left(\frac{a}{h}\delta a\right)^2} \quad (16)$$

Cabe recordar que una superficie plana tiene un radio de curvatura infinito, mientras que una estructura que presente una curvatura muy pronunciada tiene un radio de curvatura pequeño.

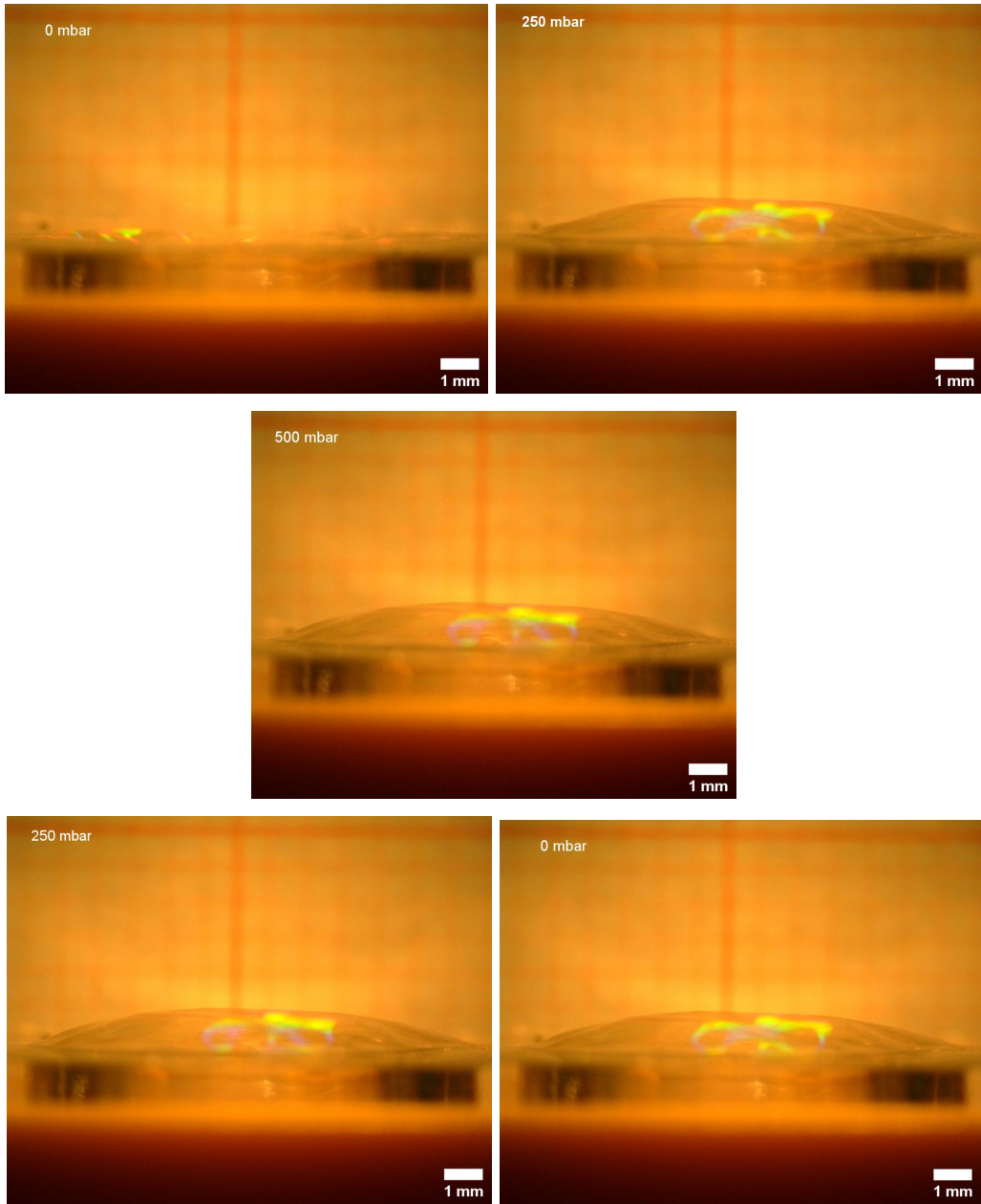
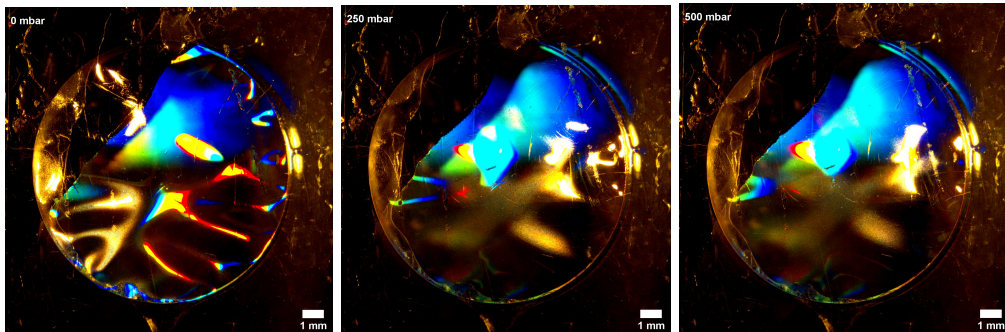


Figura 28: Imágenes laterales del dispositivo con membrana de Loctite 3525, en rampa de subida, de 0 a 500 mbar y de bajada, de 500 a 0 mbar.



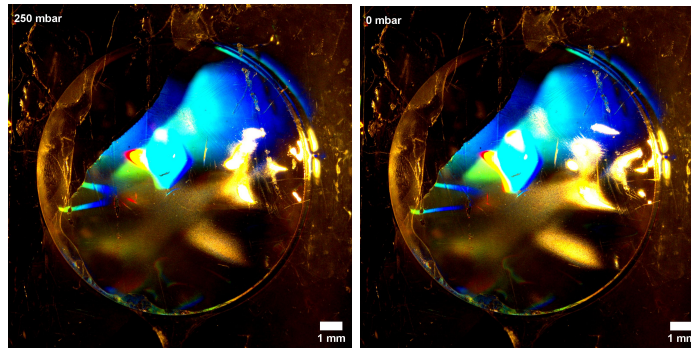


Figura 29: Imágenes apicales del dispositivo con membrana de Loctite 3525, en rampa de subida, de 0 a 500 mbar y de bajada, de 500 a 0 mbar.

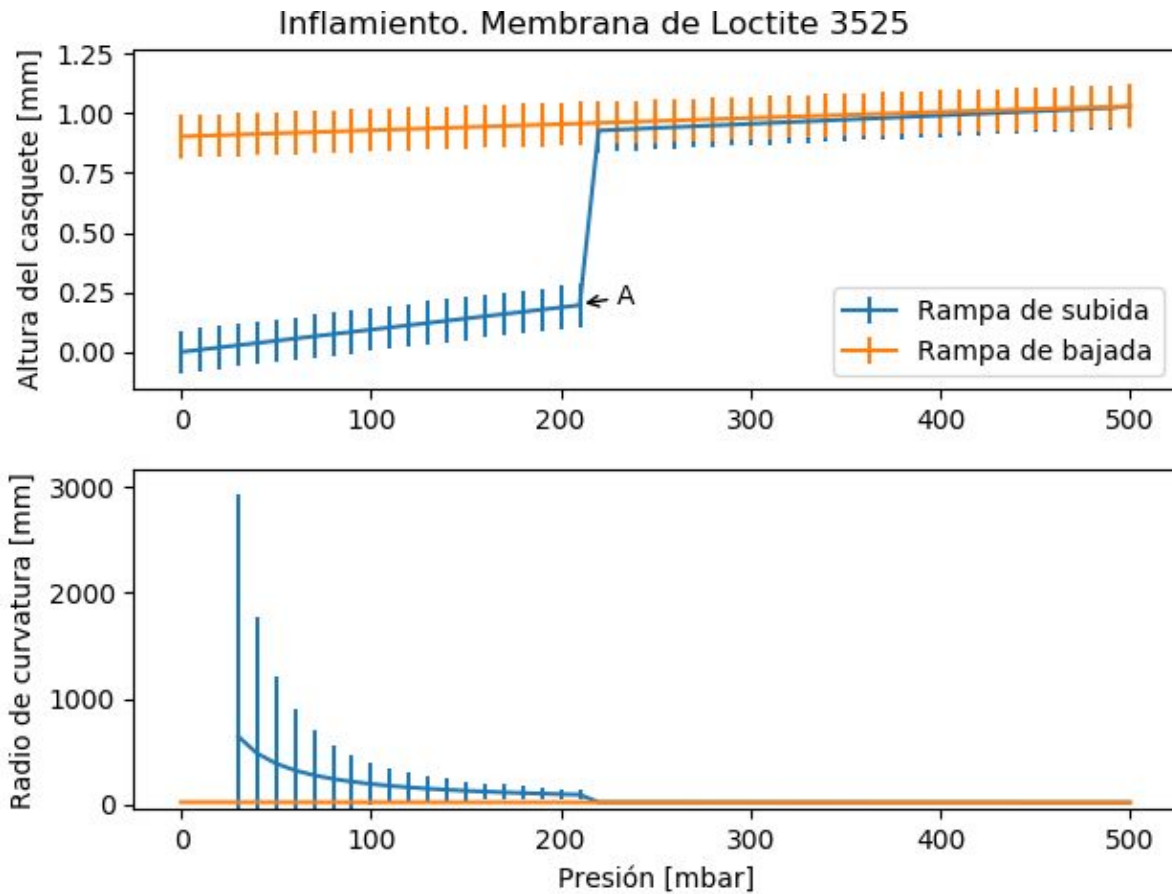


Figura 30: Dimensión de la altura del casquete esférico y radio de curvatura de la prueba de inflamieto con presión positiva, en rampa de subida y rampa de bajada para el dispositivo con membrana de Loctite 3525.

Existen diversas consideraciones que se pueden observar a partir de estos resultados. Primeramente, en la Fig. 30 podemos observar que, a diferencia de lo observado con la membrana únicamente de PDMS, presentada en la Fig. 27 y tomada de [68] el Loctite presenta un comportamiento plástico para los intervalos de presiones utilizados en esta caracterización. Esto se puede observar a partir de dos hechos:

- En este dispositivo en particular, la membrana presentaba arrugas al momento de la fabricación en el *chip*. Estas arrugas se mantuvieron durante el montaje experimental, por lo que se pueden tomar como una deformación que no volvió a su estado original después de retirar el esfuerzo.
- Además a diferencia de lo observado en la Fig. 27 en la membrana fabricada exclusivamente de PDMS que se presenta en [68], el dispositivo no presenta el mismo comportamiento en las curvas de incremento y de disminución de la presión. El comportamiento de la membrana de PDMS que se muestra en la Fig. 27 es consistente con el hecho del que el PDMS es un elastómero, por lo que regresa a la deformación original después de haber retirado el esfuerzo; a diferencia de lo que se muestra en el dispositivo con una membrana únicamente de Loctite 3525, en la Fig. 28, Fig. 29 y Fig. 30. De hecho, se observó incluso que después de retirar por completo la presión ejercida sobre la membrana y desconectar el dispositivo de las bombas, la membrana mantenía la deformación.

Otro aspecto que se puede recalcar del dispositivo fabricado con una membrana de Loctite 3525 consiste en las diferentes etapas que se pueden observar durante el inflamiento, mostradas en la Fig. 30, marcado en la figura con A. En el punto A, el incremento súbito en la altura del casquete se debe a que en este punto de la fabricación del *chip*, el proceso ocasionaba que hubiera arrugas sobre la membrana de Loctite 3525. En particular, para el momento en el que se fabricó ese *chip*, estas arrugas se generaron porque el proceso de polimerización completa se llevó a cabo a 60°C, siendo mayor a la temperatura de transición vítrea del Loctite 3525, que se encuentra a 50°C. Estas arrugas se pueden apreciar en la Fig. 29, y son muy notorias en la imagen correspondiente a 0 mbar. En la segunda imagen de dicha figura, que es a una presión P=250 mbar mayor a la que se encuentra el punto A (P=210 mbar), se puede observar cómo estas arrugas se encuentran completamente estiradas. Este comportamiento es congruente con lo explicado por [12], en donde una membrana flácida requiere una presión menor para llegar a cierta altura con respecto a la presión en el caso donde la membrana se encuentre con un esfuerzo inicial cero; es decir para el caso donde la membrana no se encuentre flácida ni tensa, sino en su longitud natural. El intervalo en el que la altura del casquete esférico de la membrana se infló durante esta rampa se encuentra entre 0 (P=0 mbar) y 1.0 mm (P=500 mbar), llegando a un radio de curvatura de 18.0 mm en la situación máxima de inflamiento.

Asimismo, se puede observar en la Fig. 29, la microestructuración de la membrana de Loctite, como una posible forma de caracterizar la deformación. Como se mencionó anteriormente, esta caracterización del desplazamiento a partir del cambio en el patrón de difracción se explorará con más detalle en [68].

Adicionalmente, para observar si la membrana de Loctite se fracturaba a presiones cercanas a las que se realizaron en la primera rampa, se realizó un inflamiento a una presión al doble de la elegida para la primera prueba, realizando una rampa adicional de 500 a 1000 mbar, cuyas imágenes laterales se muestran en la Fig. 31 y la gráfica de eje mayor y radio de curvatura se muestran en la Fig. 32.



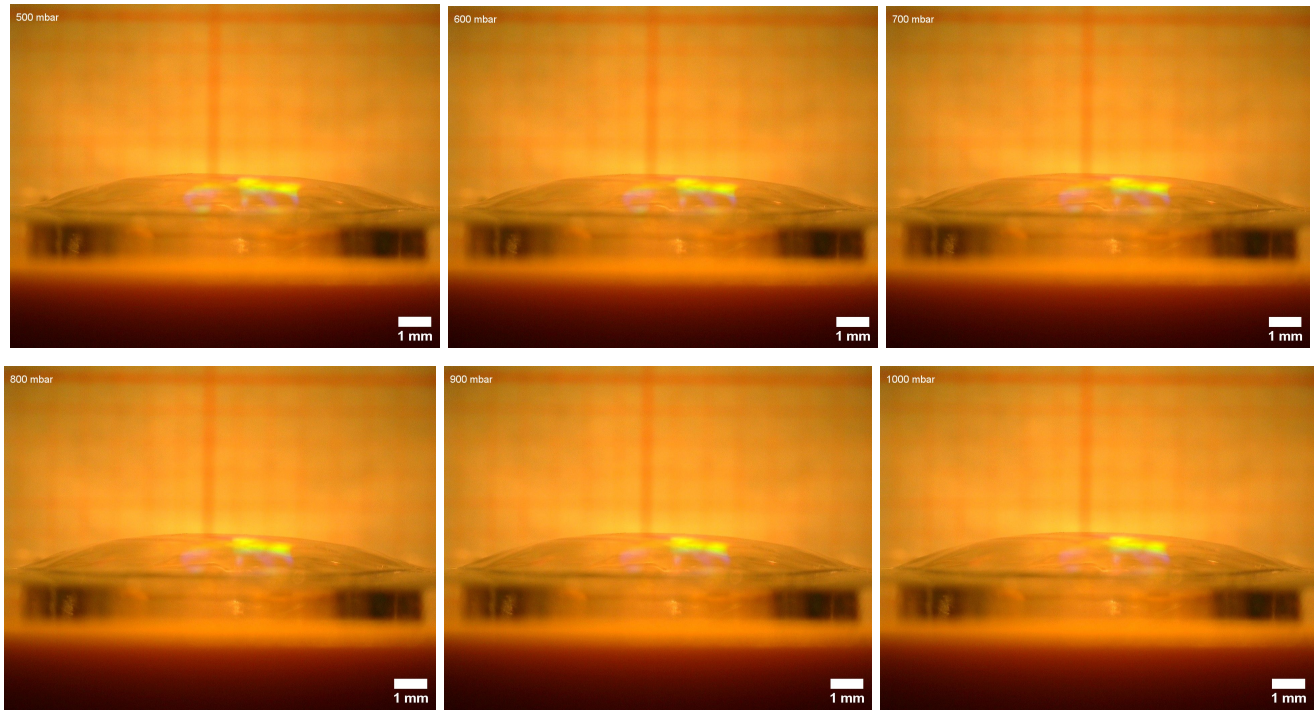


Figura 31: Imágenes laterales del dispositivo con membrana de Loctite 3525, en rampa de subida, de 500 a 1000 mbar.

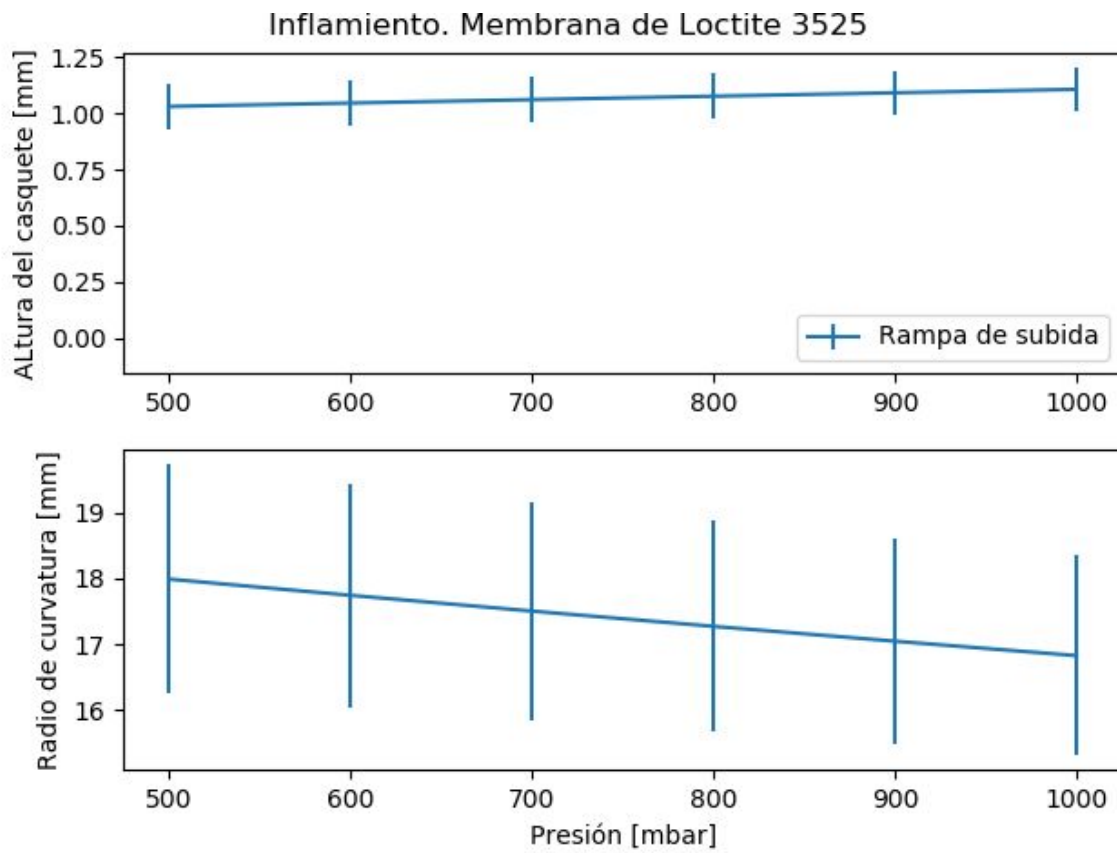


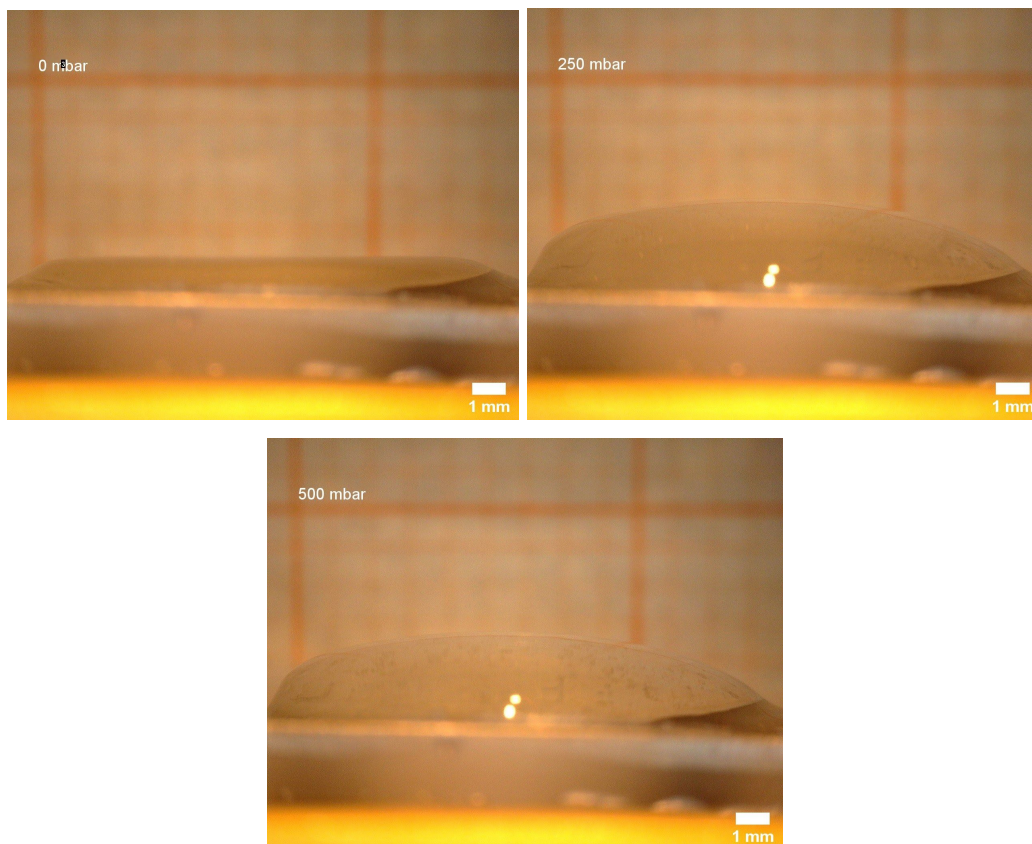
Figura 32: Altura del casquete esférico y radio de curvatura de la membrana de Loctite 3525.

En la Fig. 32, los ejes de la abscisa para la gráfica de la altura del casquete se encuentran escalados con el mismo intervalo que el mostrado en la Fig. 30. Lo que podemos observar, tanto en la Fig. 30 y Fig. 32, es

que el aumento de dimensiones de la altura del casquete, subiendo hasta  $P= 1000$  mbar no es mucho mayor al que se tiene a  $P=500$  mbar. Entre 230 y 500 mbar, de la Fig. 30, hay un incremento de la altura del casquete con respecto a la presión de  $3.65 \times 10^{-4} \frac{mm}{mbar}$ , mientras que en la Fig. 32, hay un incremento de  $1.52 \times 10^{-4} \frac{mm}{mbar}$ , de 500 a 1000 mbar. Esto se puede deber a que, aunque la presión aumente, el material esté cerca a su límite mecánico de deformación. Es decir, se sugiere que llegue un punto en el cual la membrana de Loctite 3525 ya se encuentre completamente tensa, incapaz de seguirse deformando a pesar de que aumente la presión. De hecho, el Loctite 3525 es un material rígido, con un módulo de Young de 175 MPa. El siguiente evento notable que podría suceder en este sentido podría ser el estallamiento de la membrana. Las bombas microfluídicas que se utilizaron son conocidas como de control de presión; y éstas aseguran que la presión hidrostática que se transmita en un sistema se mantenga acorde a lo que indica la bomba, incluso aunque existan obstáculos o fugas en el sistema. Debido a lo anterior, se descarta que la no deformación de la membrana de Loctite 3525 se deba a las bombas, y se atribuye más bien a las propiedades de la membrana. Otro aspecto que podemos obtener de esta prueba consiste en establecer un posible rango de operación para el dispositivo de inflamamiento: De esta prueba, podemos observar que la membrana de Loctite 3525 es capaz de soportar una presión hidrostática de al menos  $P=1000$  mbar (750 mmHg), sin presentar ninguna fuga. Debido a que el dispositivo se pretende utilizar para simular estímulos mecánicos en células, y la presión arterial máxima registrada en un ser humano es de 370/360 mmHg [71], y la presión arterial es mayor que cualquier otra presión hidrostática dentro del cuerpo. Esto nos permite ver que la membrana de Loctite 3525 puede resistir adecuadamente las presiones para las cuáles este *chip* está pensado, en particular presión intratorácica (-10 mmHg) y presión intestinal (10-12 mmHg) [72].

## 3.2 *Chip* con membrana de Loctite 3525 y recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida

Por otro lado, se realizó una caracterización del dispositivo con una membrana de Loctite 3525 y con un recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida con un módulo de Young esperado de 20 kPa. En la Fig. 33 se muestran las imágenes laterales de este dispositivo, mientras que en la Fig. 34 se muestra una imagen lateral del hidrogel después de que pasaron 10 minutos después de retirar la presión en las bombas; en la Fig. 35, las imágenes apicales y en la Fig. 36 se muestra la gráfica de altura del casquete esférico y radio de curvatura para el dispositivo con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida. Se realizó un ciclo consistente de una rampa de aumento de la presión de 0 a 500 mbar y una rampa de disminución de 500 mbar a 0 mbar; e inmediatamente, un segundo ciclo de 0 a 500 mbar y de 500 a 0 mbar. Sin embargo, las rampas de aumento y disminución de la presión se observan idénticas entre sí en el segundo ciclo, por lo que, en la Fig. 37, se tiene la misma caracterización, pero se muestran únicamente las curvas correspondientes al primer ciclo de aumento y disminución de la presión.





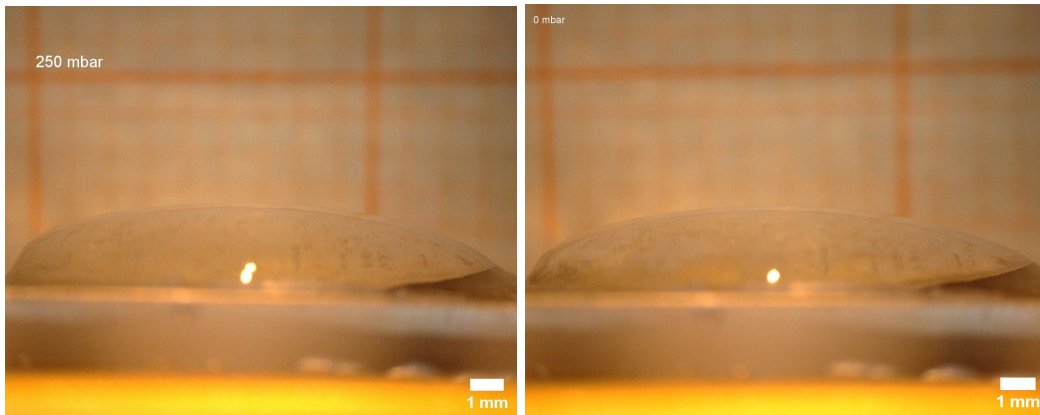


Figura 33: Imágenes laterales del dispositivo con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida con un módulo de Young esperado de 20 kPa, en rampa de subida, de 0 a 500 mbar y de bajada, de 500 a 0 mbar.

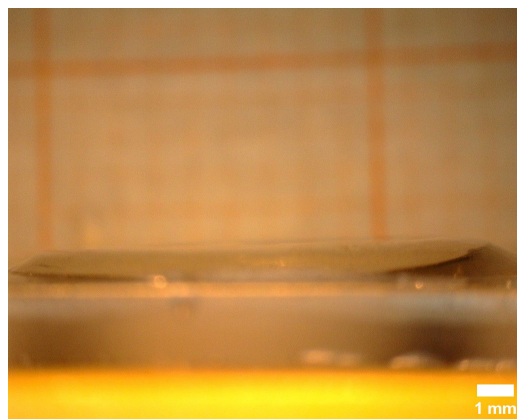
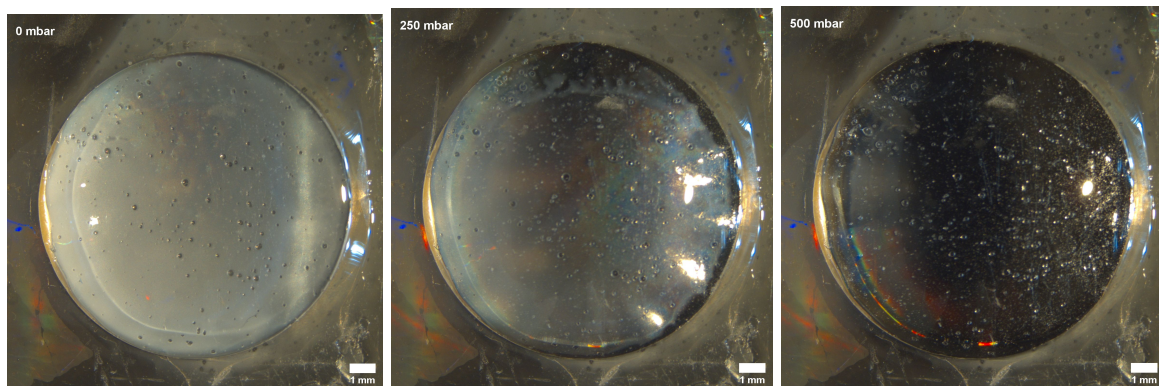


Figura 34: Imagen lateral de dispositivo con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida con un módulo de Young esperado de 20 kPa, 10 minutos después de haber retirado la presión en las bombas.





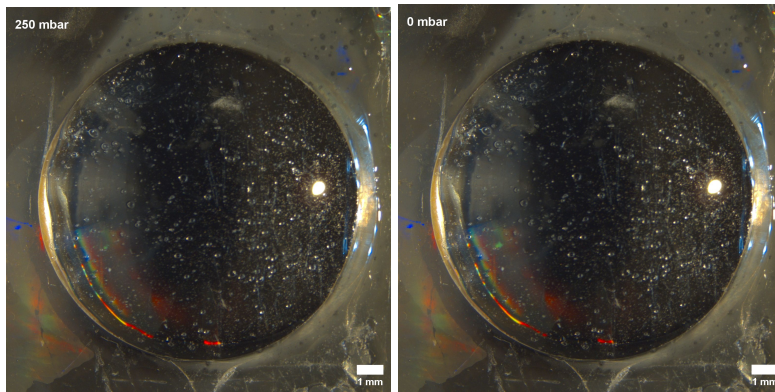


Figura 35: Imágenes apicales del dispositivo con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida con un módulo de Young esperado de 20 kPa, en rampa de subida, de 0 a 500 mbar y de bajada, de 500 a 0 mbar.

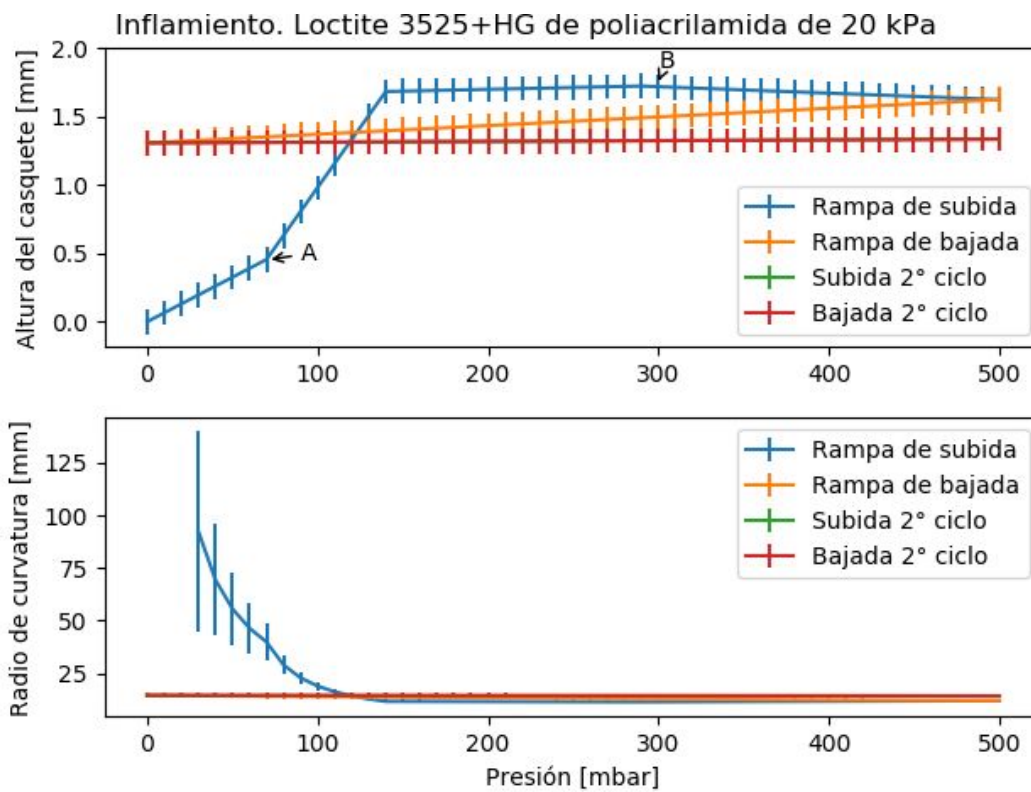


Figura 36: Altura del casquete esférico y radio de curvatura de la prueba de inflamieto con presión positiva, en dos ciclos de subida y bajada, en un dispositivo con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida con un módulo de Young esperado de 20 kPa. En el segundo ciclo, la rampa de subida se superpone casi idénticamente con la rampa de bajada del dispositivo.

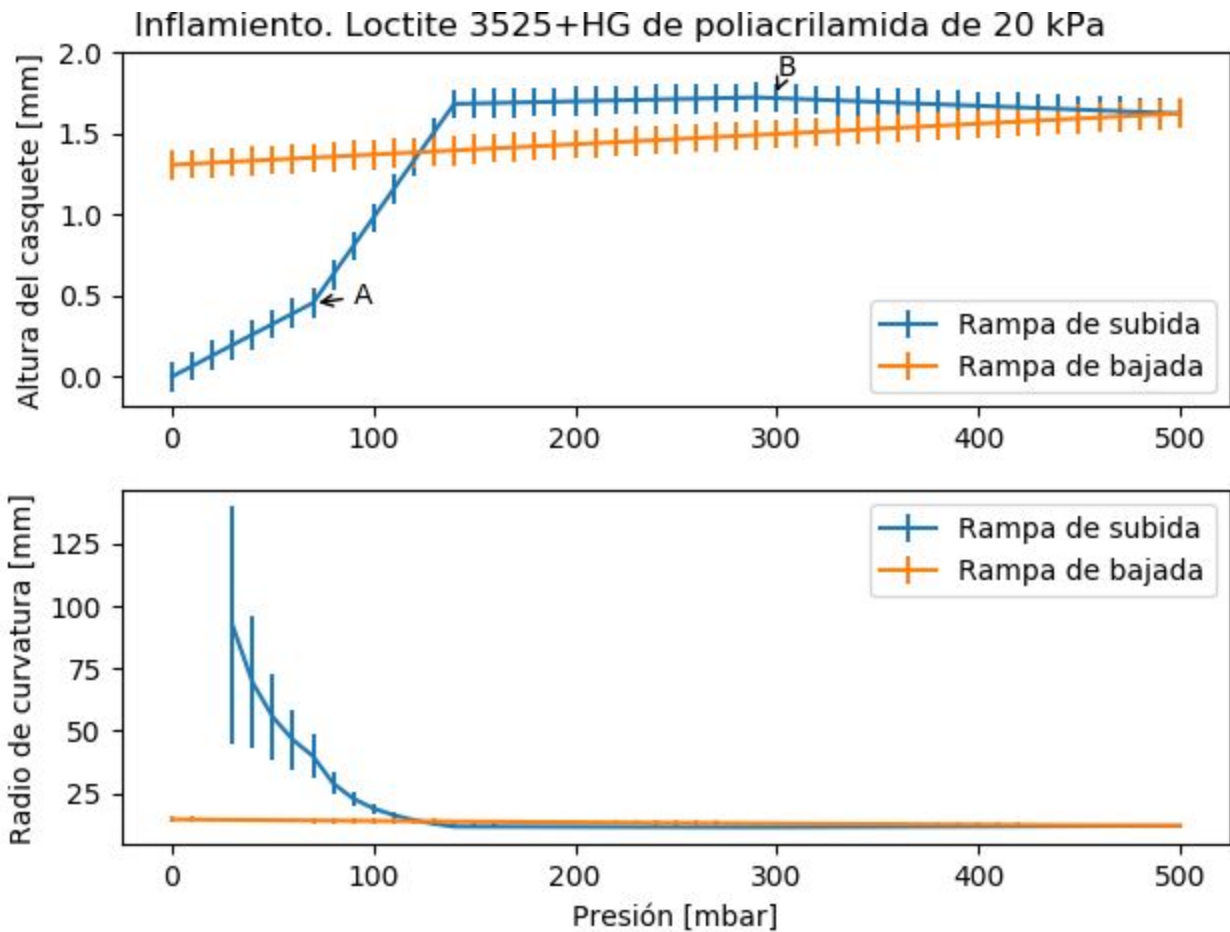


Figura 37: Misma gráfica que la Fig. 36, donde sólo se muestran las rampas de subida y bajada del dispositivo.

De la Fig. 37, podemos observar dos puntos, marcados con el punto A y punto B. En el punto A ( $P=80$  mbar) observamos un incremento súbito en la dimensión de la altura del casquete esférico, que nuevamente puede encontrar su explicación en que esta es la presión necesaria para que el esfuerzo se transmita en su totalidad al hidrogel de poliacrilamida. Por otro lado, el punto B muestra un decremento en las dimensiones de la altura del casquete esférico de la elipse. Esto puede deberse a que, nuevamente la bomba llega al máximo esfuerzo que puede proporcionar para una transmisión en un fluido estático, y esta presión es contrarrestada por el peso y las fuerza restitutivas del hidrogel de poliacrilamida.

En las imágenes apicales mostradas en la Fig. 35, podemos observar que a 0 mbar, el hidrogel de poliacrilamida se aprecia opaco, mientras que en la imagen a 500 mbar, se aprecia transparente. Esto se puede deber a que conforme aumenta la presión, hay un contacto más efectivo entre la membrana de Loctite 3525 y el hidrogel de poliacrilamida, por lo que la dispersión de la luz en la interfaz entre hidrogel y membrana de Loctite 3525 disminuye cuando la presión aumenta.

Debido a la superposición de las rampas de inflamamiento para el segundo ciclo mostrados en la Fig. 36, podríamos primeramente pensar que este dispositivo hereda el comportamiento plástico que se observó en el dispositivo que únicamente tiene membrana de Loctite 3525, pues al retirar la presión de las bombas, se mantiene la deformación. Sin embargo, después de un tiempo aproximado de 10 minutos y haber sido desconectado de las bombas, el dispositivo regresa a la posición original, y una imagen de

esto se muestra en la Fig. 34. Los hidrogeles de poliacrilamida son elásticos [46], por lo que el hecho de que regrese a una posición similar a la inicial, sugiere que el recubrimiento de hidrogel presenta fuerzas restitutivas que causan que el dispositivo regrese a su posición inicial. Por ejemplo, en [35] se observa que un material elástico puede revertir una deformación plástica, para cierto rango de deformación. Por lo tanto, después de analizar los datos de la rampa de bajada más cuidadosamente, llama mucho la atención que después de bajar la presión en las bombas, el dispositivo mantenga exactamente la misma deformación. Después de una segunda reflexión, se llegó a la conclusión de que el Loctite 3525 es rígido y no permite que las fuerzas restitutivas elásticas del hidrogel de poliacrilamida actúen inmediatamente. El hecho de que el Loctite 3525 tenga una rigidez de 175 MPa vs los 20 kPa del hidrogel de poliacrilamida apoya esta explicación.

La altura del casquete esférico de la membrana al inflarse fue de 0, (P=0 mbar) a 1.7 mm (P=300 mbar), obteniendo un radio de curvatura de 11.3 mm en el inflamamiento máximo.

Una vez teniendo la caracterización de ambas clases de dispositivos, se compararon antes comportamientos. Dicha comparación se muestra en la Fig. 38.

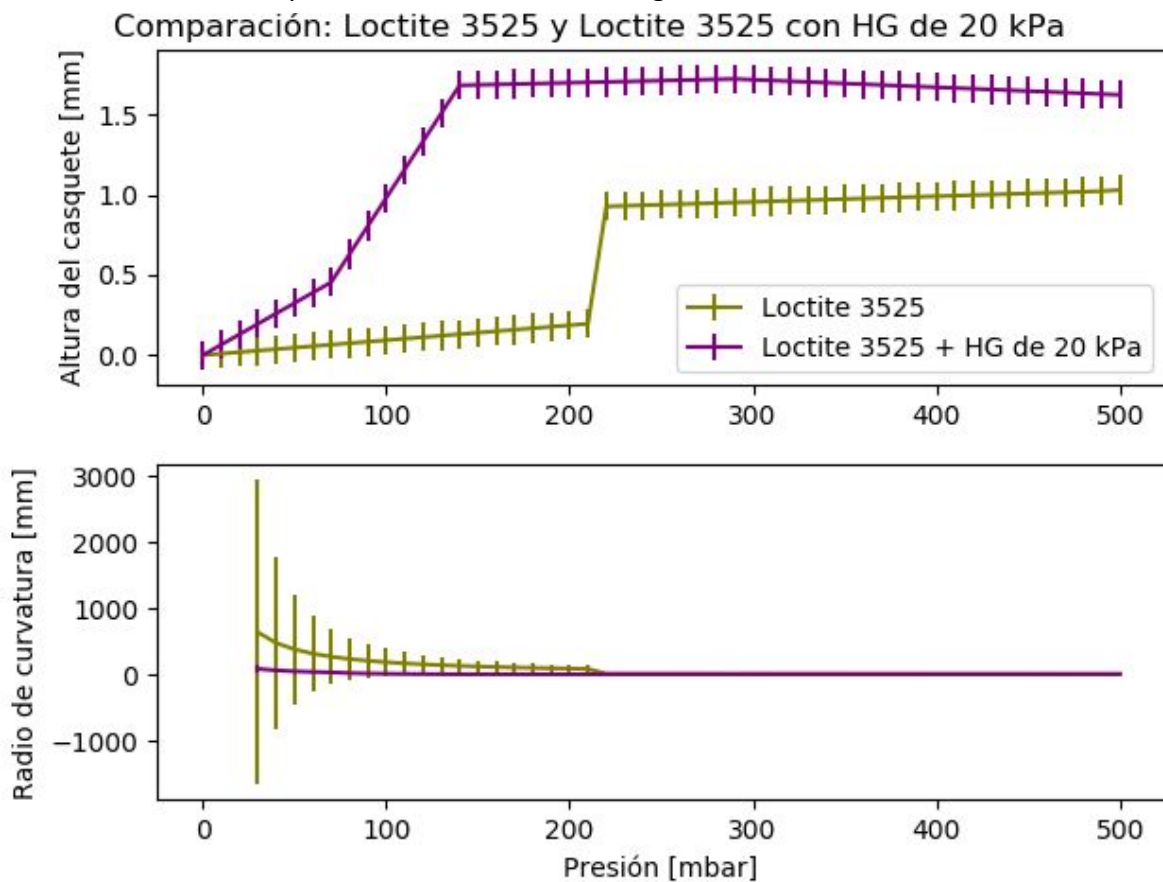


Figura 38: Comparación entre rampas de subida de 0 a 500 mbar para un dispositivo con membrana de Loctite 3525 y para un dispositivo con membrana de Loctite 3525 y con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida con un módulo de Young esperado de 20 kPa.

En la Fig. 38 podemos observar la comparación entre las rampas de inflamamiento para el dispositivo con membrana de Loctite 3525 y con membrana de Loctite 3525 con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida de 20 kPa. Debido a que se tiene una membrana de Loctite 3525 con un recubrimiento de

otro material, en este caso, hidrogel de poliacrilamida, se esperaría que el hidrogel de poliacrilamida requiriera una mayor presión para lograr la misma deformación que el Loctite y, sin embargo, se observa el comportamiento contrario. Esto tiene su explicación en la forma de elegir el sistema de referencia para realizar el análisis de las imágenes. Como se menciona en la sección [2.2 Caracterización del dispositivo](#), para realizar la medición se establece una línea de referencia, a partir de la cual se realiza la medición de la altura del casquete esférico. La diferencia en espesor entre el *chip* con membrana de Loctite 3525, como en el *chip* con recubrimiento de hidrogel, es de alrededor de 1 mm, y el origen del sistema de referencia para la altura del casquete se estableció como una línea que pasara por la membrana plana, antes de inflarse. Esto causa que la línea de referencia a partir de la que se toma la medición, sea distinta para ambos casos, ocasionando un posible error de paralaje. La prueba de abultamiento es altamente sensible a este tipo de errores, por lo que, para llegar a una mejor caracterización del dispositivo, sería necesario implementar otro método de toma de imágenes y de caracterización de la deformación, por ejemplo, por medios interferométricos [68]. No obstante, en ambos casos, se estableció un círculo para realizar la medición, partiendo de la suposición de que se forma un bulto en forma de casquete esférico al momento del inflamamiento. Según lo expuesto por Small y Nix [12], esta suposición es correcta para una película delgada, monocomponente, en donde la curva esfuerzo vs. deformación sea de forma exponencial, como lo propuesto por Hill[21]; consideraciones que no se cumplen en nuestro dispositivo. Además, como se expuso en la sección [1.1.3 Comportamiento de una membrana circular sujeta a inflamamiento](#), una membrana flácida, que presenta arrugas, como el caso del *chip* únicamente con membrana de Loctite 3525 requiere una presión menor para llegar a una altura deseada [19]. Esto se contrapone al *chip* con recubrimiento de hidrogel, donde se cuidó que la membrana de Loctite 3525 se encontrara plana al momento de colocar el hidrogel. Por todos los puntos mencionados a continuación, se puede pensar que estas muestras no son comparables entre sí, ya que las suposiciones que rigen a cada una al momento de realizar las caracterizaciones son particulares para cada una de estas muestras. Para asegurar la reproducibilidad y repetibilidad, sería importante realizar la fabricación y caracterización de diversas muestras, con y sin recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida, cuidando las consideraciones mencionadas anteriormente. El comportamiento plástico que se observa en las muestras implica que después de caracterizar una muestra en estos rangos de presión, ésta se tendría que descartar. Lo anterior debido a que, al no regresar la muestra a su posición original, no era posible considerar que los datos obtenidos se encontraran en las mismas condiciones que la primera rampa de caracterización. Dado que el objetivo final de este trabajo estuvo enfocado a la fabricación del *chip* de inflamamiento con hidrogel, se prefirió adherir la poliacrilamida al dispositivo, en lugar de realizar varias pruebas de caracterización. Se debe realizar la caracterización del comportamiento de las muestras con respecto a la presión, y hacer un análisis estadístico, entre distintos *chips*.

Los materiales de los que se compone el dispositivo presentan un comportamiento elástico, tanto el Loctite 3525 como los hidrogeles de poliacrilamida [43,46], por lo que se esperaba que el dispositivo en su totalidad heredara esta característica. Sin embargo, el comportamiento del dispositivo muestra que este no tiene un comportamiento elástico, llegando a presentar memoria de la deformación y un tiempo de relajación después de haber retirado el esfuerzo. Esto se puede deber a que los esfuerzos que se aplicaron sobre el dispositivo fueron mayores al límite de la deformación plástica de los materiales. Por las dimensiones y características de los elementos que componen al *chip*, se puede atribuir que el componente que sobrepasó el límite elástico consiste en la membrana de Loctite 3525. De este

comportamiento, quedaría pendiente la pregunta de si para presiones y deformaciones pequeñas, el dispositivo heredaría el componente elástico.

El dispositivo aquí mostrado permite obtener cambios controlados de deformación debido a presión hidrostática. La aplicación pensada de este dispositivo consiste en realizar estímulos mecánicos a células, sin embargo, este dispositivo se puede adaptar para ser un dispositivo capaz de realizar una prueba de abultamiento (*bulge test*), como el mostrado en [12], pues es capaz de proveer un estímulo biaxial a los materiales. Para realizar esta aplicación, se debe: fabricar una membrana lisa y delgada, asegurar una muy buena adhesión de la membrana a los bordes de la cámara circular, y mantenerse en el límite elástico de la deformación. Además, se deben conocer las propiedades mecánicas de los materiales involucrados, en particular, módulo de Young ( $E$ ), coeficiente de Poisson  $\nu$ , y módulo biaxial ( $Y$ ) de los materiales involucrados. En caso de utilizar los materiales que se presentan en este trabajo, se debe utilizar un modelo adecuado de la prueba de abultamiento que considere, por un lado, una membrana compuesta de dos materiales, y por el otro un modelo que considere una membrana no incompresible, es decir, en la cual no se realice la aproximación de película delgada, como el mostrado en [25]. Además, se debe establecer un sistema de medición preciso, pues, un error medido en la altura de la membrana inflada se refleja en una variación aparente en las propiedades mecánicas observadas. Además, como comentario, es necesario realizar un modelado teórico del dispositivo, incluyendo la obtención los coeficientes mecánicos de todos los materiales utilizados para realizar una interpretación más robusta de los resultados aquí presentados.

En la sección [1.1.3 Comportamiento de una membrana circular sujeta a inflamamiento](#) se presentó una base teórica nutrida con respecto a la prueba de abultamiento, que utiliza el mismo principio de funcionamiento que el *chip* de inflamamiento presentado en este trabajo. Sería ideal lograr estimar los esfuerzos que se pueden generar y/o transmitir a las muestras. Sin embargo, en el presente trabajo no se cuenta con suficiente información teórico-experimental para llevar a cabo dicha estimación, ya que el enfoque principal del trabajo fue dirigido hacia la fabricación.

Con la caracterización mostrada en esta sección, podemos observar el comportamiento del dispositivo con respecto a la presión, para los dos materiales con los que se construyó el dispositivo: membrana de Loctite 3525 y membrana de Loctite 3525 con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida. Se demuestra que el radio de curvatura se puede modular con una modificación de la presión y esto sienta las bases para seguir desarrollando este dispositivo para realizar estímulos mecánicos sobre células epiteliales y endoteliales. En el capítulo [5. Perspectivas y trabajo a futuro](#) se mencionan las caracterizaciones y experimentos necesarios que se requieren para hacer de este dispositivo un dispositivo que permita realizar estímulos mecánicos a células endoteliales y epiteliales, con las características adecuadas para que las células perciban los estímulos mecánicos de interés compatibles con el ambiente del que son originarias.

## 4. Conclusiones

Se generó un diseño y se estandarizó un procedimiento robusto para la fabricación de un *chip* microfluídico. La función de este *chip* es generar un inflamamiento sobre una membrana, transmitiéndole un esfuerzo mecánico a través de cambios de presión que se traduce en un cambio de las condiciones de curvatura y rigidez local de esta. El *chip* consiste en un soporte de PDMS con canales microfluídicos y una cámara de inflamamiento, sobre la cual se encuentra una membrana del adhesivo a base de acrilatos Loctite 3525 y un recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida. El dispositivo está fabricado a partir de materiales biocompatibles que pueden ser esterilizados y funcionalizados para realizar cultivo celular sobre ellos, y son ópticamente transparentes; por lo que es compatible con las técnicas de cultivo celular. El diseño del dispositivo es adaptable y puede modificarse fácilmente para responder a diferentes necesidades que requieran los experimentos en los cuales se utilice el *chip*. Las características que se pueden modificar del dispositivo son: dimensiones del *chip*, tamaño de la cámara de inflamamiento, espesor de los materiales utilizados, geometría de los canales microfluídicos, materiales utilizados para transmitir el inflamamiento, fluido utilizado como transmisor de presión, entre otras.

Los hidrogeles de poliacrilamida son conocidos, entre otras cosas, porque se puede controlar la rigidez de los mismos a partir de modificación en la proporción de mezcla de sus componentes y son compatibles con el cultivo celular. Sin embargo, se suelen utilizar en geometrías planas, por lo que este trabajo abre la posibilidad a que se integre en este dispositivo todo el conocimiento que se tiene en torno a los hidrogeles de poliacrilamida, para realizar cultivo celular con una modificación controlada de la curvatura. El estado en el que se encuentra la fabricación del dispositivo actualmente permite directamente integrar los procedimientos de cultivo biológico, por ejemplo, los procesos de funcionalización de las proteínas. Además, así como el diseño del dispositivo es adaptable, el procedimiento de fabricación también, y el proceso se puede modificar según las necesidades que se requieran en la aplicación del *chip*. Dos ejemplos se enuncian a continuación: En este trabajo se mostró que es posible la microestructuración utilizando una rejilla de difracción en la membrana que está sujeta a inflamamiento. Sin embargo, el proceso de fabricación puede ser adaptado para utilizar otro tipo de microestructuras, que se deformarán de forma controlada con este *chip*. El otro ejemplo consiste en que, ya que el proceso de fabricación es multicomponente, puede ser modificado para permitir la utilización de distintos materiales en las partes internas y externas del *chip*; por ejemplo, la introducción de hidrogel de poliacrilamida dentro de la cámara de inflamamiento para el sembrado de células en la parte interior del *chip*.

Se estableció, asimismo, un protocolo de caracterización, en donde se observó la deformación del dispositivo a partir de cambios controlados de presión utilizando bombas microfluídicas de control de presión y la observación a través de una cámara lateral y una cámara apical; para una apreciación completa de la deformación. Durante este proceso, se observa que el dispositivo en efecto cuenta con la característica de ser compatible con técnicas de microscopía, en particular por tener un tamaño similar a un portaobjetos y por la transparencia que muestra el dispositivo a la luz visible. Se realizó la caracterización del dispositivo en dos versiones del mismo: uno en donde se sujeta al inflamamiento una membrana del adhesivo Loctite 3525; y otro donde se utiliza una membrana de Loctite 3525 con un



recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida con un módulo de Young esperado de 20 kPa. Se utilizó inflamiento con presiones positivas, en un intervalo de 0 a 500 mbar (0 a 375 mmHg), para observar el comportamiento del dispositivo en un intervalo que abarcara todo el rango de presiones encontradas dentro del cuerpo humano; ya que se buscaba desde la concepción que el dispositivo pudiera ser utilizado para realizar estímulos mecánicos de presión y deformación para estudiar los efectos de este sobre cultivos celulares.

Durante esta caracterización se encontraron diversos resultados. Primeramente, se encontró que el dispositivo resiste sin presentar fugas o comprometer la integridad estructural de la membrana sujeta a inflamiento el rango de presiones seleccionado; por lo que el dispositivo puede inflarse con este rango de presiones que se encuentran en el rango fisiológico. Por otro lado, se observó el comportamiento de las dos versiones del dispositivo mencionadas anteriormente. De experimentos anteriores, se tiene que tanto el Loctite 3525 como los hidrogeles de poliacrilamida presentan un comportamiento elástico. No obstante, en el dispositivo cuya membrana se encuentra compuesta únicamente de Loctite 3525, se observó que, para los rangos de presión y deformación que se utilizaron, este presenta un comportamiento plástico; lo que implica que se ha superado el límite de deformación plástica de este componente. Este comportamiento se observa en la presencia de arrugas y la memoria de inflamiento de la membrana de Loctite 3525. El mismo comportamiento se hereda en el dispositivo con membrana de Loctite 3525 y recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida; pues esta configuración también presenta memoria de inflamiento. Sin embargo, las fuerzas restitutivas en el hidrogel de poliacrilamida provocan que se revierta la deformación plástica. No obstante, la combinación de estos dos tipos de comportamientos no impiden que la transmisión del esfuerzo de inflamiento en el dispositivo llegue a la parte superior del dispositivo. Debido a lo anterior, efectivamente se puede proveer al cultivo celular de un estímulo de modificación de la curvatura local, al sembrar en la parte superior del *chip*, donde se tiene una deformación que puede ser controlada. Con este dispositivo, se lograron deformaciones, con altura máxima del casquete de inflamiento de 1 mm (Radio de curvatura=18.0 mm), para el caso del dispositivo con membrana de Loctite 3525; y uno de 1.7 mm (Radio de curvatura=11.3 mm) para el caso de la membrana de Loctite 3525 con hidrogel de poliacrilamida.

El proceso para la fabricación del *chip* presentado en este trabajo integra técnicas altamente conocidas hoy en día en líneas de investigación afines al desarrollo de sistemas microelectromecánicos biomédicos. El principio de funcionamiento de este dispositivo permite, en un futuro, utilizarlo en una aplicación novedosa, ya que, a pesar de que los hidrogeles de poliacrilamida han sido ampliamente utilizados en estudios de mecanobiología, en la revisión de la literatura que se realizó, no se encontró ningún dispositivo que provea al hidrogel de poliacrilamida un estímulo de deformación biaxial por inflamiento. El *chip* presentado en este trabajo sienta un precedente para, en un futuro, poder estudiar las respuestas celulares a cambios de curvatura local y rigidez a través de cambios controlados de presión. Además, estas condiciones se pueden variar incluso después de haber cultivado las células sobre él, mediante la presión de entrada sobre el *chip*. Asimismo, con las adaptaciones necesarias en el diseño o fabricación, puede utilizarse en diversas aplicaciones en las que se aproveche el principio de funcionamiento del *chip*; tanto en estudios biológicos como en caracterización de materiales por medio de la prueba de abultamiento.

## 5. Perspectivas y trabajo a futuro

En esta sección se muestran diversos aspectos a mejorar en los procesos de fabricación o caracterización del dispositivo, así como distintas líneas que puede seguir la experimentación con este dispositivo, con vistas al uso de este dispositivo para una aplicación en particular.

### Mejoras a los procesos presentados en este trabajo

Durante el proceso de fabricación, es recomendable depositar una cantidad menor de hidrogel de poliacrilamida, de tal forma que se deposite únicamente una capa delgada de material, para lograr un recubrimiento más delgado y que se requiera menor esfuerzo transmitido por la membrana para provocar una deformación de material. Debido a que en este caso la membrana de hidrogel sería más delgada, para verificar que en efecto el hidrogel se encuentra cubriendo adecuadamente el dispositivo, se puede teñir para facilitar su observación.

Para el proceso de caracterización, se sugiere utilizar presiones menores, produciendo deformaciones pequeñas, para verificar si se mantiene el comportamiento elástico. Si en realidad se presenta el comportamiento elástico, sobre el dispositivo se pueden realizar estímulos oscilatorios sobre el dispositivo. Se espera que, al mantenerse dentro de un régimen elástico, el dispositivo se pueda emplear con un estímulo de presiones oscilantes, en particular a bajas frecuencias, correspondientes con los estímulos a las que estarían sometidas las células que se desean cultivar. En particular, se espera que el dispositivo sea capaz de responder a estímulos realizados a frecuencias similares a la frecuencia cardiaca ( $f \sim 1 \text{ Hz}$ ) o a la frecuencia respiratoria ( $f \sim 0.2 \text{ Hz}$ ). Por otro lado, se prevé que el dispositivo responda mejor a estímulos oscilantes, es decir, con un flujo reversible de inflamamiento y desinflamamiento, que a estímulos pulsátiles, es decir, con un flujo en una sola dirección. Esto se pronostica ya que es posible que el tiempo de relajación del dispositivo sea mayor al período de los estímulos pulsátiles, mientras que un flujo bidireccional facilitaría esta respuesta.

Por otro lado, dentro del proceso de caracterización también se deben mejorar la toma y análisis de imágenes. En particular, el enfoque, la alineación y la iluminación de la muestra deben dejar de ser una variable durante el experimento; pues esto provoca que la medición de la altura del casquete esférico sea incorrecta, o tenga una incertidumbre alta. Los instrumentos que están enfocados en la medición de una prueba de abultamiento, tanto comerciales como de elaboración casera tienen en cuenta estas variables; algunos de ellos incluso realizando mediciones interferométricas para la caracterización. Una propuesta para mejorar la adquisición de imágenes consistiría en fabricar un aparato experimental a medida del *chip* de inflamamiento, que incluyera una cámara lateral, una cámara apical y un sistema de iluminación, todos ellos fijos. Primeramente, el bloque de PDMS del *chip* de inflamamiento tendría que ser del mismo tamaño que el portaobjetos de vidrio, para evitar una variación de la posición relativa entre el *chip* y el sustrato para distintos *chips*. Esto se puede lograr polimerizando el PDMS en un molde más grande, de tal forma que quede a tamaño del portaobjetos de vidrio. Otra alternativa es cortar los sustratos de vidrio al tamaño del PDMS. Luego, el aparato de medición tendría que tener un portamuestras con un mecanismo de alineación, para asegurar que la posición relativa de la cámara con



respecto a la muestra sea la misma para todas las mediciones. Por otro lado, la fuente de iluminación tendría que ser fija y proporcionar siempre la misma intensidad de luz. Además, debe estar posicionada de tal forma que la imagen lateral tenga el mayor contraste posible con respecto al fondo, por ejemplo, como en el caso de pruebas de ángulo de contacto. La cámara lateral también deberá tener un sistema de enfoque que permita establecer el enfoque justo en el centro de la membrana; mientras que la cámara apical deberá poder enfocarse sobre la superficie de la muestra. Con esta propuesta de aparato de medición, se resolverían las situaciones de contraste, alineación y enfoque.

Otro aspecto que se debe considerar es realizar la fabricación de un número importante de dispositivos y caracterizarlos, para establecer una curva de calibración entre presión y radio de curvatura, para una rigidez de hidrogel en particular, y así asegurar la repetibilidad y reproducibilidad de un dispositivo. Esta caracterización no se presenta en este trabajo debido a que, como se determinó que la deformación de la membrana de Loctite era plástica a las presiones utilizadas, se consideró que la caracterización sería una prueba destructiva para cada una de las muestras. Sin embargo, nuevamente si el esfuerzo se mantiene a deformaciones pequeñas, donde el régimen elástico se mantenga, podrá realizarse esta caracterización.

## Cultivo celular y pruebas biológicas

Uno de los pasos más inmediatos que se consideran necesarios realizar con el dispositivo consiste en sembrar células sobre el hidrogel de poli(acrilamida) y realizar cultivo celular sobre ellos. Para esto, es necesario entrecruzar la proteína adecuada en la superficie del hidrogel [46]. Posteriormente se puede realizar el cultivo celular de células convenientes, deformar el dispositivo hasta la curvatura deseada y observar la respuesta celular después de la deformación. Como se mencionó anteriormente, los componentes del *chip* se han utilizado en trabajos previos con fluorocromos, tales como calceína y yoduro de propidio, kit para detectar apoptosis con fluoresceína, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594. Por lo tanto, este dispositivo es compatible con técnicas de microscopía de fluorescencia. En general, se espera que se pueda utilizar con cualquier fluorocromo. Con respecto a este punto, se debe tener cuidado al utilizar fluorocromos cercanos al azul, pues el Loctite 3525 fluoresce fuertemente en el espectro ultravioleta. Sin embargo, si este fuera el caso, se puede utilizar microscopía confocal para aumentar el contraste entre el fondo y la señal.

Las pruebas que se hicieron con este dispositivo fueron realizadas a temperatura ambiente, sin control de temperatura. No obstante, todos los componentes utilizados en este dispositivo son compatibles a ser operados a una temperatura a 37 °C, que es la temperatura a la que se suelen realizar los procesos de cultivo celular. Para el cultivo celular, el dispositivo se puede esterilizar utilizando una solución de antibióticos o mediante irradiación con UV. Resulta oportuno mencionar que el *chip* no es compatible con un proceso de esterilización con autoclave, debido a que las temperaturas que se alcanza con este método son superiores a la temperatura de transición vítrea del Loctite 3525 ( $T_g=50^\circ\text{C}$ ), comprometiendo la integridad del mismo.

Cabe mencionar que para mantener una deformación durante un tiempo prolongado el *chip* debe permanecer con el esfuerzo presente. Esto se podría lograr manteniéndolo conectado a la bomba microfluídica e introducir las conexiones a la incubadora o inflar el *chip*, sellarlo reversiblemente e introducirlo a la incubadora.

## Inflamamiento junto con pruebas de indentación mecánica

Las pruebas de indentación mecánica son pruebas de caracterización de materiales que funcionan indentando la superficie de una muestra con una punta. Los datos obtenidos se pueden traducir en curvas de esfuerzo-deformación, y con la aplicación del modelo correcto para el análisis de los datos, se pueden obtener propiedades mecánicas de los materiales.

En ese sentido, otra de las caracterizaciones más inmediatas que se pueden realizar con este dispositivo consiste en realizar el inflamamiento del dispositivo y realizar pruebas de indentación para sensar la rigidez local que percibirían las células de acuerdo al inflamamiento. En el laboratorio donde se desarrolló este dispositivo, se tiene acceso a un equipo de ensayos micromecánicos que realiza una indentación sobre la superficie del material. Sería muy fructífero que los datos experimentales fueran acompañados de un modelo teórico del comportamiento de la membrana ante cambios de presión, ya sea analítico o por medio de elementos finitos, para que hubiera una validación de las mediciones con una teoría que funja como respaldo.

## Modelado teórico del dispositivo

Durante la sección [1.1.3 Comportamiento de una membrana circular sujeta a inflamamiento](#), se mostraron diversas ecuaciones que muestran el comportamiento de una membrana sujeta a esfuerzos debidos a un cambio de presión. El *chip* de inflamamiento que se muestra en el presente trabajo consiste de una membrana, adherida a una cámara de inflamamiento circular, que es sometida a un aumento de presión en un lado de la cámara. Si bien, el objetivo de este trabajo no es presentar un dispositivo para realizar una prueba de abultamiento, las consideraciones teóricas y resultados que se obtienen para este tipo de pruebas, utilizando una membrana circular, se podrían utilizar para modelar teóricamente el dispositivo. Este análisis puede darse a partir de suposiciones que lleven a una solución analítica o por medio de un modelo de elementos finitos. El modelaje teórico del comportamiento del *chip* de inflamamiento del presente trabajo es un resultado deseable; no obstante, queda fuera del alcance de esta tesis. El propósito de esta, se encuentra enfocado hacia la fabricación de un dispositivo, que pueda realizar un estímulo mecánico a células cultivadas sobre el mismo.

## Versatilidad del diseño

Una de las ventajas del dispositivo presentado en este trabajo es que el proceso de fabricación admite que el diseño del *chip* se adapte de acuerdo a las necesidades de los experimentos, siempre y cuando estos experimentos sigan el principio general de funcionamiento del dispositivo, correspondiente a un cambio en la curvatura o la rigidez local producido por el inflamamiento de una membrana.

Entre estos cambios de diseño, se encuentran, el cambio del fluido utilizado para la transmisión de la presión (p. ej. utilizar agua destilada o medio de cultivo).

Además, se puede utilizar un distinto tipo de membrana sobre la cual se realizará el inflamiento, por ejemplo, para utilizar una membrana de Colágena tipo I para fomentar la comunicación celular en un cultivo o con una membrana de PDMS microestructurada con pilares para realizar pruebas de microscopía de tracción en las células.

En particular, Fernanda López García exploró dos de estas posibilidades: inflar el dispositivo con medio de cultivo y fabricar el dispositivo con una membrana de Colágena tipo I, como se muestra en la Fig. 39.

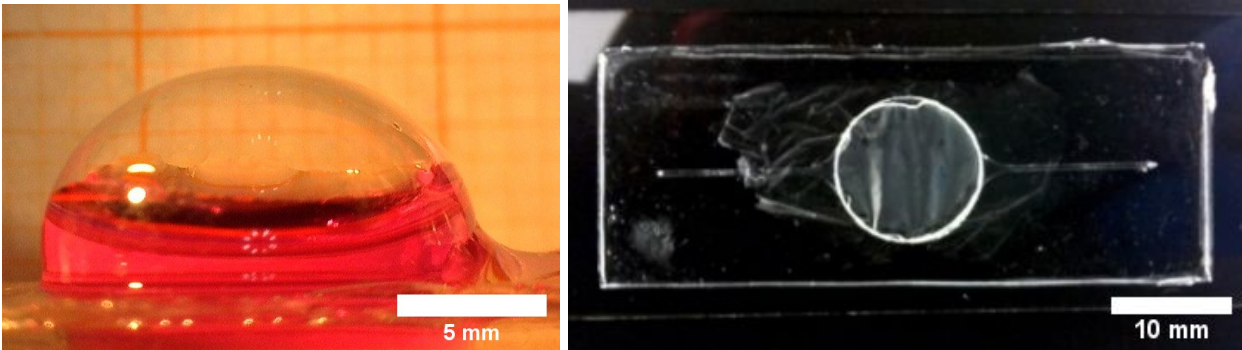


Figura 39: Cambios en el diseño del dispositivo, explorados por FLG. Izq: Dispositivo inflado con medio de cultivo. Der: Dispositivo fabricado con una membrana de Colágena tipo I [68].

Si se necesita modificar la geometría de la parte microfluídica del dispositivo, incluyendo las dimensiones de algún componente de la parte de PDMS, se puede maquinar un nuevo molde de acrílico, con las características deseadas. Otro cambio en el diseño que se pueden realizar con este dispositivo consisten en el control de la presión en dos cámaras comunicadas por una membrana, que puede ser útil, por ejemplo, para realizar el cultivo celular de dos tipos celulares en comunicación. Un ejemplo de diseño útil para esta propuesta es el de la Fig. 40.

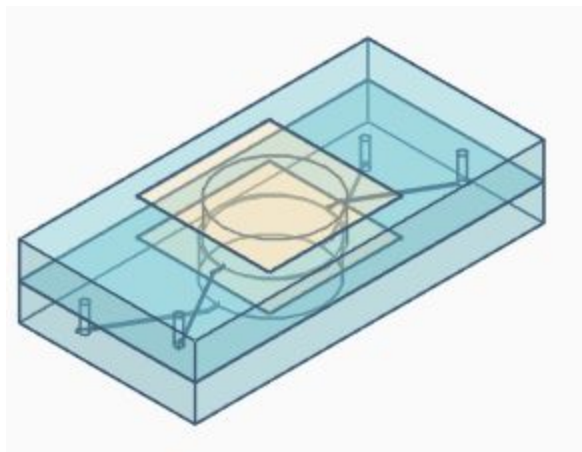


Figura 40: Propuesta de diseño para utilizar dos fluidos distintos para la transmisión de presión.

También se pueden tener varios pozos de inflamiento, de tal forma que se obtenga una matriz de sitios de inflamiento, en lugar de un sólo lugar donde ocurra el inflamiento.

Si se van a realizar rampas de subida y bajada de presión, una modificación deseable en este *chip*, consiste en la adición de una válvula donde se tenga monitorizada la presión de salida, para que efectivamente se tenga la presión deseada dentro del dispositivo, consistente con lo que marca una bomba ejerciendo una presión de entrada.

Es importante recalcar que todos estos cambios en el diseño del dispositivo deben de tener una motivación en especial. Debido a que el dispositivo presentado está enfocado hacia la generación de distintos estímulos mecánicos en cultivo celular, se debe tener comunicación constante con personas con experiencia en el área biológica, de tal forma que el cambio de diseño esté enfocado a la investigación de alguna pregunta biológica.

## Aplicación: Caracterización de crecimiento celular a través del cambio en el patrón de difracción de PDMS microestructurado

Una aplicación que surgió durante el desarrollo de este proyecto fue el proporcionar una forma controlable de observar un desplazamiento. Para su proyecto de Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Fernanda López García estaba investigando una forma de caracterizar el crecimiento celular, a partir de la observación de un patrón de difracción en una membrana de PDMS. En algún momento del desarrollo de su proyecto, FLG necesitaba una forma de obtener un desplazamiento controlado para observar el cambio en dicho patrón de difracción. El dispositivo de inflamiento mostrado en el presente trabajo resolvía justamente esta necesidad, al proporcionar pequeños cambios de desplazamiento a partir de cambios controlados en la presión. Por otro lado, el proyecto de FLG permitiría caracterizar el desplazamiento de la membrana a partir de la observación del patrón de difracción, a partir de las imágenes apicales, reduciendo así los errores de paralaje causados por la medición de las imágenes laterales. La explicación a detalle de estos resultados se encontrarán en la tesis de FLG [68].

## 6. Referencias

1. Ni M, Tong WH, Choudhury D, Rahim NAA, Iliescu C, Yu H. Cell culture on MEMS platforms: a review. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 18 de diciembre de 2009;10(12):5411–41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms10125411>
2. El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips. *Nature* [Internet]. el 27 de julio de 2006;442(7101):403–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature05063>
3. Feng X, Du W, Luo Q, Liu B-F. Microfluidic chip: next-generation platform for systems biology. *Anal Chim Acta* [Internet]. el 14 de septiembre de 2009;650(1):83–97. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.051>
4. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* [Internet]. el 25 de junio de 2010;328(5986):1662–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1188302>
5. Walker M, Godin M, Pelling AE. A vacuum-actuated microtissue stretcher for long-term exposure to oscillatory strain within a 3D matrix. *Biomed Microdevices* [Internet]. el 28 de mayo de 2018;20(2):43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10544-018-0286-4>
6. Yu S-M, Oh JM, Lee J, Lee-Kwon W, Jung W, Amblard F, et al. Substrate curvature affects the shape, orientation, and polarization of renal epithelial cells. *Acta Biomater* [Internet]. el 1 de septiembre de 2018;77:311–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.019>
7. Hsieh H-Y, Camci-Unal G, Huang T-W, Liao R, Chen T-J, Paul A, et al. Gradient static-strain stimulation in a microfluidic chip for 3D cellular alignment [Internet]. Vol. 14, *Lab Chip*. 2014. p. 482–93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/c3lc50884f>
8. Callister WD, Rethwisch DG. *Fundamentals of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach* [Internet]. John Wiley & Sons; 2012. 910 p. Disponible en: [https://books.google.com/books/about/Fundamentals\\_of\\_Materials\\_Science\\_and\\_En.html?hl=&id=-b2Tn74L6K0C](https://books.google.com/books/about/Fundamentals_of_Materials_Science_and_En.html?hl=&id=-b2Tn74L6K0C)
9. Michael Lai W, Krempl E, Rubin D. *Introduction to Continuum Mechanics* [Internet]. Elsevier; 2014. 570 p. Disponible en: <https://play.google.com/store/books/details?id=vmjiBQAAQBAJ>
10. Lewinsohn CA. *Mechanical Behavior of Materials by Norman E. Dowling* [Internet]. Vol. 15, *Materials and Manufacturing Processes*. 2000. p. 775–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10426910008913020>
11. D11 Committee. *Terminology Relating to Rubber* [Internet]. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2019 jul. Disponible en: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D1566-19>
12. Small MK, Nix WD. Analysis of the accuracy of the bulge test in determining the mechanical properties of thin films [Internet]. Vol. 7, *Journal of Materials Research*. 1992. p. 1553–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1557/jmr.1992.1553>
13. Levy S. Square plate with clamped edges under normal pressure producing large deflections [Internet]. NASA; 1942. Report No.: 740. Disponible en: <https://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19930091819>
14. Baek JD, Yoon Y-J, Lee W, Su P-C. A circular membrane for nano thin film micro solid oxide fuel cells with enhanced mechanical stability. *Energy Environ Sci* [Internet]. 2015;8(11):3374–80. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5EE02328A>

15. Discher DE, Janmey P, Wang Y-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* [Internet]. el 18 de noviembre de 2005;310(5751):1139–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1116995>
16. Cell Culture Plates - Tissue Culture [Internet]. [citado el 17 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://alkalisci.com/tissue-culture-products/cell-culture-plate.html>
17. ASTM International. ASTM E2712 - 15 Standard Test Methods for Bulge-Forming Superplastic Metallic Sheet [Internet]. PA; 2015. Disponible en: <https://www.astm.org/Standards/E2712.htm>
18. Beams JW. Mechanical properties of thin films of gold and silver. En: Neugebauer CA, Newkirk JB, Vermilyea DA, editores. *Structure and properties of thin films*. New York: John Wiley and Sons; 1959. p. 183.
19. Catlin A, Walker WP. Mechanical Properties of Thin Single-Crystal Gold Films. *J Appl Phys* [Internet]. diciembre de 1960;31(12):2135–9. Disponible en: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1735513>
20. Itosaki H. Ph. D. Thesis [Ph. D.]. Northwestern University; 1982.
21. Hill R. C. A theory of the plastic bulging of a metal diaphragm by lateral pressure. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* [Internet]. el 29 de enero de 1950;41(322):1133–42. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786445008561154>
22. Tsakalagos T. The bulge test: A comparison of the theory and experiment for isotropic and anisotropic films. *Thin Solid Films* [Internet]. enero de 1981;75(3):293–305. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0040609081904077>
23. Timoshenko S. *Theory of Plates and Shells* by S. Timoshenko and S. Woinowsky-Krieger [Internet]. 1959. 580 p. Disponible en: [https://books.google.com/books/about/Theory\\_of\\_Plates\\_and\\_Shells\\_by\\_S\\_Timoshe.html?hl=&id=mrslyAEA CAAJ](https://books.google.com/books/about/Theory_of_Plates_and_Shells_by_S_Timoshe.html?hl=&id=mrslyAEA CAAJ)
24. Marc Analysis Research Corp. MARC. Finite Element Code. 1990.
25. Jianbing S, Xiang L, Sufang X, Wenjia W. Mechanical Property Analysis of Circular Polymer Membrane under Uniform Pressure. *Int J Polym Sci* [Internet]. 2017;2017:1–9. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2017/4183686/>
26. Sang JB, Sun LF, Xing SF, Liu BH, Sun YL. Mechanical Properties of Polymer Rubber Materials Based on a New Constitutive Model [Internet]. Vol. 22, *Polymers and Polymer Composites*. 2014. p. 693–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/096739111402200807>
27. Gao YC. Large deformation field near a crack tip in rubber-like material [Internet]. Vol. 26, *Theoretical and Applied Fracture Mechanics*. 1997. p. 155–62. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-8442\(96\)00044-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-8442(96)00044-4)
28. Huang CK, Lou WM, Tsai CJ, Wu T-C, Lin H-Y. Mechanical properties of polymer thin film measured by the bulge test. *Thin Solid Films* [Internet]. junio de 2007;515(18):7222–6. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609007005007>
29. Zheng DW, Xu YH, Tsai YP, Tu KN, Patterson P, Zhao B, et al. Mechanical property measurement of thin polymeric-low dielectric-constant films using bulge testing method. *Appl Phys Lett* [Internet]. el 10 de abril de 2000;76(15):2008–10. Disponible en: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.126237>
30. Tonge TK, Atlan LS, Voo LM, Nguyen TD. Full-field bulge test for planar anisotropic tissues: part I--experimental methods applied to human skin tissue. *Acta Biomater* [Internet]. abril de 2013;9(4):5913–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.035>

31. Tonge TK, Voo LM, Nguyen TD. Full-field bulge test for planar anisotropic tissues: part II--a thin shell method for determining material parameters and comparison of two distributed fiber modeling approaches. *Acta Biomater* [Internet]. abril de 2013;9(4):5926–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.034>
32. Rodríguez-Prado A. Diseño y manufactura de equipo para pruebas de tracción biaxial [Internet] [Ingeniero Mecánico]. Sánchez Arévalo FM, editor. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016. Disponible en: [http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/MMA8CBFPBNB7IGLX3NCVECJTJKUDQ7SCCLRLGJ9ER8KARRHPVI-47179?func=full-set-set&set\\_number=033102&set\\_entry=000008&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/MMA8CBFPBNB7IGLX3NCVECJTJKUDQ7SCCLRLGJ9ER8KARRHPVI-47179?func=full-set-set&set_number=033102&set_entry=000008&format=999)
33. Jiménez-Sánchez ÓF. Instrumentación y control de probador mecánico para ensayos de tracción biaxial por inflamamiento [Ingeniero eléctrico-electrónico]. Sánchez Arévalo FM, editor. Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
34. Finot M, Suresh S. Small and large deformation of thick and thin-film multi-layers: Effects of layer geometry, plasticity and compositional gradients [Internet]. Vol. 44, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 1996. p. 683–721. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-5096\(96\)84548-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-5096(96)84548-0)
35. Jansen L, Lantz MA, Knoll AW, Schirmeisen A, Gotsmann B. Frictional dissipation in a polymer bilayer system. *Langmuir* [Internet]. el 18 de febrero de 2014;30(6):1557–65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/la404537u>
36. ECETOC Joint Assessment of Commodity Chemicals. JACC No. 55. Linear Polydimethylsiloxanes CAS No. 63148-62-9. Second. Belgium: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals; 2011.
37. Xia Y, Whitesides GM. SOFT LITHOGRAPHY. *Annu Rev Mater Sci* [Internet]. agosto de 1998;28(1):153–84. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.matsci.28.1.153>
38. Technical Data Sheet. SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer [Internet]. The Dow Chemical Company; 2017. Disponible en: <https://www.dow.com/content/dam/dcc/documents/en-us/productdatasheet/11/11-31/11-3184-sylgard-184-elastomer.pdf?iframe=true>
39. Johnston ID, McCluskey DK, Tan CKL, Tracey MC. Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering [Internet]. Vol. 24, *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2014. p. 035017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1088/0960-1317/24/3/035017>
40. Ali U, Khairil Juhanni Bt, Buang NA. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA) [Internet]. Vol. 55, *Polymer Reviews*. 2015. p. 678–705. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/15583724.2015.1031377>
41. Puttaraksa N, Unai S, Rhodes MW, Singkarat K, Whitlow HJ, Singkarat S. Fabrication of a negative PMMA master mold for soft-lithography by MeV ion beam lithography [Internet]. Vol. 272, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2012. p. 149–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2011.01.053>
42. Key Technologies [Internet]. 2019 [citado el 5 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.obducat.com/products/key-technologies/>
43. Vázquez-Victorio G, Peto-Gutiérrez C, Díaz-Bello B, Cano-Jorge M, Pérez-Calixto D, Jiménez-Escobar A, et al. Building a microfluidic cell culture platform with stiffness control using Loctite 3525 glue. *Lab Chip* [Internet]. el 9 de octubre de 2019;19(20):3512–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/c9lc00649d>
44. Díaz-Bello B, Monroy-Romero AX, Pérez-Calixto D, Zamarrón-Hernández D, Serna-Marquez N, Vázquez-Victorio G, et al. Method for the Direct Fabrication of Polyacrylamide Hydrogels with Controlled Stiffness in Polystyrene Multiwell Plates for Mechanobiology Assays [Internet]. Vol. 5, *ACS Biomaterials*

Science & Engineering. 2019. p. 4219–27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00988>

45. Technical Data Sheet. LOCTITE® AA 3525™ [Internet]. Henkel; 2014 sep. Disponible en: [https://tdsna.henkel.com/americas/na/adhesives/hnauttds.nsf/web/A4968813FEF6B1E9882571870000D6C6/\\$File/AA%203525-EN.pdf](https://tdsna.henkel.com/americas/na/adhesives/hnauttds.nsf/web/A4968813FEF6B1E9882571870000D6C6/$File/AA%203525-EN.pdf)
46. Kadow CE, Georges PC, Janmey PA, Beningo KA. Polyacrylamide Hydrogels for Cell Mechanics: Steps Toward Optimization and Alternative Uses. En: Cell Mechanics [Internet]. Elsevier; 2007. p. 29–46. (Methods in Cell Biology; vol. 83). Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X07830020>
47. Schnaar RL, Weigel PH, Kuhlenschmidt MS, Lee YC, Roseman S. Adhesion of chicken hepatocytes to polyacrylamide gels derivatized with N-acetylglucosamine. J Biol Chem [Internet]. el 10 de noviembre de 1978;253(21):7940–51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/701294>
48. Beningo KA, Lo C-M, Wang Y-L. Flexible polyacrylamide substrata for the analysis of mechanical interactions at cell-substratum adhesions. Methods Cell Biol [Internet]. 2002;69:325–39. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(02\)69021-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(02)69021-1)
49. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MDA, Georges PC, Sackey B, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol [Internet]. julio de 2011;301(1):G110–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2010>
50. Zajac AL, Discher DE. Cell differentiation through tissue elasticity-coupled, myosin-driven remodeling. Curr Opin Cell Biol [Internet]. diciembre de 2008;20(6):609–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2008.09.006>
51. Wang H, Abhilash AS, Chen CS, Wells RG, Shenoy VB. Long-range force transmission in fibrous matrices enabled by tension-driven alignment of fibers. Biophys J [Internet]. el 2 de diciembre de 2014;107(11):2592–603. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.09.044>
52. Caliarì SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. Nat Methods [Internet]. el 28 de abril de 2016;13(5):405–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3839>
53. Tse JR, Engler AJ. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. Curr Protoc Cell Biol [Internet]. junio de 2010;Chapter 10:Unit 10.16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb1016s47>
54. Moreau WM. Semiconductor Lithography: Principles, Practices, and Materials [Internet]. Springer Science & Business Media; 2012. 952 p. Disponible en: <https://play.google.com/store/books/details?id=8UrxBwAAQBAJ>
55. Rai-Choudhury P. Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication. Volume 1: Microlithography [Internet]. 1997. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1117/3.2265070>
56. Brambley D, Martin B, Prewett PD. Microlithography: An overview. Adv Mater Opt Electron [Internet]. marzo de 1994;4(2):55–74. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/amo.860040203>
57. Xia Y, Kim E, Zhao XM, Rogers JA, Prentiss M, Whitesides GM. Complex Optical Surfaces Formed by Replica Molding Against Elastomeric Masters. Science [Internet]. el 19 de julio de 1996;273(5273):347–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.273.5273.347>
58. McDonald JC, Whitesides GM. Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. Acc Chem Res [Internet]. julio de 2002;35(7):491–9. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar010110q>
59. McDonald JC, Cooper McDonald J, Duffy DC, Anderson JR, Chiu DT, Wu H, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) [Internet]. Vol. 21, Electrophoresis. 2000. p. 27–40. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1522-2683\(20000101\)21:1<27::aid-elps27>3.0.co;2-c](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1522-2683(20000101)21:1<27::aid-elps27>3.0.co;2-c)



60. Guckenberger DJ, de Groot TE, Wan AMD, Beebe DJ, Young EWK. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab Chip* [Internet]. el 7 de junio de 2015;15(11):2364–78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/c5lc00234f>
61. Wilson ME, Kota N, Kim Y, Wang Y, Stolz DB, LeDuc PR, et al. Fabrication of circular microfluidic channels by combining mechanical micromilling and soft lithography. *Lab Chip* [Internet]. el 21 de abril de 2011;11(8):1550–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/c0lc00561d>
62. Páez Larios F. Fabricación de chips microfluídicos por fresado CNC [Internet] [Licenciatura en Física]. Hautefeuille M, editor. Universidad Nacional Autónoma de México; 2019. Disponible en: [http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/KRNKHDHQPPIXPHXFKU7K82XSC4GXS549S1NMKJXTI3GGJR3D4V-19044?func=full-set-set&set\\_number=037046&set\\_entry=000001&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/KRNKHDHQPPIXPHXFKU7K82XSC4GXS549S1NMKJXTI3GGJR3D4V-19044?func=full-set-set&set_number=037046&set_entry=000001&format=999)
63. Makhlof ASH. Current and advanced coating technologies for industrial applications [Internet]. *Nanocoatings and Ultra-Thin Films*. 2011. p. 3–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857094902.1.3>
64. Franssila S, Tuomikoski S. MEMS Lithography [Internet]. *Handbook of Silicon Based MEMS Materials and Technologies*. 2010. p. 333–48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-8155-1594-4.00022-x>
65. Gates BD, Xu Q, Stewart M, Ryan D, Willson CG, Whitesides GM. New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques. *Chem Rev* [Internet]. abril de 2005;105(4):1171–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/cr030076o>
66. Chou SY, Krauss PR, Renstrom PJ. Imprint Lithography with 25-Nanometer Resolution. *Science* [Internet]. el 5 de abril de 1996;272(5258):85–7. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.272.5258.85>
67. Surface Areas and Recommended Medium Volumes for Corning® Cell Culture Vessels. Application Note [Internet]. Corning Incorporated Life Sciences; 2012 dic [citado el 17 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-209.pdf>
68. López García F. Caracterización de crecimiento celular a través del cambio en el patrón de difracción de PDMS microestructurado. Tesis de Maestría. (Por publicar) [Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales]. Hautefeuille M, editor. Universidad Nacional Autónoma de México; 2020.
69. Jiménez Díaz EA. Desarrollo de plataforma con microflujo para cultivo celular [Internet] [Licenciatura en Física]. Hautefeuille M, editor. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016. Disponible en: [http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/KRNKHDHQPPIXPHXFKU7K82XSC4GXS549S1NMKJXTI3GGJR3D4V-50102?func=full-set-set&set\\_number=038225&set\\_entry=000001&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/KRNKHDHQPPIXPHXFKU7K82XSC4GXS549S1NMKJXTI3GGJR3D4V-50102?func=full-set-set&set_number=038225&set_entry=000001&format=999)
70. Technical Data Sheet. LOCTITE® AA 3525™ [Internet]. Henkel; 2014 sep. Disponible en: [https://tdsna.henkel.com/americas/na/adhesives/hnauttds.nsf/web/A4968813FEF6B1E9882571870000D6C6/\\$File/AA%203525-EN.pdf](https://tdsna.henkel.com/americas/na/adhesives/hnauttds.nsf/web/A4968813FEF6B1E9882571870000D6C6/$File/AA%203525-EN.pdf)
71. Narloch JA, Brandstater ME. Influence of breathing technique on arterial blood pressure during heavy weight lifting. *Arch Phys Med Rehabil* [Internet]. mayo de 1995;76(5):457–62. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9993\(95\)80578-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9993(95)80578-8)
72. Fluid Pressure, Fluid Flow in the Body, and Motion in Fluids [Internet]. *Physics of the Human Body*. 2007. p. 405–41. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-29604-1\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-29604-1_7)