



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

***Plataforma BioMEMS para cultivo y
estimulación celular***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO ELÉCTRICO-ELECTRÓNICO

PRESENTAN:

CASTILLO RENDÓN YSAHET ODELIT

ORTIZ GUADARRAMA MANUEL

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LAURA ADRIANA OROPEZA RAMOS



MÉXICO, D.F. 2013

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. ESCALANTE RAMIREZ BORIS
Secretario: DRA. MOUMTADI FATIMA
Vocal: DRA. OROPEZA RAMOS LAURA ADRIANA
1 er. Suplente: DRA. GONZALEZ GOMEZ GERTRUDIS HORTENSIA
2 d o. Suplente: DRA. MENDOZA ANGELES KARINA

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Taller de Biofísica, Facultad de Ciencias, UNAM
Centro UNAMems de la Facultad de Ingeniería, UNAM.

TUTORA DE TESIS
DRA. LAURA ADRIANA OROPEZA RAMOS

Agradecimientos

Agradecemos las Químicas Farmacéuticas Biólogas Alicia Falcón Neri y Araceli Torres Pérez por el apoyo en la realización de los cultivos.

A la Dra. Hortensia González Gómez por su asesoría y por permitirnos utilizar las instalaciones del Taller de Biofísica de Sistemas Excitables Extendidos de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll por la orientación en el manejo de la microscopía de fluorescencia y en la implementación de los protocolos de cultivo.

Al grupo de compañeros que conforman el Taller de Biofísica de la Facultad de Ciencias, UNAM y a los compañeros de la Facultad de Ingeniería que nos ayudaron durante este proyecto y que hicieron una estadía amigable.

Agradecemos a la Dra. Laura A. Oropeza Ramos por el apoyo y asesorías a lo largo de la tesis y la orientación en la implementación de métodos de fabricación utilizados en este proyecto.

También agradecemos a nuestros padres, hermanos y familiares por apoyarnos en el transcurso de este proyecto, alentándonos para terminar los estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar esta investigación a través del proyecto 153353 de título “Plataforma micro-estructurada BioMEMS para estudio de cultivo y co-cultivo de cardiomiocitos”

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por el financiamiento de esta investigación con el proyecto PINV11-17 de título “Desarrollo de plataformas micro-estructuradas BioMEMS para estudio de cultivo cardiaco”. Agradecemos al ICyTDF por la beca otorgada a Manuel Ortiz Guadarrama.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM por el apoyo brindado a esta investigación con el proyecto IN114013 de título “Estudio de los efectos hidrodinámicos de sistemas microfluídicos de perfusión en la actividad de cardiomiocitos cultivados en micro-chips”. Agradecemos a la DGAPA-UNAM por la beca otorgada a Yasahet Odelit Castillo Rendón.

Y finalmente agradecemos a la Facultad de Ingeniería y a la UNAM por brindarnos la oportunidad de utilizar las instalaciones durante la realización del proyecto.

Índice

Resumen	12
Objetivo	12
Justificación	13
Capítulo 1: Antecedentes	15
1.1 Tecnología BioMEMS y sistemas Lab-On-Chip para cultivo celular	17
1.2 Fisiología de células excitables	19
1.3 Técnicas de micro fabricación con polímeros	23
1.3.1 Litografía suave	23
1.3.2 Métodos para fabricación de moldes micro estructurados	25
Capítulo 2: Fabricación y caracterización del micro-dispositivo	28
2.1 Consideraciones de diseño del dispositivo	28
2.2 Obtención de moldes y réplicas	34
2.3 Sellado del dispositivo	40
2.4 Caracterización dimensional de los dispositivos	42
Capítulo 3: Principios de Microscopía de Fluorescencia	45
3.1 Fluoróforos	46
3.1.1 Fluoróforos empleados	46
3.2 Fluorescencia	47
3.3 Funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia	48

3.4 Lámpara de Mercurio_____	50
Capítulo 4: Sistemas de perfusión y cultivo microfluídico _____	52
4.1 Implementación experimental _____	53
4.2 Caracterización del circuito microfluídico de perfusión _____	56
4.3 Caracterización del flujo de micro perfusión por medio de fluorescencia _____	58
Capítulo 5: Cultivo y registro de la actividad celular por microscopía de fluorescencia _____	62
5.1 Procedimiento de cultivo celular _____	62
5.2 Resultados del experimento con células de cardiomiocitos_	65
Capítulo 6: Análisis de resultados y conclusiones _____	69
Conclusiones _____	71
Trabajo a Futuro _____	73
Anexos	
Anexo1: Procedimiento de Limpieza _____	76
Anexo2: Tablas de calibración de las bombas de micro infusión _____	78
Anexo3: Tabla de la caracterización del flujo en el micro-dispositivo_	81
Anexo4 Solución de Hanks _____	83
Anexo5: Tabla donde se muestra el intervalo inter-pulso del estado Basal _____	84
Anexo6: Tabla donde se muestra el intervalo inter-pulso de la estimulación Adrenérgica. _____	84
Bibliografía _____	85

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representación de algunos elementos significativos que se encuentran en la escala del orden de los milímetros, micrómetros y en otras escalas de longitud[3]._____	15
Figura 1.2. Forma de onda del Potencial de acción cardíaco, imagen modificada [16]._____	21
Figura 1.3: Se muestra el acoplamiento excitación-contracción del musculo cardíaco. La entrada de Ca^{2+} desde el líquido intersticial durante la excitación provoca la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS). El Ca^{2+} se une a la troponina C dando lugar a que se produzca la contracción de los miofilamentos. La relajación se produce como consecuencia de la recaptación de Ca^{2+} por la bomba de Ca^{2+} y por la salida de Ca^{2+} intracelular, y el contrasportador Na^{+} - Ca^{2+} [17]._____	22
Figura 1.4. Proceso de Litografía suave por moldeo de réplicas.____	24
Figura 1.5 Se observa el proceso de fabricación de moldes en sus principales etapas[5]. _____	25
Figura 1.6 Se ilustra el proceso de litografía óptica. Se deposita la resina sobre el sustrato, posteriormente se coloca la máscara sobre la resina y se exponen a luz UV, la remoción de la resina expuesta da como resultado el patrón mostrado [7]. _____	26
Figura 1.7. Vista lateral de aumento de la tinta y la reducción del molde en 1/3 de su tamaño original._____	27
Figura 2.1. Diagrama del proceso a macro-escala. A. Jeringas, B. Mezclador de sustancias, C. Bomba peristáltica, D. Dispositivo para experimento, E. Bomba de succión, F. Soporte universal. _____	29

Figura 2.2 Diagrama de válvulas para intercambiar 2 sustancias con 1 sola bomba de micro-infusión. _____	30
Figura 2.3. a).Vista superior del diseño del micro-dispositivo indicando sus partes y algunas de sus dimensiones: seccion A es la interfaz de macro a micro (entrada de fluidos), sección B es la interfaz de micro a macro (salida de fluidos). b). Vista lateral del micro-dispositivo con el canal de ingreso de células abierto, una vez insertadas las células al pozo de cultivo se aplica Agar para sellar la entrada. _____	31
Figura 2.4. a). Diagrama del micro-dispositivo sin sellar. b) Diagrama del micro-dispositivo sellado. _____	32
Figura 2.5 Esquema que describe el flujo del proceso de fabricación, en color rojo corresponde a la fabricación del molde y en color azul el proceso que se sigue para la obtención de la réplica. _____	34
Figura 2.6. Ejemplo de una hoja de PST con la impresión del diseño. _____	35
Figura 2.7. Muestras de la hoja de PST antes y después de su reduccion por incremento en la temperatura. a) muestra la lámina de PST recién impreso, antes de limpiarlo. b) muestra el PST después de limpiarlo y reducirlo. _____	36
Figura 2.8. Fotografía del proceso de medición de la relación 10:1 en masa del polímero y el agente curante. _____	37
Figura 2.9 a) Desecador utilizado en el experimento b) Bomba de vacío utilizada para extraer el aire de la mezcla _____	37
Figura 2.10 a). Proceso de vaciado del PDMS sobre el molde. b). Proceso polimerización de la mezcla de PDMS. _____	38

Figura 2.11 a). Proceso de corte de la réplica. b). Proceso de extracción de la réplica y chips cubiertos con cinta scotch. _____	39
Figura 2.12 a). El molde con la base y la tapa antes de sellarlos. b). Muestras del chip sellado después de aplicarles corona. _____	40
Figura 2.13.a). Ejemplificación del efecto corona sobre PDMS. Se ionizan en proporciones distintas la cubierta y la base. b). Aplicación de corona sobre la tapa y la base del chip. _____	41
Figura 2.14. En está imagen se muestra el diseño de los canales y una vista ampliada del pozo de cultivo ubicando las diferentes zonas en donde se realizaron mediciones. _____	42
Figura 2.15. Imagen obtenida en el Polytec en donde se muestra el ancho del canal. Se muestra una imagen en 2D y posteriormente una imagen en 3D de la misma zona. _____	44
Figura 3.1. Representación gráfica de la excitación (línea punteada) y emisión (gráfica sombreada) de la fluoresceína[35]. _	46
Figura 3.2. Representación gráfica de la excitación (línea punteada) y emisión (gráfica sombreada) del Calcium Green. _____	47
Figura 3,3. Ejemplificación del efecto de excitación y emisión de una partícula luminiscente. _____	48
Figura 3.4. Se muestra la trayectoria que sigue la luz de excitación (verde) y la luz de emisión (rojo) de un microscopio invertido de fluorescencia [38]. _____	49
Figura 3.5. Diagrama del cubo de filtros en un microscopio invertido [39]. _____	50

Figura 3.6. En la gráfica sombreada en negro se muestra el espectro de luz emitida por la lámpara de mercurio y en azul se muestra el ancho de banda que deja pasar el filtro FITC (490-505[nm]) [35].	51
Figura 3.7. Fotografía del a) Microscopio de fluorescencia marca Nikon con todos los componentes. b) de la lámpara de mercurio.	51
Figura 4.1. Diagrama de General del sistema de perfusión empleado.	54
Figura 4.2. Diagrama del experimento. A) Bombas de micro-infusión. B) Jeringas de 1[ml]. C) Microscopio invertido de Fluorescencia. D) Cámara. E) Shutter. F) Lámpara de mercurio. G) Fuente de lámpara. H) Micro-dispositivo I) Recipiente de desagüe. J) Tubería de conexión. K) Computadora con software de adquisición.	55
Figura 4.3. Foto del montaje experimental. A) Bombas de micro-infusión. B) Jeringas de 1[ml]. C) Micro-dispositivo. D) Shutter. E) Microscopio invertido de fluorescencia. F) Cámara. G) Fuente de Lámpara de Mercurio.	55
Figura 4.4 .a) micro-dispositivo iluminado por la lámpara de mercurio. b) acercamiento al micro-dispositivo, en donde se observan los canales y la tubería.	56
FIGURA 4.5. En esta figura se observa cómo el FITC ingresa formando un pico de intensidad luminosidad de 40 unidades arbitrarias (u.a), que posteriormente desciende rápidamente.	59
Figura 4.6 a. Ejemplificación de los puntos de referencia de las mediciones b. Dentro del pozo de cultivo se señala en amarillo el área de medición.	60

Figura 4.7. Gráfica con flujo a 10[μ l/min]; tiempo en segundos contra intensidad luminosa (sin ruido de fondo) en unidades arbitrarias. _____	61
Figura 5.1. Diagrama que muestra el intercambio de jeringas y el purgado de jeringas (dejando una gota al final del tubo de perfusión). _____	63
FIGURA 5.2 a. En esta imagen podemos visualizar una monocapa dentro del recuadro b. Imagen de una sección del pozo de cultivo. _____	64
Figura 5.3. En esta imagen se muestra la actividad mediante fluorescencia (en blanco) una monocapa de cardiomiocitos. _____	64
Figura 5.4. Imagen de una mono capa en la cual se señala con una flecha el área seleccionada para graficar. _____	66
Figura 5.5. Se muestra la gráfica del estado basal y el Intervalo interpulso de la mono capa de cardiomiocitos. _____	67
Figura 5.6. En la gráfica se muestra la reacción de la mono capa al Isoproterenol (estimulación adrenérgica). _____	68

RESUMEN

En este trabajo se presenta el desarrollo de una micro-plataforma polimérica con un sistema de perfusión microfluídico para cultivo y estimulación de células excitables.

El micro-dispositivo se fabrica por medio de una técnica de litografía suave basada en un sistema de molde réplica. En este trabajo el molde se construye utilizando láminas de poliestireno termoplástico sobre las cuales se transfiere el diseño por medio de impresión laser, y cuyas réplicas se obtienen de polidimetilsiloxano (PDMS), el cual es un polímero bio-compatible y ópticamente transparente. La caracterización dimensional de los canales en la micro-plataforma se realiza con un perfilómetro óptico basado en interferometría de luz blanca.

El sistema de perfusión se compone de un circuito microfluídico, una tubería de diámetro micrométrico y un sistema externo de bombas de jeringa. Tanto el flujo de perfusión como el registro de la actividad celular (en estado basal y en excitación) se caracteriza empleando microscopía de fluorescencia.

OBJETIVO

Realizar una plataforma micrométrica, bio-compatible y de bajo costo para cultivo de células excitables, con sistema de perfusión microfluídica que permita obtener ambientes in vitro con mayor control en el cultivo y estimulación de los agregados celulares. Todo esto empleando un método de fabricación de fácil acceso y bajo costo.

JUSTIFICACIÓN

¿Por qué construir una micro-plataforma para cultivo celular?

El cultivo celular se inició hace más de cien años. En un inicio, en 1899, Frederick Kipping realizó estudios sobre silicones, y en 1907 R. Harrison realizó el primer cultivo celular con embriones de rana. Estos acontecimientos marcan las bases o puntos de partida, pero no fue hasta 1946 que se estandariza el cultivo celular. En 1955, a la vez que comienza la industria de la microelectrónica, se reporta el uso de los platos multi-pozos de cultivos [1].

En los últimos 50 años, los biólogos han empleado en gran medida plataformas de cultivo celular como son las cajas Petri o frascos de cultivo, hechas de poliestireno (PS) o vidrio, en donde las células se agregan predominantemente al azar y en donde se tiene poco control en la forma de los agregados y en la continuidad del proceso de perfusión.

Es por esto que se comenzaron a emplear herramientas de micro fabricación para buscar nuevas capacidades experimentales. En 1974 los laboratorios Bell adaptan la fotolitografía a polímeros, a lo que se le conoce como litografía suave, posteriormente en 1990 se comienza el uso de los dispositivos “Lab-On-A-Chip” y en 1998 Thompson realiza estudios con células madre. Finalmente en 1998 se comienza la utilización de PDMS (polidimetilsiloxano) para realizar dispositivos de microfluídica utilizándose para estudios celulares [1] . El PDMS ofrece mayores ventajas de micro-fabricación que el PS, que aunque es ampliamente aceptado y utilizado entre la comunidad biomédica, presenta mayores retos en micro-maquinado, lo cual lo vuelve menos accesible a ser adaptado en plataformas basadas en microtecnología.

Al utilizar un micro-dispositivo diseñado ad-hoc se obtienen varias ventajas con respecto a las técnicas de cultivo a macro escala, las cuales se enlistan a continuación:

Control geométrico: La fabricación de micro-dispositivos mediante técnicas de fotolitografía y litografía suave, permite diseñar estructuras de dimensiones variadas ($1\mu > 1\text{ cm}$).

Geometrías restringidas: Con el control geométrico, las células se pueden agrupar en formas y medidas predeterminadas, cosa que antes resultaba muy aleatoria en los cultivos tradicionales dentro de cajas Petri.

Pequeños volúmenes: El cultivo celular tradicional requiere el cambio de sustancias y medio (ver sección 1.1), lo que se realiza manualmente mediante micro pipetas, jeringas de infusión y sistemas de extracción de alto costo y tamaño, así como también requiere dedicar más tiempo en la extracción de muestras para realizar el cultivo, resultando esto en más horas laborales. En una plataforma micrométrica de cultivo celular se necesitan menores volúmenes de las sustancias y menores tamaños de muestras, lo cual reduce los gastos de insumos, así como los costos en la implementación de los experimentos.

Alto rendimiento: La realización de diversos procesos y/o análisis de una muestra, utilizando el mismo dispositivo, es lo que se denomina Lab-on-a-chip (LOC); diversos módulos funcionando conjuntamente para obtener mayores resultados en un menor espacio.

Co-cultivo en micro-dispositivos: Eventualmente una misma plataforma puede ser utilizada para diversos tipos de cultivos, incluso permitiendo la interacción en co-cultivos. El resultado es una estructura del orden de micrómetros, que proporciona un mejor control sobre las condiciones del cultivo, con lo que se puede tener una idea mucho más clara acerca de algunos factores que afectan a las células y que con los métodos macroscópicos tradicionales resulta más complicado y/o costoso controlar [2].

CAPÍTULO 1

Antecedentes

Para ubicarnos en el mundo de la miniaturización, en la figura 1.1 se muestran objetos conocidos a diferentes escalas. Las escalas con las que estamos más relacionados son el kilómetro (km) y metro (m); la siguiente escala es el milímetro (mm) aquí ubicamos algunos objetos significativos como: un pixel de LCD, granos de sal, granos de arena. En el orden de los micrómetros (μm) encontramos los objetos más pequeños visibles a través de microscopios ópticos como las compuertas de un transistor y células animales. Un punto importante de mencionar son los límites observables en microscopios ópticos; este límite está definido por la longitud de onda del espectro de la luz visible, que se encuentra en un rango de los 400[nm] hasta los 750[nm].

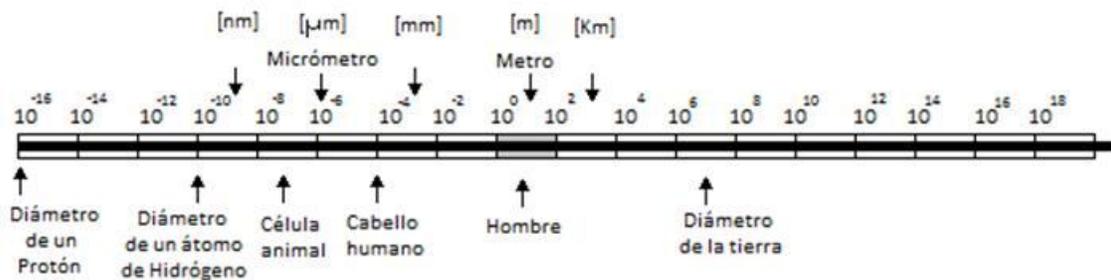


Figura 1.1. Representación de algunos elementos significativos que se encuentran en la escala del orden de los milímetros, micrómetros y en otras escalas de longitud [3]

Los dispositivos MEMS (*Microelectromechanical systems*, siglas en inglés) son aquellos dispositivos que combinan componentes eléctricos y mecánicos, tienen una longitud característica menor de 1 [mm] pero mayor a 1 micrómetro y son fabricados mediante procesos tecnológicos similares a los empleados en los circuitos integrados [4]. Tienen muchas aplicaciones en la industria automotriz, investigación, consumibles para el hogar, en la industria armamentista, en medicina, etc., siendo los materiales más utilizados el oro, níquel, plata, platino, aluminio, tungsteno, titanio, silicio y cromo, para su fabricación.

Sin embargo, la microtecnología ha derivado al desarrollo de otro tipo de dispositivos con base en polímeros, los cuales no necesariamente contienen elementos electrónicos o mecánicos. Los polímeros son utilizados por su versatilidad de fabricación, su maleabilidad y su bajo costo, así como también por la bio-compatibilidad y transparencia óptica que presentan algunos de ellos [5].

Conforme la escala o tamaño de un sistema va cambiando en varios órdenes de magnitud, el sistema tiende a comportarse diferente. El escalamiento de leyes físicas, expresa los cambios o variaciones de una cantidad física respecto de la longitud característica de un sistema u objeto. Como ejemplo podemos analizar las fuerzas volumétricas (inercia, gravedad) y las fuerzas de superficie (tensión superficial, viscosidad). La ley de escala básica para la relación de estas dos clases de fuerzas generalmente se puede expresar por:

$$\frac{\text{Fuerzas Superficiales}}{\text{Fuerzas volumetricas}} \propto \frac{l^2}{l^3} = l^{-1} \xrightarrow{l \rightarrow 0} \infty \dots\dots\dots (1)$$

En la ecuación (1) se puede observar cómo las fuerzas volumétricas que son predominantes en nuestra vida diaria macro, para un sistema micrométrico son despreciables. En consecuencia, las fuerzas superficiales cobran gran importancia[6][7]. Así, algunas características como es la viscosidad del medio, la tensión superficial y propiedades electrostáticas son dominantes a escalas micro, por el contrario manifiestan una fuerza de gravedad e inercial baja.

Es así que el dispositivo que hemos propuesto en este trabajo, considera el uso de la Microfluídica, que es el estudio de los fluidos y suspensiones en sistemas de tamaños sub-milimétricos [6]. En dispositivos con dimensiones de canales micrométricas y las características antes mencionadas, los fluidos presentan un comportamiento laminar. El flujo laminar es un flujo ordenado, suave y estratificado; éste se presenta en líquidos con velocidades bajas o con una alta viscosidad.

El número de Reynolds es un número adimensional que nos permite determinar si el flujo es turbulento o laminar, está definido de la siguiente forma:

$$Re = \frac{\text{Fuerzas inerciales}}{\text{Fuerzas Viscosas}} = \frac{\rho V_{prom} D}{\mu} \dots\dots\dots (2)$$

donde:

V_{prom} = Velocidad de flujo Promedio ; ρ = Densidad del fluido ;

D = Diámetro del canal o conducto ;

μ = viscosidad del fluido.

Si al utilizar la ecuación (2) obtenemos valores menores a 2300 el flujo se considera laminar; cuando los valores obtenidos se encuentran entre 2300 y 4000 se considera un flujo de transición y cuando el valor de Reynolds obtenido es mayor a 4000 el flujo se considera turbulento [8]. En microfluídica se utilizan flujos muy bajos y el diámetro de los canales es del orden de los micrómetros por lo que se obtienen números de Reynolds menores o igual a 1, obteniendo flujo laminar en sus canales. Una característica del flujo laminar a esta escala, es que los fluidos no presentan un mezclado excepto por difusión.

1.1 Tecnología BioMEMS y sistemas Lab-On-A-Chip para cultivo celular

Para la realización de pruebas bioquímicas en un laboratorio clínico o de investigación, se utilizan dispositivos que realizan diferentes procedimientos (pruebas de sangre, PH, conteo de células, cultivo celular etc.) [9]. Hoy en día, estos dispositivos se están fabricando a micro escala y pueden integrar múltiples herramientas (bombas, filtros, divisores de flujo, válvulas, electrodos, etc.) para realizar diversos procedimientos. Tomando en cuenta que en estos dispositivos se utilizan materiales bio-compatibles para que no exista un rechazo por parte de un organismo biológico, podemos definir un BioMEMS como: “dispositivos o sistemas contruidos usando técnicas inspiradas de la fabricación a micro y nano escala,

utilizados para el procesamiento, suministro, manipulación, análisis y/o construcción de entidades biológicas y químicas”[10].

Cuando se concentran dos o más procesos en un solo micro-dispositivo, dependiendo de la complejidad del procedimiento, a estos dispositivos se les nombra “Lab-On-A-Chip” (LOC). Por las características dimensionales de los dispositivos LOC se consideran un subconjunto de los MEMS. Una ventaja de utilizar LOC es la baja cantidad del volumen de muestras requeridas por experimento, es decir, en vez de emplear entre 1[ml] a 1[l], fácilmente se puede utilizar 1[μ l] o 1[nl] en LOC. Al utilizar volúmenes pequeños se puede hacer un análisis rápido y una detección eficiente. Al ser canales micrométricos, los dispositivos se pueden fabricar de manera compacta, portable y de bajo costo de producción [6].

Las aplicaciones que se pueden encontrar de los BioMEMS o dispositivos LOC, son la detección de sustancias en la sangre, detección de ADN, virus, proteínas, microorganismos y moléculas muy pequeñas, es decir se utilizan en gran medida como bio-sensores: sin embargo, también podemos utilizarlos para estudiar moléculas biológicas o células (tanto de forma individual como en conjunto). Estos dispositivos detectan elementos celulares o bioquímicos de manera eléctrica u óptica, según sea el caso y la aplicación [10].

En este sentido, los sistemas micro fabricados proveen una excelente plataforma para cultivo celular y al mismo tiempo representan una poderosa herramienta para la investigación de respuesta celular a varios estímulos. Anteriormente se ha mencionado algunas ventajas que tienen estos sistemas sobre los métodos tradicionales, como el costo-beneficio, el control experimental, bajos volúmenes, alta resolución y sensibilidad.

Uno de los estudios más interesantes que se pueden realizar en los BioMEMS y que se ha incrementado, es el estudio de las células (mediante cultivos celulares, o de forma individual). La realización del cultivo celular tanto en macro escala (cajas Petri) como en micro escala en plataformas BioMEMS, necesita considerar

la naturaleza dinámica de las condiciones de cultivo. Esto incluye el efecto de difusión y la entrega de moléculas solubles, eliminación de desechos, agotamiento de nutrientes y fuerzas mecánicas [11].

En su forma natural la células tienen condiciones naturales tales como el aporte sanguíneo, de nutrientes y hormonas, temperatura controlada a 37 °C, estimulación eléctrica y química, entre otros aspectos que el cuerpo controla eficientemente y de manera simultánea. Los dispositivos LOC tienen la característica de integrar muchas funciones en un solo dispositivo, por lo que es posible controlar algunos de estos parámetros [12]. En estos dispositivos se han logrado hacer cultivos de células de mamíferos en varias etapas, tanto en 2D como en 3D, esto de manera más exacta y controlada, cosa que no se había logrado de la misma forma en un cultivo convencional [13].

1.2 Fisiología de células excitables

En este trabajo se cultivaron células excitables en el micro dispositivo. Las células excitables son aquellas en las cuales un cambio en el potencial de membrana genera un potencial de acción. El potencial de acción es el mecanismo básico mediante el cual se logra la transmisión de la información entre un sistema nervioso y todo tipo de músculo. Existen dos tipos de células excitables; las neuronas que son células nerviosas y las células musculares, que se dividen en estriadas, cardíacas, esqueléticas y lisas [14].

Las fases generales de un potencial de acción son:

Fase de reposo: Es el potencial de reposo, durante esta fase la membrana está polarizada interiormente a -90[mV], debido a una gran permeabilidad a los iones potasio que salen del citoplasma.

Fase de despolarización: La membrana se vuelve permeable a iones de sodio, esto provoca una elevación en el potencial rápidamente en dirección positiva, provocando una despolarización del interior de la membrana.

Fase de Repolarización: En esta fase los canales de sodio se cierran e inactivan y se abren canales de potasio, restableciendo el potencial normal de la membrana.

Nosotros nos centraremos en las células excitables del músculo cardíaco, específicamente los cardiomiocitos ventriculares, encargadas del trabajo contráctil y que pueden transmitir un potencial de acción o corriente eléctrica. En el caso del músculo cardíaco se le llama potencial de acción cardíaco (PA), el cual está compuesto por diversas fases y se conduce a lo largo de todo el miocardio, como se muestra en la figura 1.2 se pueden observar las siguientes fases:

Fase 0: El potencial de acción se inicia con la despolarización rápida de la membrana celular, apertura de canales de sodio Na^+ , elevando la membrana a $+20[\text{mV}]$.

Fase 1: Repolarización rápida, aumentó de la permeabilidad a potasio K^+ , disminuyendo el potencial cercano a $0[\text{mV}]$.

Fase 2: Es la fase de la meseta característica del músculo cardíaco, canales lentos de calcio-sodio $\text{Ca}^{2+} - \text{Na}^+$. Los canales de Ca^{2+} regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular, se activan por cambios en el voltaje y son esenciales en la generación del ritmo cardíaco normal. En esta fase del PA la corriente de calcio está dada por los canales de Ca^{2+} tipo-L, la fase de meseta del PA es el vínculo entre los eventos eléctricos del PA y los eventos contráctiles, llamados contracción [15].

Fase 3: Fase de Repolarización rápida, la corriente de calcio es progresivamente inactivada, predominando la corriente de potasio, como resultado la membrana se repolariza a su potencial de reposo.

Fase 4: El potencial de membrana alcanza el valor de reposo, manteniendo la corriente saliente de potasio.

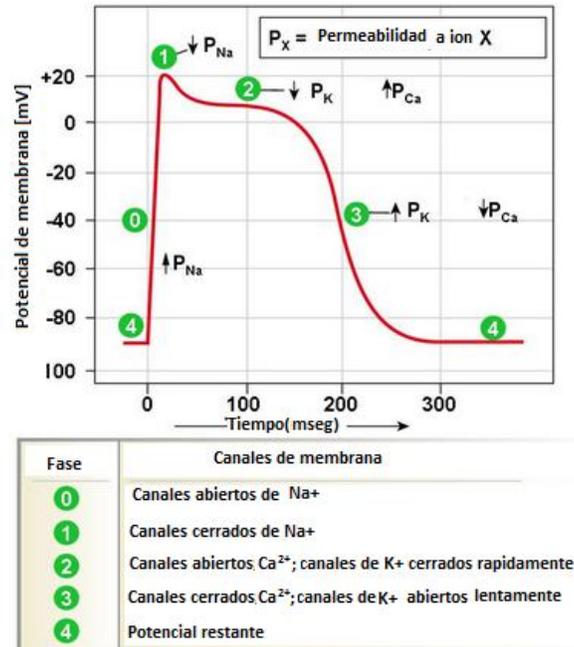


Figura 1.2. Forma de onda del Potencial de acción cardíaco, imagen modificada [16].

Contracción del músculo cardíaco

La regulación de la contracción muscular está basada en la presencia del ion Ca^{2+} , la despolarización de la membrana de la célula miocárdica, causada por la propagación del potencial de acción, es la que provoca que estos canales de Ca^{2+} se abran. El Ca^{2+} entra a la célula moviéndose a favor de su gradiente de concentración por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Este aumento de concentración de Ca^{2+} es el que induce una nueva liberación de Ca^{2+} (liberación de calcio inducido por calcio), el Ca^{2+} se une a la troponina-C dando lugar a que se produzca la contracción de los miofilamentos [14] [17].

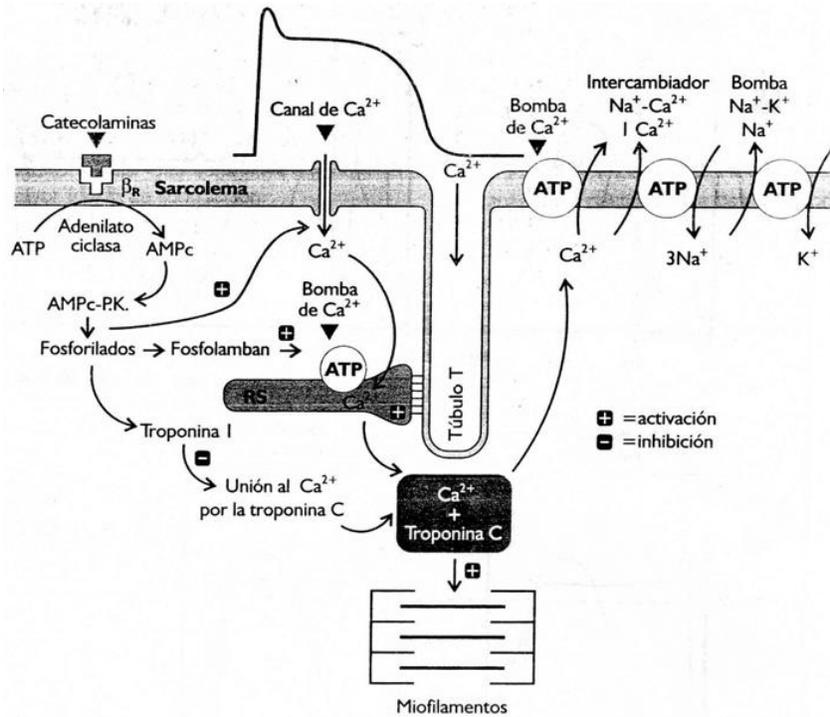


Figura 1.3: Se muestra el acoplamiento excitación-contracción del músculo cardíaco. La entrada de Ca^{2+} desde el líquido intersticial durante la excitación provoca la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS). El Ca^{2+} se une a la troponina C dando lugar a que se produzca la contracción de los miofilamentos. La relajación se produce como consecuencia de la recaptación de Ca^{2+} por la bomba de Ca^{2+} y por la salida de Ca^{2+} intracelular, y el contrasportador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ [17].

Algunas de estas acciones se pueden modular por estimulación con adrenalina o nor-adrenalina a los receptores celulares específicos. El Isoproterenol es un agonista adrenérgico que actúa en los receptores beta adrenérgicos (β_1 y β_2), un sistema de segundos mensajeros (AMPc) se activa y se fosforilan proteínas intracelulares específicas. La fosforilación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje aumenta de forma considerable el tiempo durante el que los canales de Ca^{2+} están abiertos, potenciando por tanto la contracción (ver figura 1.3) [17].

En el estudio de células excitables utilizando técnicas de microscopía, cuando se emplean células embrionarias se observa actividad espontánea sin presencia de estímulos externos, a lo que se le conoce como estado basal. Posteriormente con Isoproterenol se estimula y se observa su efecto empleando un fluorocromo sensible a Ca^{2+} .

1.3 Técnicas de micro fabricación con polímeros

En este subcapítulo presentamos la descripción de algunos métodos de fabricación involucrados para la elaboración de un micro-dispositivo BioMEMS de polímero.

1.3.1 Litografía suave

Uno de los avances más significativos para el desarrollo de la microfluídica fue el desarrollo de la litografía suave y el uso del Polidimetilsiloxano (PDMS siglas en inglés) como un material utilizado para crear prototipos rápidos a micro escala.

La litografía suave se refiere a un conjunto de técnicas basadas en la impresión, estampado y moldeo de réplicas para crear micro y nano estructuras utilizando polímeros, también permite la réplica de estructuras tridimensionales en un solo paso. En la figura 1.4 podemos observar el proceso de litografía suave más común; el moldeo de réplicas que consiste principalmente en lo siguiente:

Sobre un molde, que puede o no ser creado mediante técnicas de fotolitografía, se vierte un polímero líquido, el cual posteriormente pasa por un proceso de curado o polimerización que se puede acelerar empleando calor. Posteriormente, se extrae el polímero rígido que contiene una réplica casi exacta de la forma y tamaño del molde. El polímero más utilizado es el PDMS, debido a que posee propiedades como elasticidad, bio-compatibilidad, transparencia óptica, aislamiento térmico y permeabilidad, pero sobre todo porque es un elemento inerte y no tóxico para los organismos vivos [18]. Algunas de las características principales del PDMS las podemos observar en la tabla 1. Estas características son importantes para nuestra aplicación debido a que este polímero no tóxico se puede implementar en seres vivos permitiendo el crecimiento de células de mamíferos. Es transparente a la luz visible por lo que las muestras pueden ser analizadas bajo microscopio, permeable a gases y solventes orgánicos no polares. La temperatura en la cual se degrada el PDMS es 400°C.

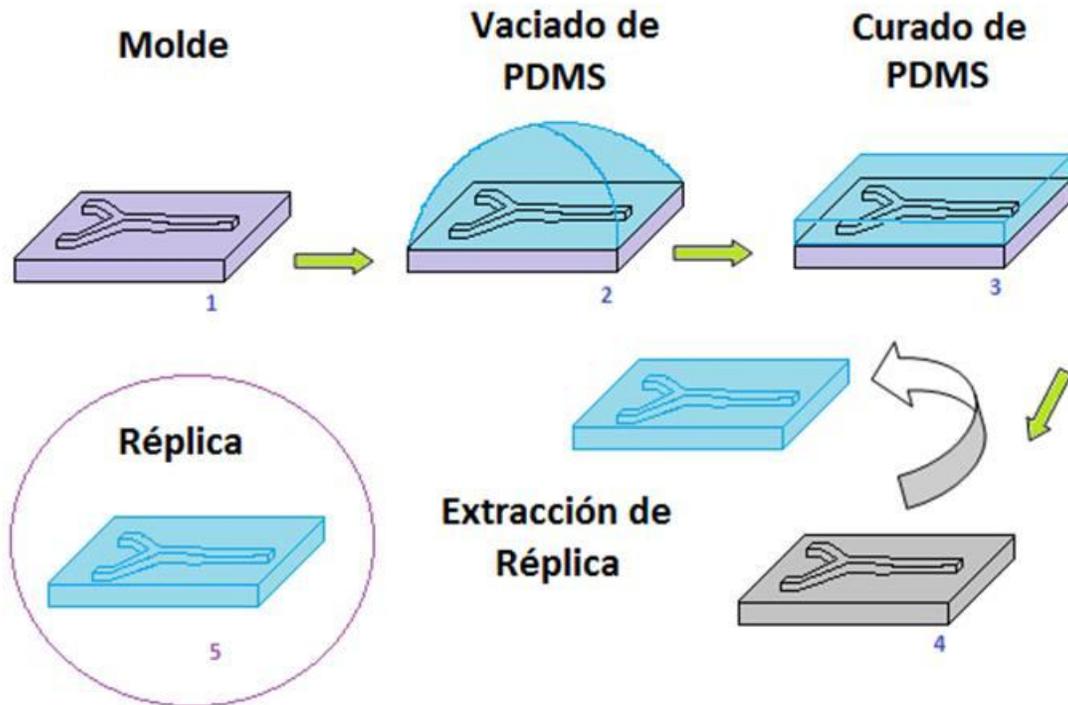


Figura 1.4. Proceso de Litografía suave por moldeo de réplicas.

PDMS	Propiedades Térmicas		Propiedades Ópticas	
	Fundición/ Degradación T [°C]	Coefficiente de expansión térmica (CTE) [ppm/°C]	UV- Transparencia	Transparencia a la luz visible
	400	310	>230 [nm]	bueno
	Permeabilidad		Toxicidad	
	Baja permeabilidad a líquidos; permeable a gases y a solventes orgánicos no polares		No tóxico; Se puede implantar en seres vivos; permite el crecimiento de células mamíferas.	

Tabla 1. Principales características del PDMS [19].

1.3.2 Métodos para fabricación de moldes micro estructurados

Un molde micro estructurado puede ser fabricado a partir de diferentes materiales, tales como latón, Aluminio, Silicio, resina fotosensible, etc. Dependiendo del material y las resoluciones necesarias se pueden emplear diversas técnicas,

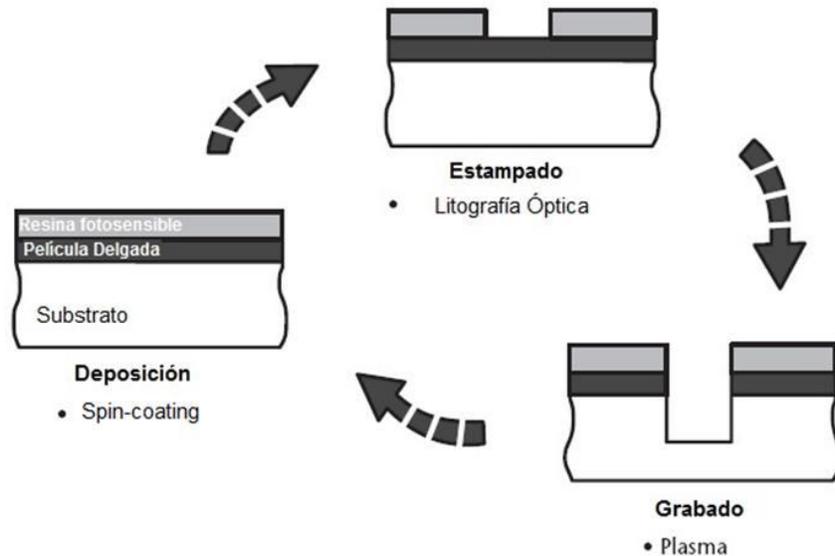


Figura 1.5: Se observa el proceso de fabricación de moldes de Silicio en sus principales etapas [5].

Para el caso de que se emplea el Silicio como sustrato (oblas), se requieren diferentes etapas como las que se enlistan a continuación:

Deposición de películas delgadas. Muchos procesos micro electrónicos involucran la deposición consecutiva de películas delgadas de algún material.

Transferencia del Patrón. Los dispositivos MEMS son formados por patrones definidos, la transferencia de patrones involucra dos partes: un proceso óptico (litografía óptica) y un proceso químico donde la resina fotosensible es removida.

Grabado. En esta etapa se remueve selectivamente material de las áreas delimitadas por la resina fotosensible. Un método empleado es la aplicación de plasma figura 1.5, o puede ser mediante abrasión química.

La litografía óptica se refiere a la transferencia de un patrón a un material fotosensible por medio de la exposición selectiva de una fuente de radiación o luz, involucra tres pasos secuenciales: la aplicación de una capa de resina sensible a la radiación ultravioleta sobre el sustrato mediante bases giratorias (método Spin coating) en donde se hace girar a altas velocidades el sustrato con la resina líquida depositada en la superficie, con el fin de esparcir uniformemente el material por fuerza centrífuga. Posteriormente, el diseño (patrón a transferir) plasmado sobre una base de cromo con partes transparentes y partes oscuras, la cual servirá como máscara para el molde, se transfiere al sustrato por medio de la exposición de esta máscara a luz ultravioleta (UV). La máscara permite el paso selectivo de la luz UV (ver figura 1.6). La resina expuesta a la luz UV cambia sus propiedades, lo cual permite que al realizarse la inmersión del sustrato con la resina fotosensible en un revelador acuoso, se disuelve la resina expuesta (resina positiva) o no expuesta (resina negativa) a la luz UV [5] [7].

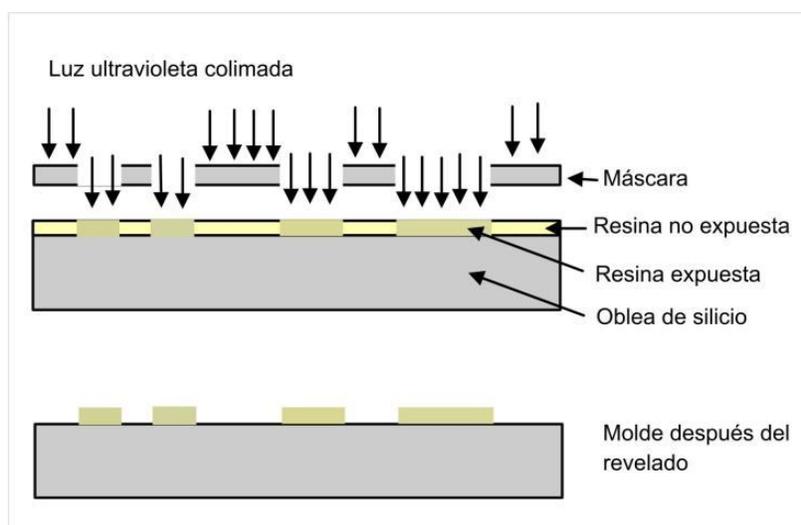


Figura 1.6: Se ilustra el proceso de litografía óptica. Se deposita resina fotosensible sobre el sustrato, posteriormente se coloca la máscara sobre la resina y se exponen a luz UV, la remoción de la resina expuesta da como resultado el patrón mostrado [7].

Para esta técnica es necesario el uso de cuartos limpios y equipo sofisticado de alta precisión. El resultado en cuanto a las réplicas es preciso; sin embargo, es un procedimiento costoso.

Recientemente se cuentan con métodos alternativos no basados en fotolitografía para la generación de un molde. En el 2001, Tan et. Al. [20] probaron una nueva técnica para generar moldes a través de fotocopiar diseños sobre acetatos convencionales. Con la deposición de carbón sobre este acetato se lograban generar canales de 8-14 μm ; sin embargo, tenía la desventaja de que no era posible generar canales con mayor profundidad. Este tipo de canales superficiales pueden ser adecuados para muchas aplicaciones en microfluídica pero no para su uso con células de mamíferos con un diámetro mayor a 10 μm .

En el 2007, Michelle Khine et. al.[21] emplearon hojas de poliestireno termoplástico (PST) que de manera comercial se conocen como *Shrinky-Dinks*, utilizado como juguete para niños en EUA, el cual puede reducir su tamaño original aproximadamente un 63% en ancho y largo y se incrementa la altura arriba del 500% después de ser expuesto de 3-5 minutos arriba de 160°C, como se ilustra en la figura 1.7.



Figura 1.7. Vista lateral de aumento de la tinta y la reducción del molde en 1/3 de su tamaño original.

CAPÍTULO 2

Fabricación y caracterización del micro-dispositivo

El diseño que describimos se realizó considerando la disponibilidad de materiales y equipos en el laboratorio del Centro UNAMems de la Facultad de Ingeniería y del Taller de Biofísica de Sistemas Excitables Extendidos de la Facultad de Ciencias UNAM. Presentamos una técnica alternativa de fabricación accesible y de bajo costo.

Para la fabricación de moldes empleamos hojas de poliestireno termoplástico (PST, por sus siglas en inglés) comercialmente llamado *Shrinky Dinks*, las cuales se mencionaron al final de la sección anterior. Las micro estructuras se producen utilizando una impresora láser convencional, la profundidad de los canales depende del espesor de la capa de tóner que la impresora sea capaz de depositar. Una forma de obtener mayor profundidad utilizando esta misma técnica es imprimir varias capas (una sobre otra) [21][22].

2.1 Consideraciones del diseño del dispositivo

Debido a que el dispositivo microfluídico que se diseñó sería empleado en cultivo de células, fue necesario investigar los protocolos de cultivo que se emplean en el Taller de Biofísica de Sistemas Excitables Extendidos de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Existen dos formas para realizar un cultivo celular tradicional, una consiste en mantener las células en un medio suplementado sin algún adherente celular, posteriormente se ingresan a una centrifugadora por media hora al finalizar el cultivo es ingresado a una incubadora, donde las células adoptan una forma esférica o elipsoide (por la fuerza centrípeta que junta las células) al paso de 24 a 48 horas. El segundo método consiste en inducir una adherencia rápida, y tal vez orientada, de células a un sustrato como puede ser por medio del depósito

de Poli-L-Lisyne, Laminina o Colágena, después el cultivo sigue los mismo pasos se centrifugan las células por una hora e ingresan en una incubadora por un lapso de 24 a 48 horas, en donde adquieren una forma esférica o elipsoide adherida a la superficie del recipiente utilizado. Las células se siembran inicialmente con poca cantidad de medio de cultivo para favorecer su ordenamiento y adherencia, posteriormente se les provee el medio necesario para cubrir las cajas de cultivo y alimentar la células [23].

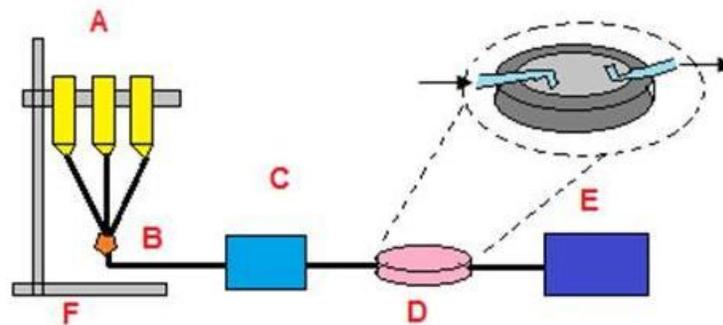


Figura 2.1. Diagrama del proceso de registro y perfusión de un cultivo a macro-escala. A. Jeringas, B. Mezclador de sustancias, C. Bomba peristáltica, D. Dispositivo para experimento, E. Bomba de succión, F. Soporte universal.

Después de realizado el cultivo se colocan los agregados formados sobre una cámara en la cual se realizará el experimento (letra D de la figura 2.1). Para realizar el experimento se utiliza el siguiente sistema de perfusión: jeringas para contener las diferentes sustancias estimulantes, un soporte universal para sujetar las jeringas, un mezclador para conectar todas las mangueras provenientes de las jeringas, una bomba peristáltica para ingresar las soluciones al dispositivo en donde se realiza el experimento, las sustancias residuales se absorben con la ayuda de una bomba de succión.

En este trabajo se propone escalar los elementos A, B y D en un micro dispositivo, lo cual permite prescindir de la bomba de succión E y del soporte F. Para escalar el proceso tradicional a un micro-dispositivo se tomaron en cuenta varias consideraciones:

Una célula de músculo puede medir entre 10 y 80[μm] de diámetro, un cardiomiocito mide 10[μm] de diámetro aproximadamente, un agregado de células puede contener alrededor de unas 60 células de diámetro, por lo que pueden llegar a medir alrededor de 600[μm] de diámetro [24][25].

Con estas consideraciones y tomando como mínimo un diámetro de 600[μm], decidimos realizar un pozo de cultivo de 800[μm] de diámetro.

Para el registro y estimulación química de células de cardiomiocitos, por protocolo establecido en el laboratorio de Biofísica, se utilizan en total tres sustancias: colorante celular (fluoróforo) que permite la detección de la actividad celular por microscopia de fluorescencia (ver capítulo 3), solución salina y medio de cultivo que tiene la función de proveer las características fisiológicas necesarias para que las células se mantengan con vida, y un agonista adrenérgico que provoca estimulación. Estas sustancias son ingresadas al sistema de manera individual y en diferentes tiempos del registro celular. Sin embargo, para el experimento se disponían solo de 2 bombas de infusión (una bomba doble con dos jeringas programables simultáneamente y otra con solo una jeringa).

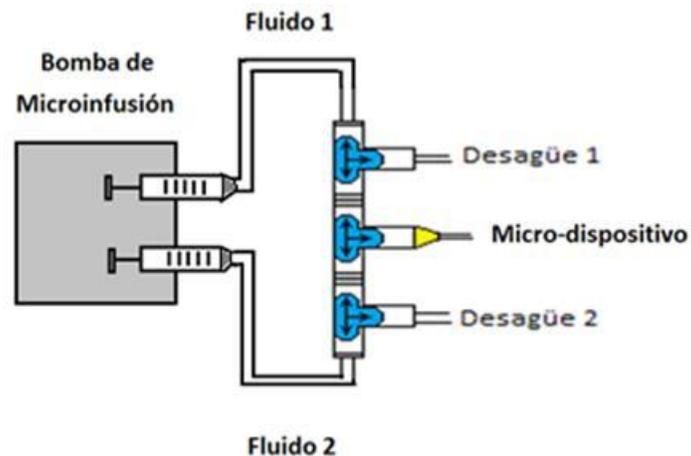


Figura 2.2. Diagrama de válvulas para intercambiar 2 sustancias con 1 sola bomba de micro-infusión.

Inicialmente se dispuso con un sólo canal de entrada al sistema de perfusión microfluídico, por lo que se incorporaron sistemas de válvulas para intercambiar las tres entradas de las sustancias, como se muestra en la figura 2.2. Sin embargo, esto producía complicaciones en el sistema microfluídico, como fugas, errores en la apertura y cierre de válvulas y la inserción de múltiples burbujas de aire, que dentro de canales microfluídicos se convierte en un problema mayor.

Debido a las limitantes del número de bombas de infusión disponibles para el experimento decidimos incluir dos canales de entrada al sistema de perfusión microfluídico, con esto los sistemas de válvulas fueron innecesarios (ver figura 2.3 a). El colorante o fluoróforo sólo es requerido al inicio del experimento, lo cual nos permite cambiarlo por cualquiera de las otras dos sustancias en las bombas de infusión pues su presencia no era continua.

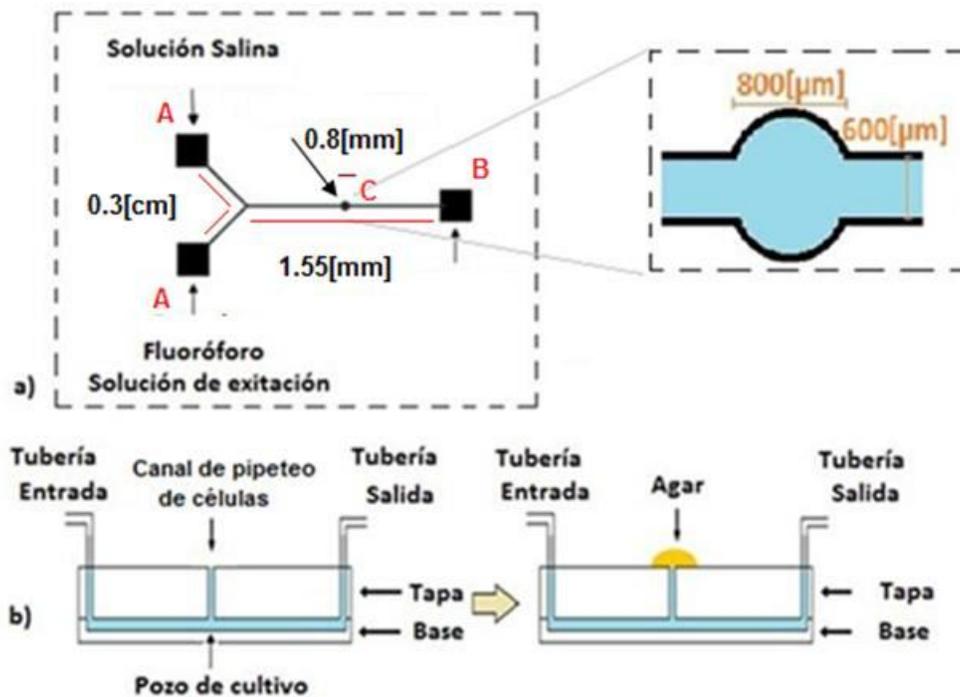


Figura 2.3.a). Vista superior del diseño del micro-dispositivo indicando sus partes y algunas de sus dimensiones: sección A es la interfaz de macro a micro (entrada de fluidos), sección B es la interfaz de micro a macro (salida de fluidos). b). Vista lateral del micro-dispositivo con el canal de ingreso de células abierto, una vez insertadas las células al pozo de cultivo se aplica Agar para sellar la entrada.

El molde se diseñó con las siguientes medidas: dos canales de entrada de 0.3 [cm] de longitud, los cuales se unen y forman un solo canal principal con longitud de 1.55 [cm]. Tomando en cuenta las dimensiones de un agregado (descritas anteriormente) en la parte central del canal principal se ubicó el pozo circular de cultivo de 800 [µm] (Punto C de la figura 2.3a). Para el ingreso de las sustancias al sistema de perfusión microfluídico se realizan la interfaz micro-macro y macro-micro, a la entrada y salida de los fluidos respectivamente de 0.25[cm] de lado.

Al contrario del pozo de cultivo, el cual está definido por el diámetro del agregado de células que se desea generar, el ancho del canal se diseñó con un diámetro menor al pozo de cultivo, ver figura 2.3a, debido a las limitantes que se tienen con moldes de PST explicadas anteriormente. La mínima resolución funcional que se ha encontrado en trabajos anteriores realizados por alumnos la Facultad de Ingeniería es de 200 [µm] de ancho, ya que diseños de dimensiones menores colapsan entre ellas durante el proceso de reducción [22].

Los canales abiertos, lo que se conoce como microfluídica abierta, raramente son útiles para cualquier aplicación en fluidos, debido a la intolerancia a la presión y la rápida evaporación de las muestras. Además, en dimensiones de micrómetros se presenta un aumento en la viscosidad, lo cual dificulta el control de un fluido a través de un micro canal (ver figura 2.4a).

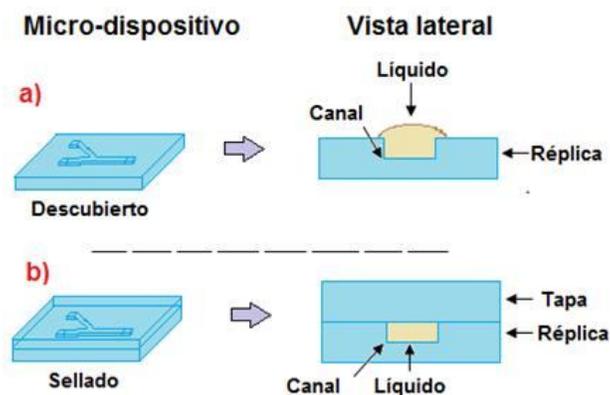


Figura 2.4. a). Diagrama del micro-dispositivo sin sellar. b) Diagrama del micro-dispositivo sellado.

Considerando los efectos antes mencionados, se propuso sellar el dispositivo para poder tener un flujo de perfusión controlado figura 2.4b. En general este sello se lleva a cabo uniendo la réplica de PDMS ya sea con una oblea o con un portaobjetos, ambos de vidrio, mediante un proceso de oxidación (ver sección 2.3). Si consideramos una capa de PDMS que integre tanto al pozo de cultivo como a los canales de perfusión cuya tapa sea de vidrio, se presenta el problema de micro maquinar y perforar sobre vidrio la entrada de las jeringas y tuberías de infusión, pues como ya explicamos anteriormente es difícil por la rigidez del vidrio, así como por la resolución que manejamos del orden de los micrómetros.

Se consideró también que el análisis de la muestra se realizaría en un microscopio invertido, por lo que se requiere que el pozo contenedor de células se encuentre en la parte inferior para su observación figura 2.3b.

Debido a las problemáticas presentadas, empleamos un proceso poco utilizado que consiste en el sellado de PDMS sobre PDMS. Con este método, la perforación fue resuelta fácilmente empleando un sacabocados marca Ted Pella Inc. No. 15071 Harris Uni-Core, Hole .50 [mm] (Ver sección 2.4). Para el ingreso de células al dispositivo se realizó una perforación de 0.75 [mm] de diámetro sobre el pozo. Por este ducto se insertan las células empleando una pipeta (marca BIOHIT Proline de 0.5 [µl]-10[µl]), se agrega medio de cultivo por el mismo conducto, también se utiliza la misma pipeta y posteriormente se ingresa el chip dentro de la cámara de cultivo o incubadora (ver figura 2.3b).

Para la interfaz de conexión micro-macro, es decir del chip a la bomba de jeringa de infusión, se emplearon unos pequeños tubos metálico (New England Small Tube Corporation 23 Ga TWx500" tipo 304 W/D Full Hard) de diámetro externo 0.028[in] y diámetro interno de 0.020[in]. Estos tubos sirven de interfaz con las mangueras flexibles (marca Masterflex hechas de Tygon LFL, con un diámetro interno de 0.25 [in] (5.5 [mm])).

Para realizar el registro de agregados celulares cultivados, es necesario sellar la entrada de alimentación celular para evitar fugas y lograr un flujo de perfusión

continuo y estable. Después de varios intentos fallidos de cubrir la entrada con un cubreobjetos que se despegaba debido a la humedad del medio, se logró el sellado empleando Agar, una gelatina vegetal de origen marino. El mejor sello se logró con una concentración del 10% (1[g] de Agar por 10[ml] de agua desionizada) figura 2.3b. El Agar es utilizado en microbiología y bacteriología como medio de cultivo sólido para microorganismos [26].

2.2 Obtención de moldes y réplicas

En esta sección se describen los pasos que empleamos para la obtención de un molde y réplica del micro-dispositivo, ajustando las técnicas antes mencionadas (ver sección 2.1) a la disponibilidad de equipo y necesidades específicas del laboratorio. En la figura 2.5 se presenta un diagrama de flujo del proceso.

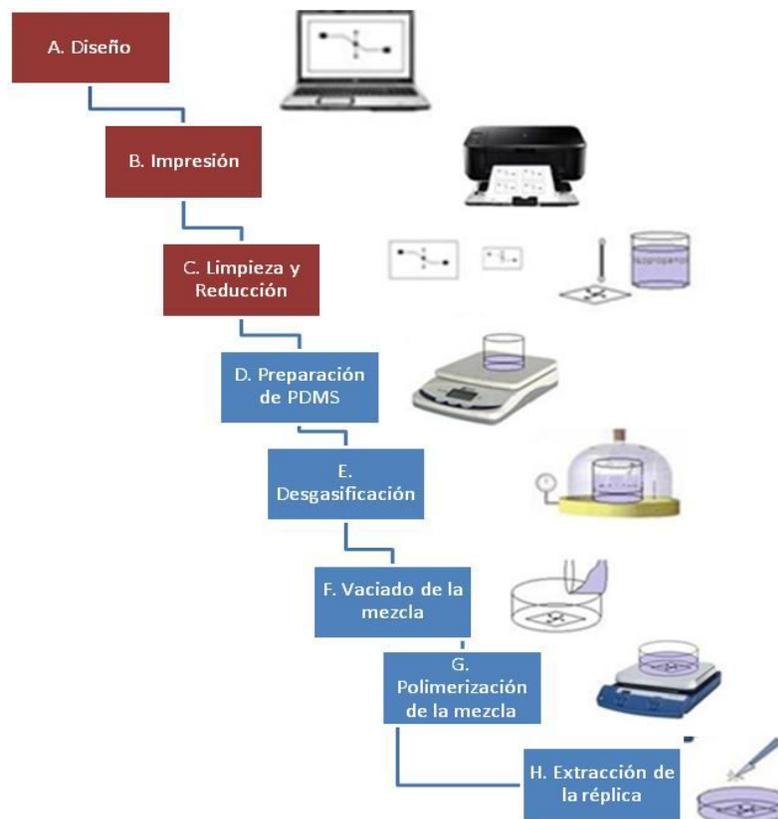


Figura 2.5. Esquema que describe el flujo del proceso de fabricación, en color rojo corresponde a la fabricación del molde y en color azul el proceso que se sigue para la obtención de la réplica.

Diseño CAD: Se diseñan los canales del micro-dispositivo con el auxilio de un software CAD, en este caso empleamos Corel Draw X5, considerando las descripciones de la sección 2.1.

Impresión: La calidad de la impresora delimita la cantidad de impresiones así como la definición de las mismas. Utilizado una impresora HP Laser Jet Pro 400 color M451dn, se puede sobreimprimir siete veces el diseño sobre la misma hoja de PST sin que exista errores significativos de impresión figura 2.6, por lo que hay que cuidar en la medida de lo posible, la alineación en cada impresión. Al imprimir siete veces se logra una profundidad aproximada de la tinta de $6.6[\mu\text{m}]$ y después de aplicar calor aumenta a $60[\mu\text{m}]$ aproximadamente, un aumento de más del 500% como se explicó anteriormente en la figura 1.7.

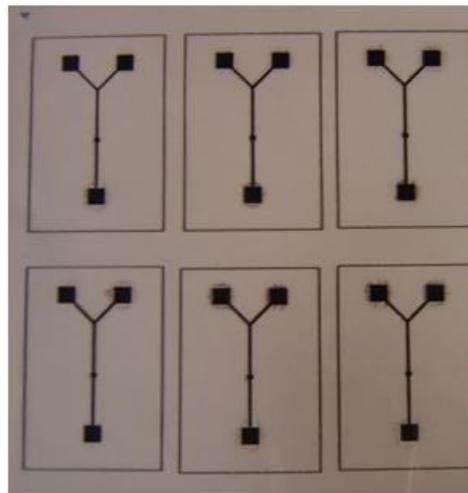


Figura 2.6. Ejemplo de una hoja de PST con la impresión del diseño.

Limpieza y Reducción: Como ya se mencionó en la sección 2.1, para la fabricación de los moldes se utilizaron hojas de poliestireno termoplástico (PST), comercialmente llamadas Shrinky Dinks, las cuales se reducen dimensionalmente por medio de calor empleando un horno a $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, encogiéndose aproximadamente a un tercio de su tamaño original y aumentando hasta nueve veces en espesor [21][27]. Se recorta el diseño de la hoja impresa de PST cuidando una simetría rectangular alrededor del diseño. Como en la impresión quedan residuos no deseados (figura 2.7a), se retiran cuidadosamente con un

hisopo de algodón previamente remojado en isopropanol. Colocamos la sección impresa sobre una base de vidrio, previamente sanitizada (ver ANEXO 1), se introduce en un horno a una temperatura de 160°C durante 2 minutos 40 segundos aproximadamente. Al retirar el molde del horno y antes de que se enfríe la superficie del molde, nos auxiliamos de un utensilio rígido y plano, el cual es presionado suavemente sobre el molde para lograr uniformidad quedando como en la figura 2.7b.

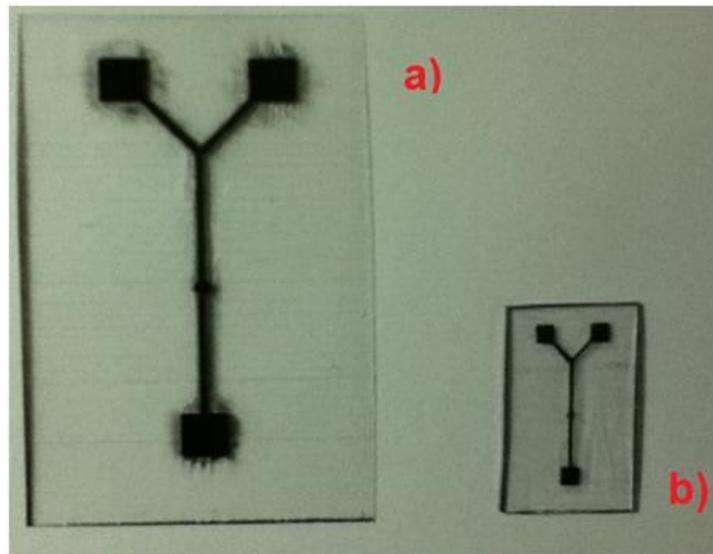


Figura 2.7. Muestras de la hoja de PST antes y después de su reducción por incremento en la temperatura. a) muestra la lámina de PST recién impreso, antes de limpiarlo. b) muestra el PST después de limpiarlo y reducirlo.

Preparación de PDMS: Se utiliza el Sylgard Kit 184 de la compañía Dow Corning, el cual consta de un pre-polímero y de un agente curante, ambos líquidos. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, así como de la gran mayoría de los artículos en los que se reporta el uso de este elastómero, se prepara una solución de PDMS en una relación 10:1, con ayuda de una balanza de precisión. Sobre ella se coloca un vaso de precipitados y se calibra en ceros la balanza (tarar la balanza). Se miden 25 [gr] de pre-polímero PDMS, posteriormente se tara la balanza y se miden 2.5 [gr] del agente curante, como se

muestra en la figura 2.8. Se mezcla uniformemente hasta incorporar el agente curante con el pre-polímero PDMS.

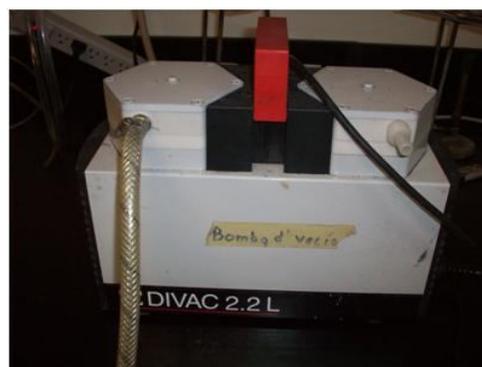


Figura 2.8. Fotografía del proceso de preparación de la relación 10:1 del pre-polímero y el agente curante.

Degasificación: Para evitar la formación de burbujas en la réplica y extraer el aire introducido en el proceso de mezclar el pre-polímero y el agente curante, se introduce la mezcla por 30 minutos en un desecador (Marca CIENCEWARE BEL-ART PRODUCT) que está conectado a una bomba de vacío marca Leybold modelo DIVAC 2.2L (ver figura 2.9).



Figura 2.9 a) Desecador utilizado en el experimento.



b) Bomba de vacío utilizada para extraer el aire de la mezcla.

Vaciado de la mezcla: Se colocan los moldes limpios (ver Anexo1), con el perfil que tiene los patrones impresos hacia arriba, en las cajas Petri previamente sanitizadas y se vierte el PDMS lentamente cuidando que no se introduzca por debajo de los moldes, tal y como se observa en la figura 2.10a.

Para quitar las burbujas restantes introducimos las cajas Petri nuevamente al desecador en vacío por 15 minutos.



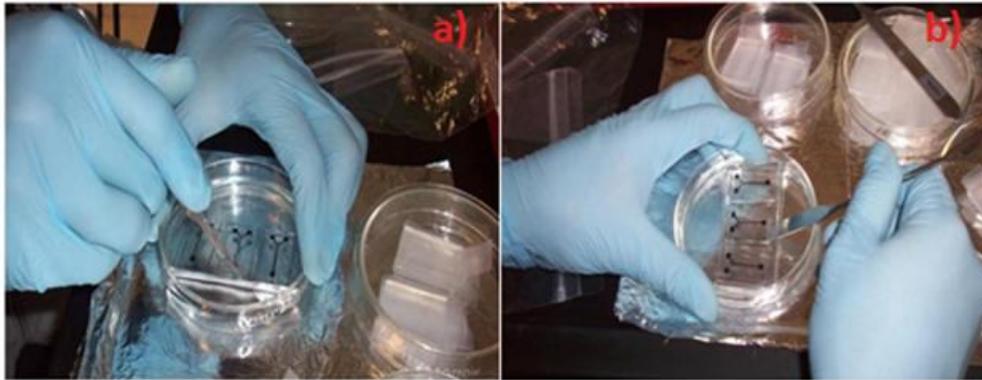
Figura 2.10 a). Proceso de vaciado del PDMS sobre el molde. b). Proceso de polimerización de la mezcla de PDMS.

Polimerización de la mezcla: Para acelerar el proceso de polimerización colocamos las cajas Petri en una parrilla eléctrica a una temperatura de 54°C por 1 hora y 15 minutos (figura 2.10b).

Extracción de la réplica: Utilizando un bisturí del No. 3 y con una navaja No. 11 de acero inoxidable desechable, cortamos la réplica obtenida en el PDMS; siguiendo el contorno del molde (figura 2.11a). Con la ayuda de una espátula se retira lentamente para evitar rupturas en la réplica (figura 2.11b).

Para eliminar partículas de PDMS, se limpia la réplica extraída con cinta adhesiva (marca Scotch) de tal forma que se retiren partículas y pelusas. Posteriormente,

para evitar futuras contaminaciones de microparticulas, las réplicas se envuelven en cinta adhesiva.



a)

b)

Figura 2.11 a). Proceso de corte de la réplica. b). Proceso de extracción de la réplica y chips cubiertos con cinta scotch.

Nota: La base de la caja Petri tiene una forma cóncava, de tal manera que para obtener una réplica sin la concavidad, se deposita una base de PDMS (10[gr] del pre- polímero PDMS y 1[gr] del agente curante) y se siguen los pasos del E al G, con lo que queda una capa polimerizada plana. Sobre esta capa se repiten los pasos del D al H. Para fabricar las tapas del dispositivo se mezclan 30[gr] del pre- polímero PDMS y 3[gr] del agente curante en el inciso *D* y se repiten los incisos del *E* al inciso *H*.

Para realizar las entradas y salida del sistema de perfusión e inyección de células, perforamos la tapa con la ayuda de un sacabocados (marca TED PELLA de 0.5 [mm] de diámetro), cuidando la alineación con el diseño de la base (ver figura 2.12 a).

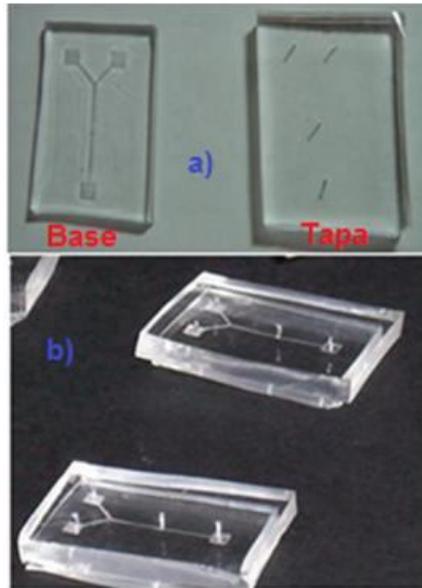


Figura 2.12 a). El molde con la base y la tapa antes de sellarlos. b). Muestras del chip sellado después de aplicarles el tratamiento corona.

2.3 Sellado del dispositivo

El sellado que realizamos es de una capa micro estructurada de PDMS, que incluye el pozo de cultivo y los micro canales de perfusión, con otra capa lisa de PDMS. Para realizarlo, es necesario modificar la superficie de ambas caras de PDMS que se van a unir, a esto se le conoce como activación de superficies, el que generalmente se emplea para esterilizar, convertir una zona hidrofóbica a una hidrofílica y para facilitar la unión entre diversas superficies.

Para activar la superficie del PDMS existen diversos métodos, tratamiento por cámaras de plasma de oxígeno, exposición a rayos UV y utilizando el corona tester o bobina de tesla. La ventaja del uso de un corona tester es su bajo costo, portabilidad y fácil manejo sin aditamento alguno. Además de que es el equipo con el que se cuenta en el laboratorio.

Es así que para adherir la cubierta con la base del dispositivo es necesario ionizar las superficies; con el corona tester (que produce el efecto corona) se genera una diferencia de potencial la cual produce la ionización de la superficie próxima. En

este proceso se alinean los iones OH en la superficie del PDMS (oxidación de la superficie) y como otro efecto se libera ozono. Al poner en contacto las superficies activadas de la cubierta con la base se generan enlaces covalentes, los cuales aseguran el sellado entre las dos superficies [28], como se ejemplifica en la figura 2.13a.

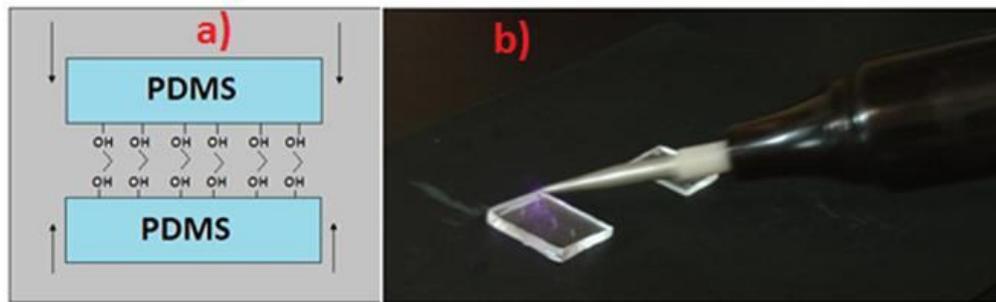


Figura 2.13.a). Ejemplificación del efecto corona sobre PDMS. Se ionizan en proporciones distintas la cubierta y la base. b). Aplicación de corona sobre la tapa y la base del chip.

Sobre una hoja limpia se colocan la base y la cubierta. Utilizando el Corona tester se oxidan la *base por 40 segundos* y la *tapa por 80 segundos* (ver figura 2.13b). Inmediatamente después de la ionización, se ponen en contacto las superficies de la cubierta con la de la base, cuidando que las entradas de perfusión y el pozo estén alineados y ejerciendo una presión uniforme figura 2.12b. Posteriormente colocamos el chip dentro de una cámara térmica, confeccionada con una hielera de unicel, dentro de la cual se colocó un resistor de pecera (que calienta el ambiente a 33°C) durante 24 horas, superponiendo un objeto rígido sobre el chip para asegurar el contacto uniforme entre ambas superficies y así obtener un buen sellado [28] [29].

Nota: Durante el proceso de ionización, se debe usar protección para los ojos y una mascarilla para que el ozono liberado por la oxidación de la superficie no sea aspirado por el usuario..

2.4 Caracterización dimensional de los dispositivos

Para la caracterización dimensional de las partes micro fabricadas, se utilizó el analizador de micro-sistemas MSA-400 Polytec [30] ubicado en el cuarto limpio clase 10000 del Centro UNAMems de la Facultad de Ingeniería. Este equipo cuenta con un módulo de medición de topografía por interferometría de luz blanca, de tal manera que las mediciones son no invasivas.

La interferometría de luz blanca consiste en incidir un haz de luz que es dividido en dos trayectorias perpendiculares. Un haz de luz es considerado de referencia y otro haz es proyectado hacia la muestra o superficie a medir. La luz reflejada en ambos casos, es capturada por una cámara de video que procesa imágenes y mediante el *software Topography Measurement System (TMS)* de Polytec, se obtiene un perfil de la altura y profundidad del objeto [22] [7].

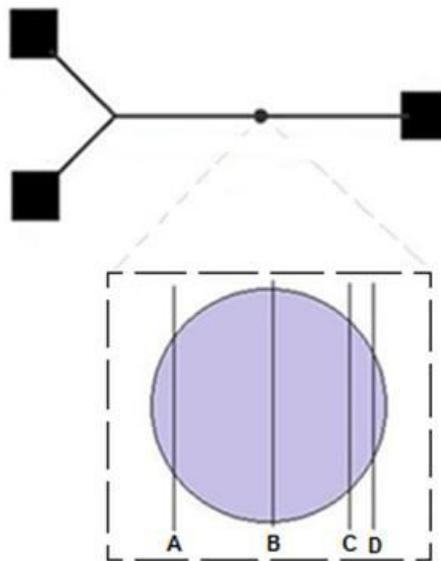


Figura 2.14. En esta imagen se muestra el diseño de los canales y una vista ampliada del pozo de cultivo ubicando las diferentes zonas en donde se realizaron mediciones.

Se realizaron las mediciones para obtener profundidad y ancho tanto del canal de perfusión como del pozo de cultivo. El analizador de micro-sistemas Polytec permite un área de medición limitada al tipo de lente empleado (con un lente de 20X el área de medición es de 450[μm] por 335[μm]) [31]. Debido a esto dividimos

el área del pozo de cultivo en cuatro secciones mostradas en la figura 2.14 para obtener tanto ancho como profundidad. Además es importante mencionar que el sistema de Topografía es de alta resolución nanométrica sobre superficies reflejantes. Con superficies transparentes se obtienen mediciones de menor resolución, sobre todo por debajo de los 50 micrómetros. Como la superficie del molde es transparente, se eliminan los decimales (o nanómetros) de los resultados obtenidos ya que no se consideran representativos.

Tomando en cuenta que el PDMS se vierte sobre el molde, la réplica adoptará la forma del molde con precisiones nanométricas (menores a 100 [nm]) [18]. Por lo que podemos saber las dimensiones del dispositivo final (réplica) a través de medir el molde.

	Pozo				Canal
	Sección A	Sección B	Sección C	Sección D	
Ancho	482 [μm]	578 [μm]	455 [μm]	455 [μm]	673 [μm]
Profundidad	68[μm]	93 [μm]	78 [μm]	de 55 [μm]	57 [μm]

Tabla 2. Mediciones del pozo en sus diferentes secciones y del micro canal de perfusión.

Mediciones del pozo de cultivo celular y del canal microfluídico

En la sección A se obtuvo una profundidad de 68 [μm] y un radio de 482 [μm]. En la sección B, la profundidad es de 93 [μm] y el radio es de 578 [μm]. En la sección C se obtuvieron las siguientes medidas: profundidad de 78 [μm] y un radio de 455 [μm]. En la sección D del pozo se muestra la unión del canal con el pozo de cultivo, las mediciones fueron similares a la profundidad del canal de 55 [μm] y un radio de 455 [μm] para el pozo de cultivo celular.

En la figura 2.15 se observa uno de los resultados de los perfiles. El sistema es capaz de producir una imagen tridimensional de la micro estructura cuyos colores representan diferentes niveles de profundidad. Asimismo, se puede analizar un corte de una sección transversal bidimensional. Empleando esta herramienta,

podemos decir que el ancho del canal microfluídico es de 673 μm y, la altura es de 57 μm . Estas mediciones se resumen en la tabla 2.

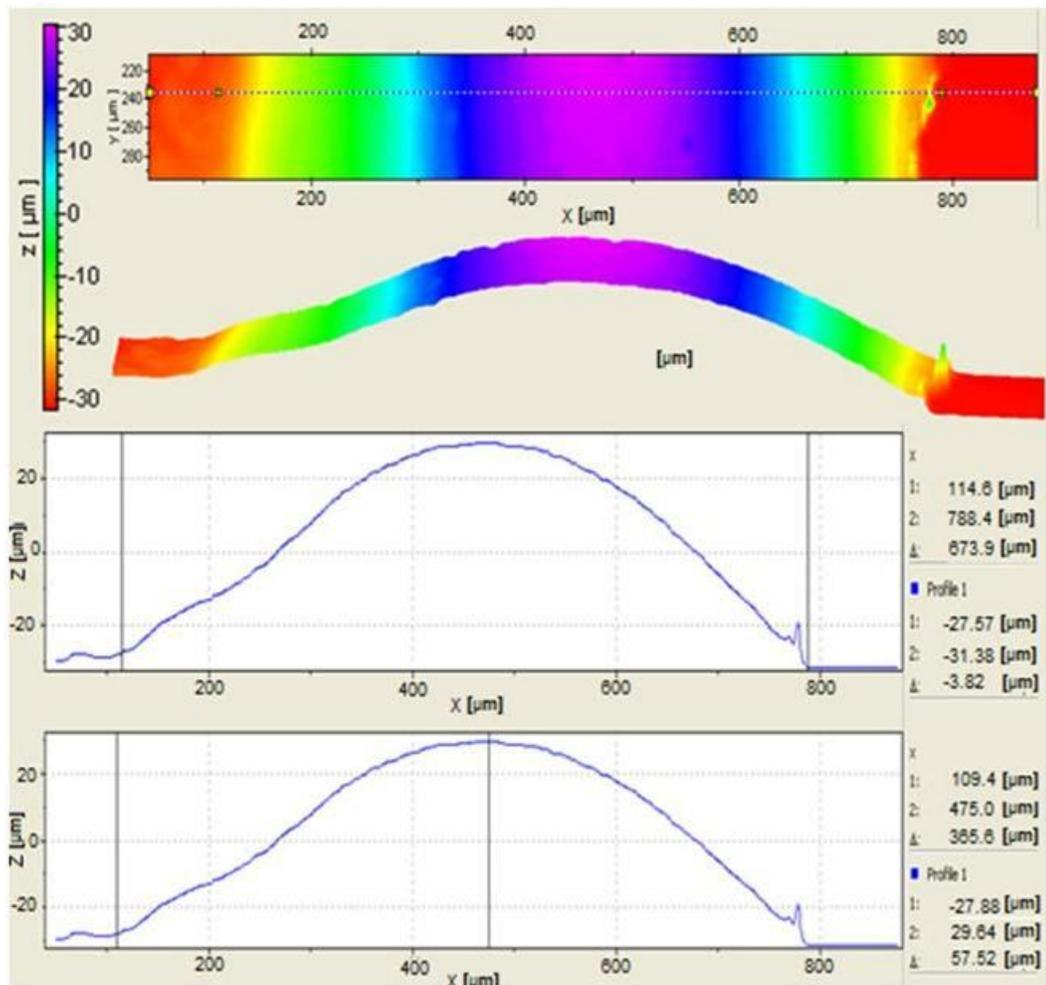


Figura 2.15. Imagen obtenida en el Polytec en donde se muestra el ancho del canal. Se muestra una imagen en 3D y posteriormente una imagen en 2D de la misma zona.

CAPÍTULO 3

Principio de microscopía de fluorescencia

Las pruebas de fluorescencia permiten detectar componentes particulares de ensambles bio-moleculares complejos, como son las células vivas, con gran sensibilidad y selectividad. La fluorescencia es el resultado de tres etapas: excitación, tiempo de vida de fluorescencia y emisión, que ocurren en ciertas moléculas llamadas fluoróforos o colorantes fluorescentes [32].

Para monitorear el registro de la actividad celular se emplea la técnica de microscopía de fluorescencia, usando un material que confiere propiedades fluorescentes (fluoróforo) a los tejidos o cultivos celulares, absorbe radiación de una fuente específica (a cierta longitud de onda) y muy rápidamente emite luz cuya energía es menor (de mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido. Este material se emplea como marcador de la actividad celular, y el comportamiento óptico es registrado por un microscopio de fluorescencia, el cual tiene la opto-electrónica apropiada para detectar los cambios espectrales. Las técnicas de microscopía de fluorescencia pueden ser aplicadas a tejido de forma in vivo o in vitro. El uso de fluoróforos específicos ha hecho posible la identificación de células y componentes celulares sub-microscópicos [33].

En este capítulo describimos los principios básicos de la microscopía de fluorescencia, esta técnica se utilizó tanto para caracterizar el sistema de perfusión microfluídica que se desarrolla en el Capítulo 4, como para registrar la actividad de los agregados celulares cuyos resultados se presentan en el Capítulo 5. También se describe los tipos de fuentes luminiscentes que se emplean en el proceso de excitación de los fluoróforos empleados en la caracterización de la perfusión.

3.1 Fluoróforos

Un fluoróforo es diseñado para responder a estímulos específicos o localizar una región determinada de un espécimen biológico. Son considerados como pigmentos para tejidos, los cuales se adhieren a una estructura visible o sub-visible de materia orgánica. Los fluoróforos absorben un rango de longitud de onda de la energía luminosa y emiten en otro rango de longitud de onda, entre estos rangos se encuentra la excitación máxima y la emisión máxima. Debido a que las longitudes de onda de excitación y emisión son diferentes, la luz emitida y absorbida se detecta a diferentes colores o áreas del espectro visible. Sin embargo, la alta intensidad luminosa puede causar que la estructura del fluoróforo cambie y pierda fluorescencia, a esto se le llama foto-blanqueo (*photobleaching*) [34].

También se emplean como trazadores en los fluidos, como colorante para la tinción de ciertas estructuras, como sustrato de enzimas, o como sonda o indicador. Los fluoróforos se utilizan en particular para teñir tejidos, células, o materiales en una variedad de métodos de análisis, es decir, de formación de imágenes y la espectroscopia fluorescente.

3.1.1 Fluoróforos empleados

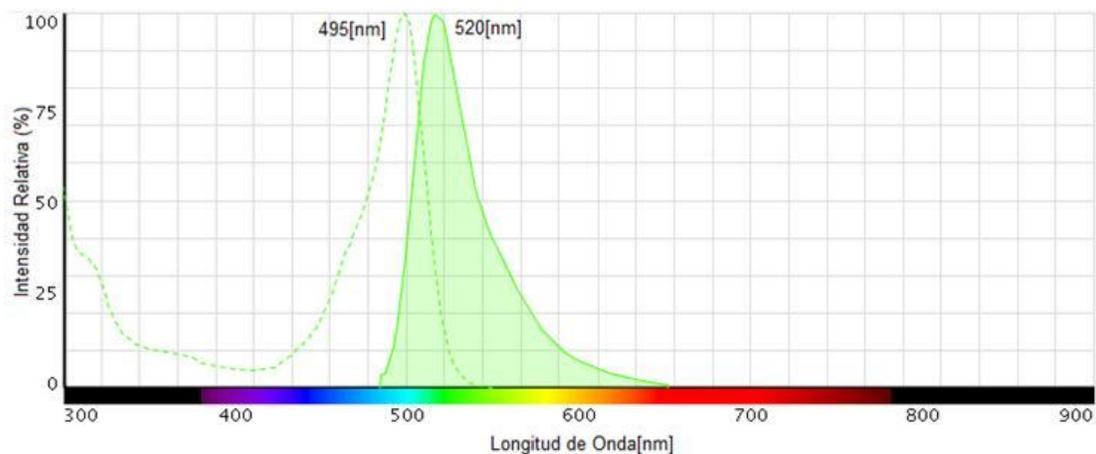


Figura 3.1. Representación gráfica de la excitación (línea punteada) y emisión (gráfica sombreada) de la fluoresceína[35].

El fluoróforo que empleamos para caracterizar el flujo de perfusión del chip microfluídico fue la fluoresceína, esta tiene una longitud de onda de excitación de 494 [nm] y longitud de onda de emisión de 520 [nm], como se grafica en la figura.3.1 [36].

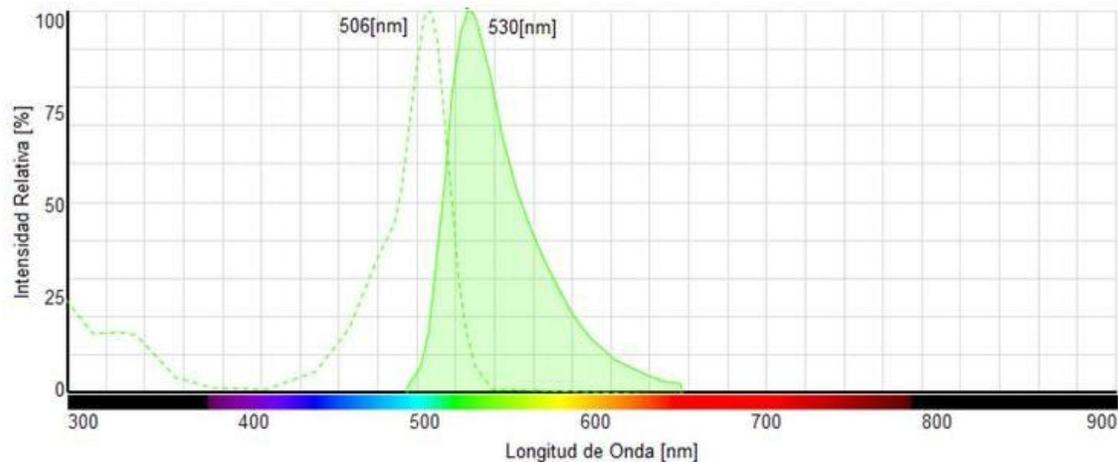


Figura 3.2. Representación gráfica de la excitación (línea punteada) y emisión (gráfica sombreada) del Calcium Green.

Cuando realizamos los experimentos con cardiomiocitos utilizamos Calcium GreenTM-1, AM (Marca invitrogen, 50[μg] No. cat: C3012. Lot: 470511) con una longitud de onda de excitación de 506[nm] y emisión a 530[nm] como se grafica en la figura 3.2. Es una sustancia sensible y selectiva al calcio [37].

3.2 Fluorescencia

La fluorescencia es la propiedad de algunos átomos y moléculas para absorber luz de una longitud de onda particular, para posteriormente emitir luz de una longitud de onda mayor por un breve intervalo, a esto se le conoce como el tiempo de vida de fluorescencia y como se mencionó, ocurre en tres diferentes etapas:

Excitación: Un fotón de energía es emplazado mediante una fuente de energía como una lámpara incandescente o un láser, y absorbido a través de un fluoróforo creando un estado de excitación.

Tiempo de vida de excitación: El estado de excitación tiene un tiempo de vida finito, típicamente de 1-10 [ns].

Emisión de fluorescencia: Debido a que el estado excitado es inestable, después del tiempo de vida, el fotón es emitido alcanzando el fluoróforo un estado de energía más bajo.

El proceso de fosforescencia ocurre de una manera similar pero con un tiempo de vida de excitación mucho mayor. [32].



Figura 3.3. Ejemplificación del efecto de excitación y emisión de una partícula luminiscente.

En la figura 3.3 observamos cómo una partícula es excitada con luz; sin embargo, para asegurar que la luz de la longitud de onda que excita a la partícula sea la adecuada, se coloca un filtro que sólo deja pasar la longitud de onda de excitación adecuada (flecha morada). La partícula responde unos nanosegundos después emitiendo luz. Para asegurarnos que lo que observamos es la luz de respuesta (flecha azul) se utiliza un filtro que deje pasar esa longitud de onda.

3.3 Funcionamiento del microscopio de fluorescencia

Para tener un registro de fluorescencia se debe contar con una fuente de excitación luminosa, un fluoróforo, filtros de longitud de onda para aislar los fotones emitidos de los fotones excitados y un detector para registrar la emisión de fotones y que genere una salida de grabación, por lo general, como una señal

eléctrica. La compatibilidad de estos cuatro elementos es esencial para realizar la detección de fluorescencia.

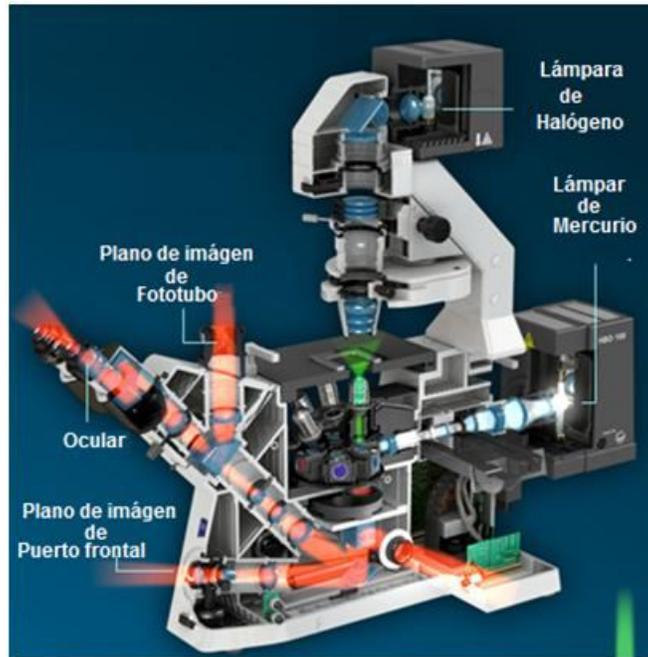


Figura 3.4. Se muestra la trayectoria que sigue la luz de excitación (verde) y la luz de emisión (rojo) de un microscopio invertido de fluorescencia [38].

Los microscopios invertidos de fluorescencia son de los más utilizados para adquisición de imágenes en células vivas por lo que es indispensable conocer los principios básicos de funcionamiento. Como se muestra en la figura 3.4 básicamente un microscopio invertido de fluorescencia cuenta con una lámpara que produce la luz de excitación (Halógeno, Xenón, LED, Mercurio, etc.), esta luz es filtrada a través de un cubo que contiene un par de filtros (ver figura 3.5), el primer filtro es para obtener la luz de excitación de un fluoróforo específico (ver sección 3.5), posteriormente esta luz es dirigida con un espejo dicróico hacia la platina con nuestra muestra a estudiar (teñida con un fluoróforo), la luz que emite regresa por el espejo dicróico y se pasa por un filtro para asegurarnos que sólo veamos la luz de emisión correspondiente al fluoróforo seleccionado. Esta luz es direccionada hacia el ocular y/o hacia la cámara que nos servirá de apoyo para registrar el estudio [38] [39].

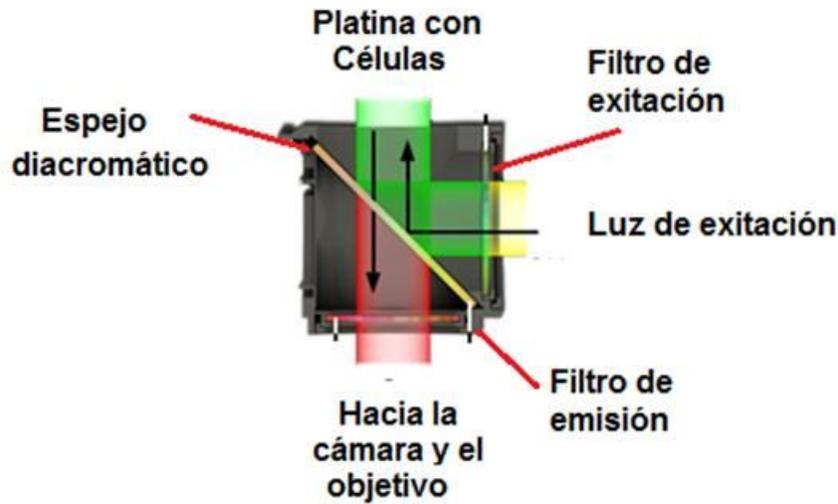


Figura 3.5. Diagrama del cubo de filtros en un microscopio invertido [39].

3.4 Lámpara de Mercurio

La lámpara de mercurio se utiliza comúnmente en estudios de fluorescencia debido a que emite en todo el rango de la luz visible (400[nm] - 750[nm]), esto es ideal si se tienen fluoróforos de longitudes de onda de excitación diferentes.

Como la lámpara de mercurio emite una luz que abarca el espectro de luz visible, es necesario utilizar filtros que solo permitan el paso de la longitud de onda que excita al fluoróforo empleado. En nuestro caso, tomando en cuenta los fluoróforos que empleamos (ver sección 3.5) utilizamos un filtro para fluoresceína (Fluoresceine-isothiocyanate siglas en inglés: FITC) el cual permite el paso de luz en el rango de 490-505[nm] y una longitud de onda central de 498[nm], como se muestra en la figura 3.6 [40]. En el experimento se utilizó una lámpara de mercurio marca Nikon modelo HP-10101AF mostrada en la figura 3.7b.

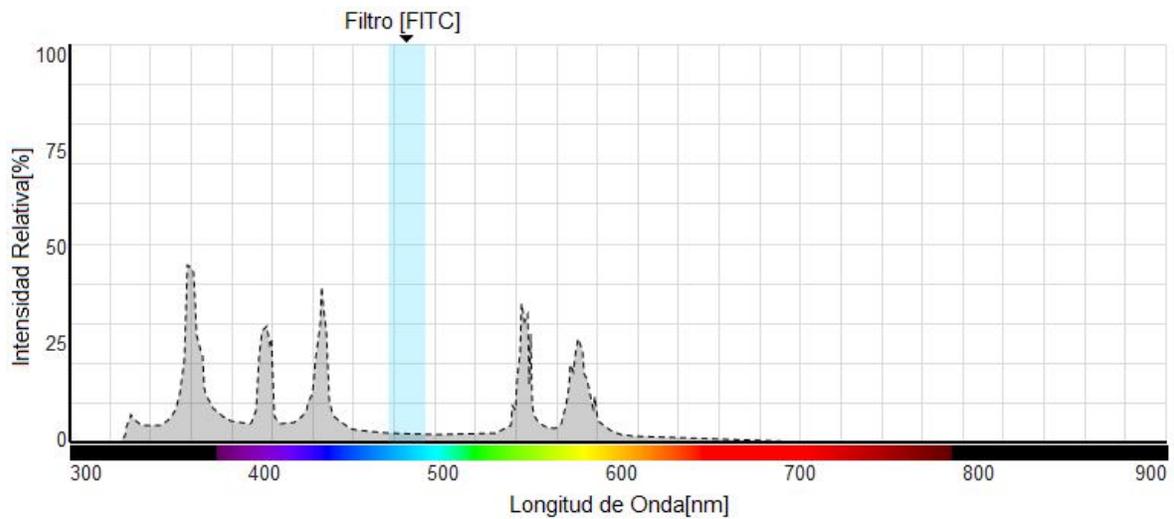
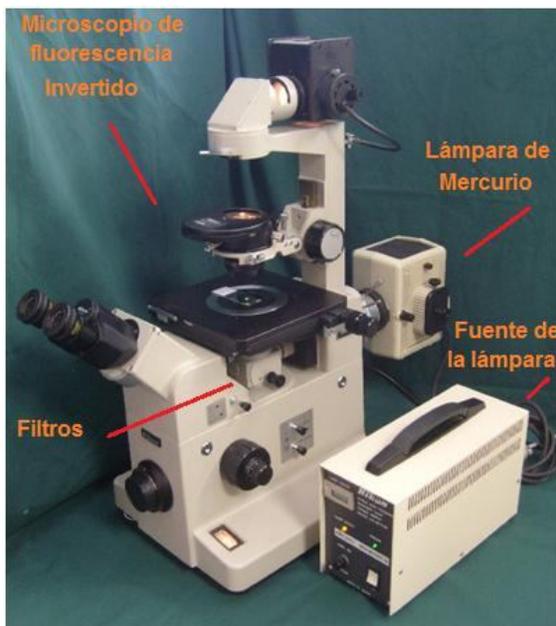


Figura 3.6. En la gráfica sombreada en negro se muestra el espectro de luz emitida por la lámpara de mercurio y en azul se muestra el ancho de banda que deja pasar el filtro FITC (490-505[nm]) [35].



. a).



b). .

Figura 3.7. Fotografía del a) Microscopio de fluorescencia marca Nikon con todos los componentes. b) de la lámpara de mercurio

CAPÍTULO 4

Sistema de perfusión y cultivo microfluídico

El término de perfusión se refiere a introducir lenta y continuamente un líquido, como la sangre o una sustancia medicamentosa, por vía intravenosa o en el interior de órganos, cavidades o conductos. En cualquier cultivo celular *in vitro* es necesario suministrar las condiciones necesarias para que el cultivo subsista fuera de su ambiente natural, por lo que se suministran los nutrientes necesarios mediante jeringas y conductos, a esto se le conoce como perfusión.

Las principales ventajas de la perfusión son la capacidad para mantener el pH y la concentración iónica del medio durante los experimentos a largo plazo, así como permitir el ingreso de una variedad de reactivos sin perturbar las células. Por ejemplo, la perfusión permite al investigador introducir una droga al cultivo durante un lapso de tiempo sin interrumpir la adquisición de imágenes. La adición periódica de factores de crecimiento, inhibidores y otras sustancias durante la perfusión puede complicarse al utilizar jeringas o pipetas manualmente, esto puede realizarse de diversas maneras, a través de bombas peristálticas, bombas de micro-infusión, flujo por gravedad, entre otros aditamentos.

El flujo por gravedad es simple de instalar y relativamente barato, pero es difícil controlar la velocidad de flujo normalmente necesaria para microscopia celular. En su configuración básica, un sistema de alimentación por gravedad requiere un gran depósito de medio, colocado en una sección por encima del microscopio, con una sección de tubo estéril conectado a la cámara donde se visualizara el cultivo. La tasa de perfusión en un sistema por gravedad puede ser controlada mediante la variación de la distancia vertical entre los dos depósitos o por una llave de paso que controla el flujo desde el depósito superior. Las características del flujo laminar de los sistemas de alimentación por gravedad son muy poco adecuados pero funcionales cuando se requiere intercambiar rápidamente el medio de cultivo.

Las bombas de micro infusión no son muy utilizadas debido a que en macro escala, las jeringas están limitadas en volumen para experimentos de larga duración, esto debido a las dimensiones de las cámaras de cultivo, que llegan a necesitar mayor cantidad de volúmenes por reactivos.

En un micro-dispositivo empleado para cultivo celular la perfusión es de vital importancia, y se emplea a través de canales micrométricos cerrados, alimentados mediante bombas de micro infusión. Estas bombas permiten lograr flujos controlados a tasas del orden de micro litros por hora [$\mu\text{l/h}$], micro litros por minuto [$\mu\text{l/min}$], nano litros o pico litros dependiendo de la bomba de infusión y de los requerimientos del experimento. Además de que se pueden lograr experimentos de larga duración con cantidades de volúmenes muy pequeños, debido a las dimensiones de los canales.

En este capítulo se presentan los elementos empleados para el arreglo experimental el cual consta de un circuito microfluídico de perfusión, tuberías y bombas de micro-infusión. Este experimento debe reproducir un sistema de perfusión a una tasa de flujo constante y viable para un cultivo celular figura 4.1.

Para el uso de este micro-dispositivo en biología, es necesario conocer y caracterizar el tiempo de permanencia de una sustancia en contacto con el agregado celular, para tener un control de la excitación o efecto que esta sustancia provoca en las células. Para esto empleamos un método de detección por imágenes con ayuda de un microscopio de fluorescencia.

4.1 Implementación experimental

Para desarrollar el experimento se utilizaron equipos disponibles en el Taller de Biofísica de Sistemas Excitables Extendidos de la Facultad de Ciencias UNAM.

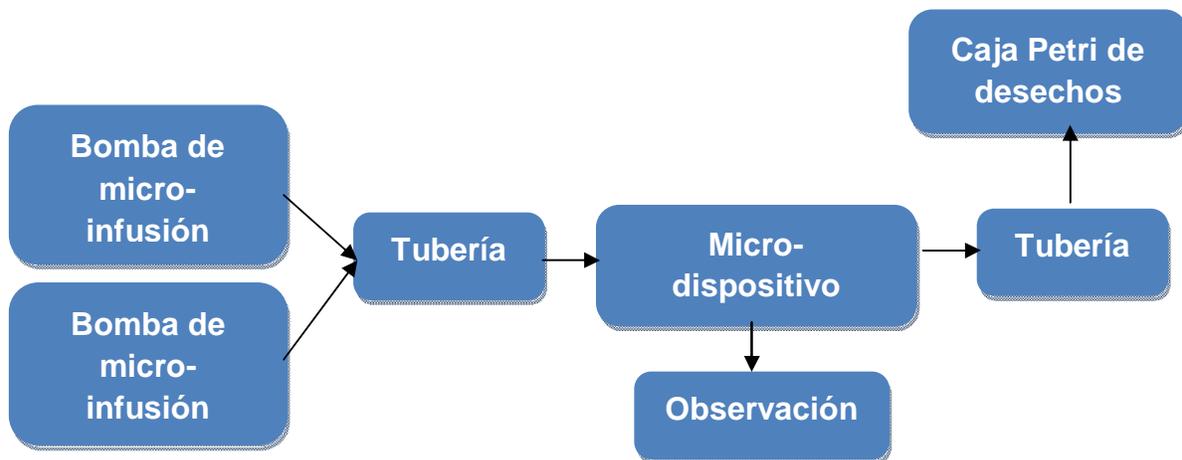


Figura 4.1. Diagrama de General del sistema de perfusión empleado.

Empleamos dos bombas de micro infusión, 3 jeringas de 1[ml], un micro-dispositivo de PDMS, tuberías de conexión y un microscopio invertido de detección de florescencia que consta de la óptica invertida, una cámara digital, un obturador (para controlar la exposición a la luz), una lámpara de mercurio y una computadora para el procesamiento de imágenes.

El experimento se dispuso de la siguiente manera: las jeringas de infusión se conectaron al micro-dispositivo a través de una tubería (marca Masterflex hechas de Tygon LFL, con un diámetro interno de 0.25 [in] (5.5 [mm])), el fluido de desecho del dispositivo se conduce a través de otra tubería a la salida.

El micro-dispositivo se coloca bajo el foco del microscopio invertido marca NIKON, (ver figura 3.7a) para visualizar y adquirir las imágenes del experimento a través de la cámara Nikon, se cuenta con una lámpara de mercurio para poder visualizar el efecto de fluorescencia. La computadora controla al obturador para evitar fotoblanqueo de la fluoresceína. El diagrama se representa en la figura 4.2 y la fotografía del montaje total en la figura 4.3.

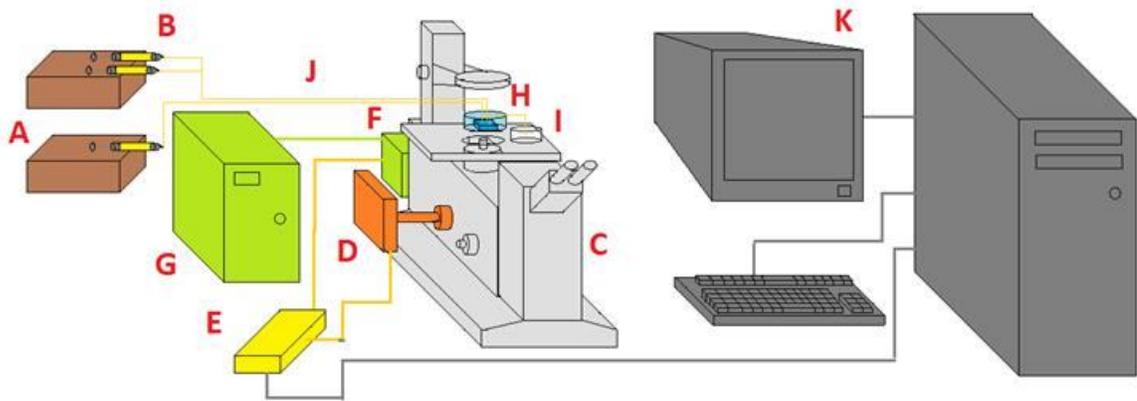


Figura 4.2. Diagrama del experimento. A) Bombas de micro-infusión. B) Jeringas de 1[ml]. C) Microscopio invertido de Fluorescencia. D) Cámara. E) Shutter. F) Lámpara de mercurio. G) Fuente de lámpara. H) Micro-dispositivo I) Recipiente de desagüe. J) Tubería de conexión. K) Computadora con software de adquisición.

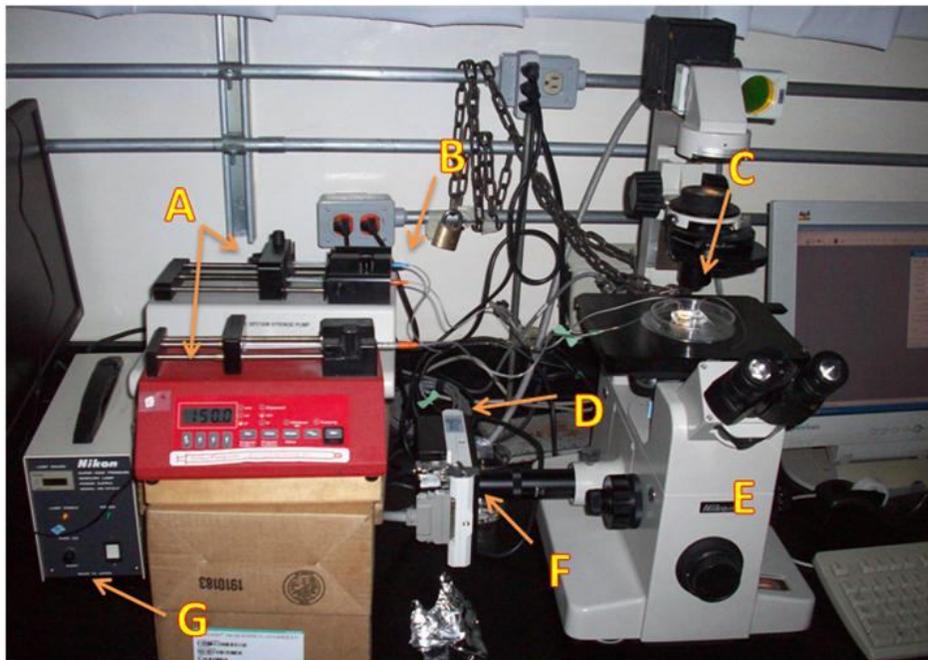


Figura 4.3. Foto del montaje experimental. A) Bombas de micro-infusión. B) Jeringas de 1[ml]. C) Micro-dispositivo. D) Shutter. E) Microscopio invertido de fluorescencia. F) Cámara. G) Fuente de Lámpara de Mercurio.

4.2 Caracterización del circuito microfluídico de perfusión

Para desarrollar un sistema de perfusión microfluídico a flujos constantes y controlados, se improvisaron elementos necesarios como tuberías y conexiones, ya que la mayoría de las conexiones que existen en el mercado para sistemas de perfusión e infusión están diseñadas en un mayor tamaño para contener volúmenes del orden de mililitros, y las existentes para aplicaciones de microfluídica son de alto costo.

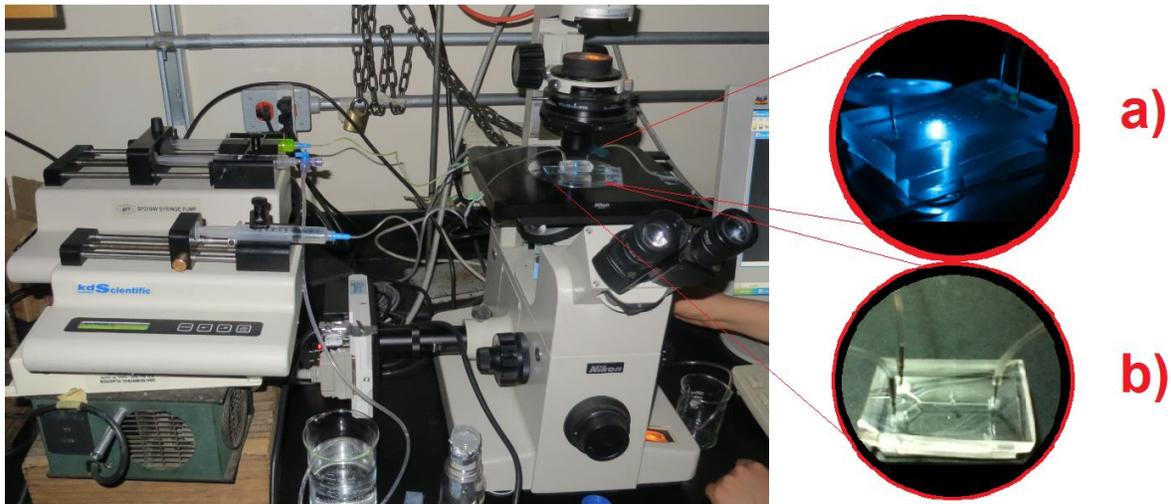


Figura 4.4.a) micro-dispositivo iluminado por la lámpara de mercurio. b) acercamiento al micro-dispositivo, en donde se observan los canales y la tubería.

Debido a esto empleamos conexiones para cateterismo, mariposas para catéter calibre 25 y jeringas de insulina de 1 [ml]. En cada entrada del dispositivo se colocó una tubería de 0.028[in] de diámetro interno y un tubo metálico (New England Small Tube Corporation 23 Ga TWx500" tipo 304 W/D Full Hard) de diámetro externo 0.028[in] y diámetro interno de 0.020[in]. A la salida del dispositivo se conectó un tubo metálico y una tubería de las características antes mencionadas, para la salida de los desechos que serán depositados en una caja Petri (ver figura 4.4.). Cabe mencionar que el flujo dentro del microcanal que

alimenta al cultivo es laminar (capítulo 1), por lo que el desecho que viaja en este mismo canal pero posterior al pozo de cultivo, viaja a la misma velocidad que el flujo de entrada, por lo cual no se requiere un sistema de extracción por vacío como en el método tradicional.

Las bombas de jeringa de micro infusión son muy utilizadas para controlar el flujo de líquidos en sistemas microfluídicos para diversas aplicaciones. Sin embargo, existen dos limitaciones principales. A una velocidad de flujo bajo, cerca del límite de la bomba, el motor a pasos de la bomba de micro infusión genera oscilaciones en el flujo. Los pasos mecánicos del motor producen pulsos en el pistón y éste a su vez provoca la oscilación en el flujo [41].

Los motores de pasos que emplean las bombas pueden ser controlados para velocidades de flujo muy lentos, pero el movimiento instantáneo del rotor resulta en un pulso hidrodinámico que puede producir flexión del cubreobjetos (que se utiliza para depositar las células a estudiar) o desalojar las células del recipiente utilizado. Bombas de perfusión avanzadas cuentan con motores de corriente directa regulados, acoplados a una transmisión “reductora” llevando a una rueda de eje equipado con un control de velocidad. El resultado es un perfil de flujo que es libre de pulsaciones espontáneas típicas de una bomba peristáltica. En la elección de un sistema de entrega de perfusión, se debe considerar la velocidad de flujo deseado, uniformidad de flujo sobre varias escalas de tiempo, y volumen total entregado, así como la calidad del flujo [42].

Para mantener constante la tasa de flujo, empleamos dos bombas de micro-infusión marca WPI modelo SP210IW y marca NE-300 JUST INFUSION, las cuales mueven el émbolo de la jeringa a presión constante. El rango de flujo depende del diámetro de la jeringa que se utilice, la bomba marca WPI modelo SP210IW maneja flujos en un rango de 0.001 μ l/h-2.203 ml/min con una jeringa de 1 ml. Para la bomba marca NE-300 JUST INFUSION el rango de flujo es de 0.73 μ l/h-39.27 ml/h con una jeringa de 1 ml. Las bombas se calibran de acuerdo al diámetro y tipo de jeringa empleada (ver anexo 2).

4.3 Caracterización del flujo de micro perfusión por medio de fluorescencia.

Para el registro de la actividad celular es necesario conocer tanto el momento preciso como el intervalo de tiempo en que la sustancia utilizada para estimular está en contacto con las células, así como conocer a qué tasa de flujo se logra una perfusión adecuada y constante para las células. En el dispositivo se probaron diversas velocidades de flujo para infusión de células, observando las velocidades que no desprendieran el agregado de su zona de cultivo y aquéllas en donde no se generaran tantas burbujas. De esta manera, se encontró que el rango que funcionaba mejor para el arreglo experimental propuesto se encuentra entre 5[$\mu\text{l}/\text{min}$] - 150 [$\mu\text{l}/\text{min}$] que son flujos de perfusión muy bajos comparados con los sistemas de perfusión macros y abiertos. A perfusiones por arriba de 150 [$\mu\text{l}/\text{min}$] se observó que las células se desprenden fácilmente de la superficie del PDMS e incluso se puede afectar la viabilidad o vida de la célula.

Por experimentos previos realizados mediante cultivos en cajas Petri, se estableció que la permanencia de la sustancia (contacto con las células) debe de ser de 30 segundos como máximo, de lo contrario las células se empiezan a desensibilizar a la sustancia estimulante. Para caracterizar este tiempo de permanencia con los rangos de flujo arriba mencionados empleamos una entrada de agua, y una de FITC, así como el arreglo de microscopía de fluorescencia mencionado en la sección 4.1. En la bomba WPI colocamos una jeringa con agua y en la bomba NE-300 colocamos una jeringa con FITC. Previo al registro se procede a purgar las jeringas para eliminar cualquier acumulación o ingreso de aire (burbujas).

Este procedimiento consiste en lo siguiente:

El flujo de ambas bombas se establece como (5 [$\mu\text{l}/\text{min}$] -150[$\mu\text{l}/\text{min}$].). Primero se hace fluir agua durante 10 segundos, al finalizar el tiempo se detiene el flujo de agua y se hace fluir fluoresceína por 20 segundos, pasando este tiempo el flujo de

la fluoresceína se detiene y se comienza nuevamente el flujo de agua hasta el término del registro.

Con la ayuda del software Image-Pro-Express recopilamos imágenes realizando un video clip del procedimiento; definimos una captura de 200 imágenes con un intervalo de captura de 300 [ms]. A través de este registro óptico podemos calcular el tiempo de residencia o permanecía de sustancias en el pozo de cultivo en este caso FITC (tiempo de estimulación por la sustancia). También a través de este registro se puede calcular y caracterizar el tiempo de retraso en el arribo de FITC al pozo para saber a partir en qué instante se empieza a contar la estimulación de la sustancia en cuestión (ver figura 4.5). Para conocer el intervalo de tiempo se emplea la siguiente ecuación:

$$N_i \times t_c = t_t \dots \dots \dots (3)$$

Donde N_i es el número de imágenes obtenidas; t_c es el tiempo de captura y t_t es el tiempo total del experimento ($200 \times 300[\text{ms}] = t_t$).

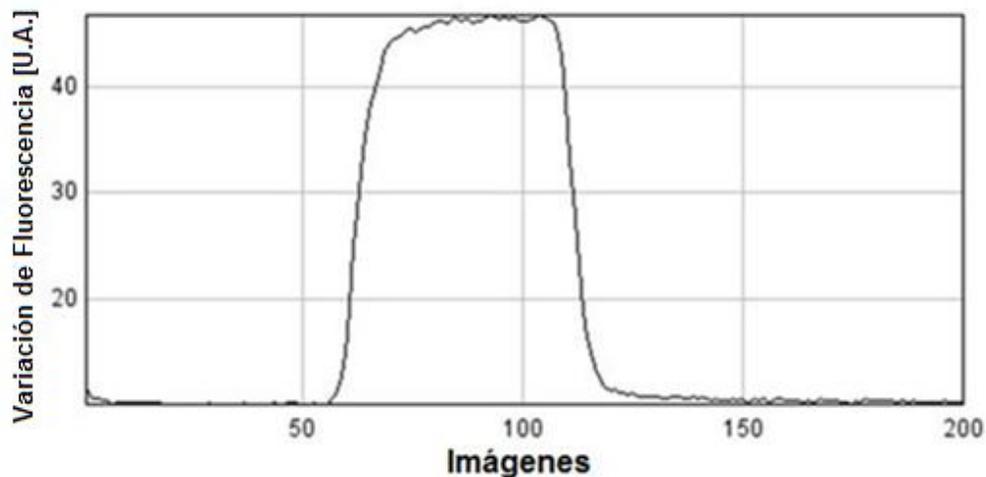


FIGURA 4.5. En esta figura se observa cómo el FITC ingresa formando un pico de intensidad luminosidad de 40 unidades arbitrarias (u.a), que posteriormente desciende rápidamente.

Para graficar los valores de fluorescencia obtenidos, utilizamos el software libre ImageJ, este programa asigna un valor 0 cuando no hay presencia de fluorescencia y 255 cuando está totalmente iluminado, con lo que podemos obtener fácilmente una gráfica de la Variación de fluorescencia contra el número de imágenes.

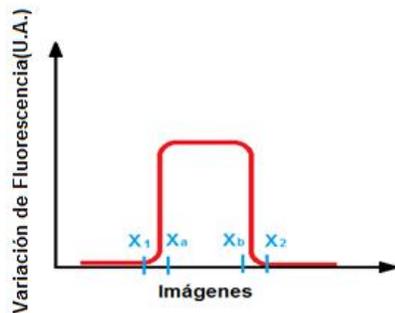
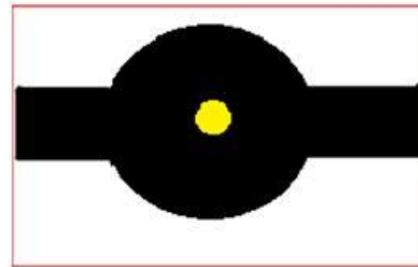


Figura 4.6a. Ejemplificación de los puntos de referencia de las mediciones.



b. Dentro del pozo de cultivo se señala en amarillo el área de medición.

Para analizar las gráficas se eliminan los tiempos transitorios y se toma en cuenta sólo el tiempo estable de la iluminación (X_a y X_b) que se esquematiza en la figura 4.6a. Con estos datos se puede obtener el tiempo de permanencia de la fluoresceína en el pozo. Dicha medición se realiza en la parte central del pozo de cultivo celular como se muestra en la figura 4.6b.

Se realizaron varias mediciones en este punto (ver Anexo 3) obteniendo que el tiempo de residencia de fluoresceína en el pozo es de 16.7 [s] a un flujo de 10[μ l/min], estando por debajo de los 30 segundos requeridos en un inicio. La tabla de datos (Anexo 3) muestra que el tiempo de arribo de la fluoresceína es de 16.4 [s] en promedio con un tiempo transitorio muy rápido de 1.2 [s] en promedio.

Para tener una mejor visión del procedimiento se utiliza una plantilla del programa IGOR Pro, con el cual podemos remover el ruido de fondo para obtener solamente el valor de la respuesta producida por el fluoróforo. Obtenemos 1 gráfica donde se representa el tiempo en segundos contra intensidad luminosa (sin ruido de fondo) figura 4.7.

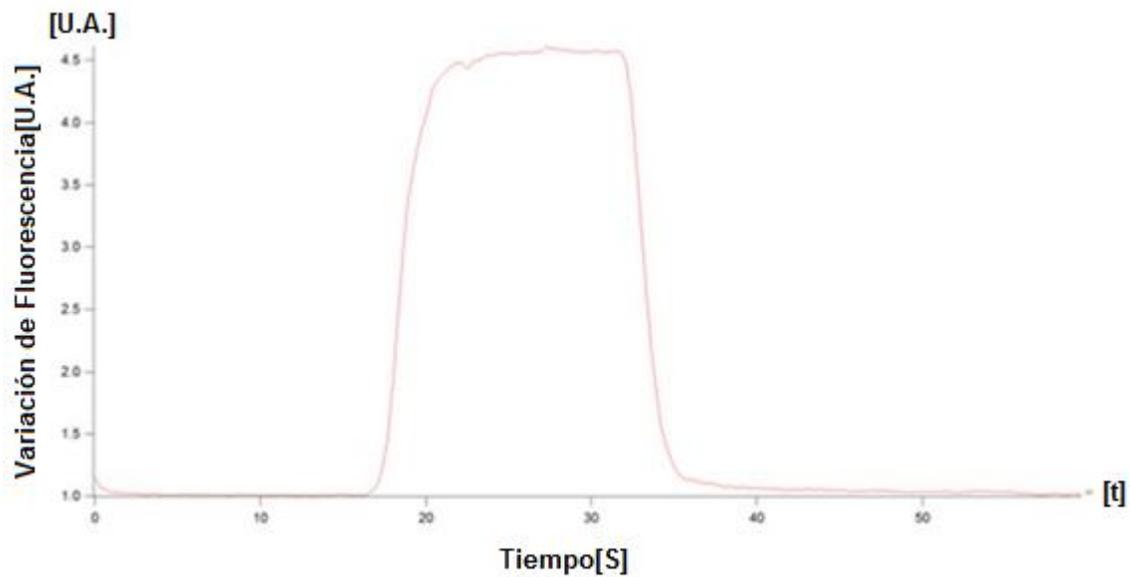


Figura 4.7. Gráfica con flujo a 10[μ l/min]; tiempo en segundos contra intensidad luminosa (sin ruido de fondo) en unidades arbitrarias.

CAPÍTULO 5

Cultivo y registro de la actividad celular por microscopía de fluorescencia

En este capítulo se describen los protocolos adaptados de cultivo y registro de actividad celular, que se realizan empleando el dispositivo microfluídico que se describió anteriormente.

Previo al registro se coloca el recipiente (micro dispositivo, caja Petri, etc.) con el cultivo de células, el cual estuvo en la incubadora dentro de una caja Petri de vidrio pyrex con tapa. El recipiente con el cultivo de células (muestra biológica) se coloca sobre una platina en el microscopio con una temperatura regulada de ($\sim 37^\circ$) para mantener con vida las células, sobre la platina se revisa el cultivo (sin destapar la caja Petri para no contaminar la muestra biológica) y se observa que exista presencia de actividad celular. Si el o los agregados presentan contracciones espontáneas significa que hay presencia de actividad celular. Cuando el recipiente con cultivo no es utilizado, se debe regresar a la incubadora para mantener la muestra biológica viva y evitar contaminación. Si el cultivo es viable, se incorpora el fluoróforo (Calcium Green) mediante micro infusión por aproximadamente un minuto, después se detiene el suministro y se deja reposar durante 20 minutos para que las células absorban el fluoróforo. Durante este periodo se prepara todo el equipo a utilizar, el sistema de perfusión, el cual suministrará todas las soluciones salinas de manera continua, se inicializa el software y se programan el intervalo de imágenes, cantidad de imágenes y tiempo de adquisición. Posteriormente se realiza un lavado del fluoróforo por medio de la perfusión con una solución salina (Hanks) y se observa la muestra bajo el microscopio de fluorescencia enfocando la zona que se desea registrar, ajustando la distancia focal de la cámara. Si no se distingue lo suficiente la fluorescencia en la muestra, se incuba durante unos minutos más hasta alcanzar la intensidad

deseada. Habiendo revisado todos estos factores, se procede a realizar los protocolos de registros.

5.1 Procedimiento de cultivo celular

El procedimiento de cultivo celular fue realizado por las Químicas Farmacéuticas Biólogas María Alicia Falcón Neri y Araceli Torres Pérez; Técnicas Académicas asociadas al Taller de Biofísica y colaboradoras del proyecto. El cultivo celular se realizó siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente (ver sección 2.1) el cual resulta en agregados de cardiomiocitos con actividad espontánea.

Después de cultivar las células por 24 horas en la incubadora se saca la caja Petri que contiene el micro-dispositivo (sin abrir la caja Petri) de la incubadora, verificamos bajo el microscopio si hay agregados que tengan contracción celular; después de haber verificado su contracción se regresan a la incubadora para mantener su viabilidad. Realizamos la conexión del sistema de perfusión, calibramos las dos bombas para el flujo de 5[μ l/min] y se monta el experimento tal y como se describió en el capítulo 4.

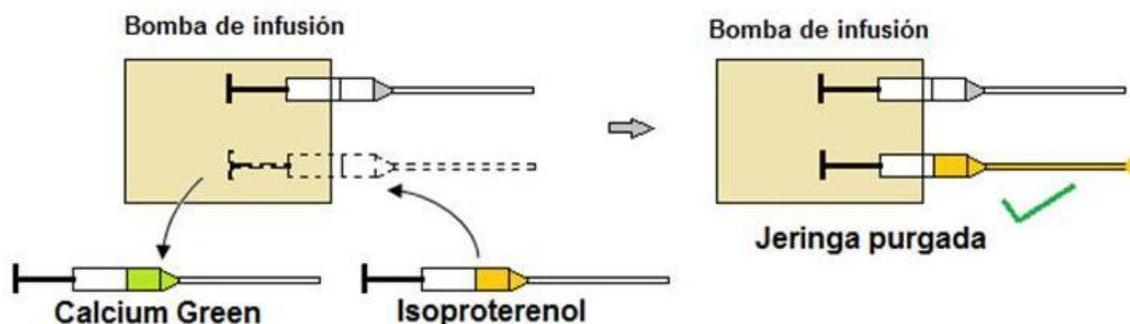


Figura 5.1. Diagrama que muestra el intercambio de jeringas y el purgado de jeringas (dejando una gota al final del tubo de perfusión).

Se cargan las jeringas con Hanks (solución salina ver anexo 4), Calcium Green e Isoproterenol, el cual es un agonista de los receptores β_1 y β_2 (ver sección 1.2), respectivamente.

La bomba WPI se deja sólo cargada con Hanks y en la bomba NE-300 se intercambiaran las jeringas con Calcium Green y la jeringa con Isoproterenol, según se utilice como se muestra en la figura 5.1.

Sabemos por pruebas anteriores que al desconectar un tubo de perfusión (conectado al micro-dispositivo) de una jeringa y conectar un tubo de otra jeringa se introduce aire formando burbujas, cuyas consecuencias resultan catastróficas tanto para lograr una velocidad uniforme de perfusión, como para la vida de las células. Para evitar que se formen burbujas en cada cambio de sustancia, se purga el tubo de la jeringa que se conecta al micro-dispositivo haciendo fluir el líquido hasta que el aire es retirado y sólo queda líquido contenido en las tuberías.

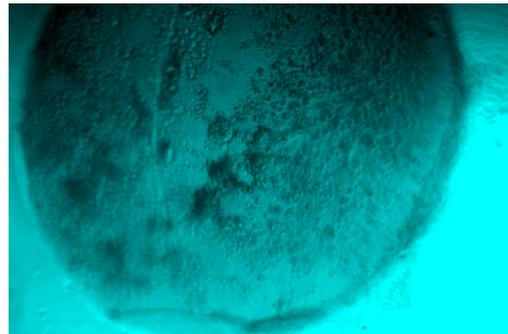
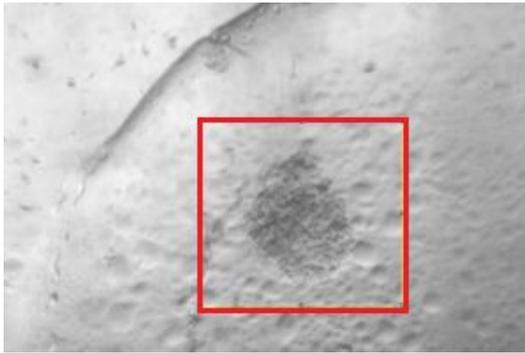


FIGURA 5.2 a. En esta imagen podemos visualizar una monocapa dentro del recuadro.

b. Imagen de una sección del pozo de cultivo.

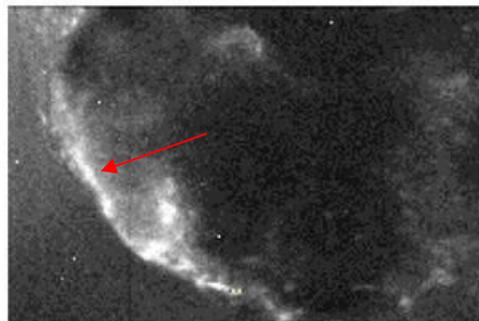


Figura 5.3. En esta imagen se muestra la actividad mediante fluorescencia (en blanco) una monocapa de cardiomiocitos.

Se perfundió una dilución de Calcium Green (a un flujo de 5[μ l/min]) durante 1 minuto, posteriormente se deja reposar por un lapso de 25 minutos para que las células absorban el colorante que nos permitirá observar las reacciones a calcio de las células. Transcurrido el tiempo se enfoca un área que abarque la mayoría del tejido, como se ve en las figuras 5.2a y 5.2b, para asegurar que el área de interés sea iluminada por la luz de la lámpara de mercurio.

Las zonas iluminadas en blanco son células teñidas con el fluoróforo; si estas células presentan contracción hay liberación de calcio y la célula se ilumina de manera intermitente de blanco como en la figura 5.3. A continuación se realiza un lavado del Calcium Green perfundiendo Hanks (solución salina), durante la perfusión con Hanks se graba el estado basal de las células. Al término de la grabación del estado basal se hace fluir Isoproterenol a un flujo de 5[μ l/min] por 120 [s] que es el periodo que dura la grabación (se inicia la grabación desde que se inicia el flujo de Isoproterenol). Finalmente se hace fluir Hanks para poder observar el comportamiento celular posterior a la aplicación de Isoproterenol. En total se obtienen 3 grabaciones: el estado basal (con Hanks), el estado excitado o estimulado (con Isoproterenol) y el estado post estimulación o recuperación (después del lavado final).

5.2 Resultados del experimento con células de cardiomiocitos

Para el análisis de las imágenes obtenidas se utiliza de nuevo el software libre ImageJ. Se delimita el área o región de interés (ROI) desde 1 pixel hasta la imagen completa buscando las zonas que tengan más contracción. Para obtener una gráfica más representativa se selecciona un área de pocos pixeles, como se muestra en la figura 5.4. Este programa gráfica la intensidad de fluorescencia contra el número de imágenes adquiridas de la ROI. Conocemos el intervalo entre cada imagen por lo que es fácil calcular el tiempo transcurrido en cualquier momento del experimento, como se explicó en la ecuación 3 de la sección 4.3, de tal manera que se post procesan los datos empleando el software Origin. Este post

procesamiento consiste en la eliminación de la tendencia de la señal y del ruido óptico de fondo (restando la intensidad de luz sin fluorescencia a todos los valores) de la gráfica. Finalmente se grafican estos datos empleando IGOR-Pro para visualizar el comportamiento de dicho agregado. En la figura 5.5 se observa la gráfica del comportamiento basal de la ROI.

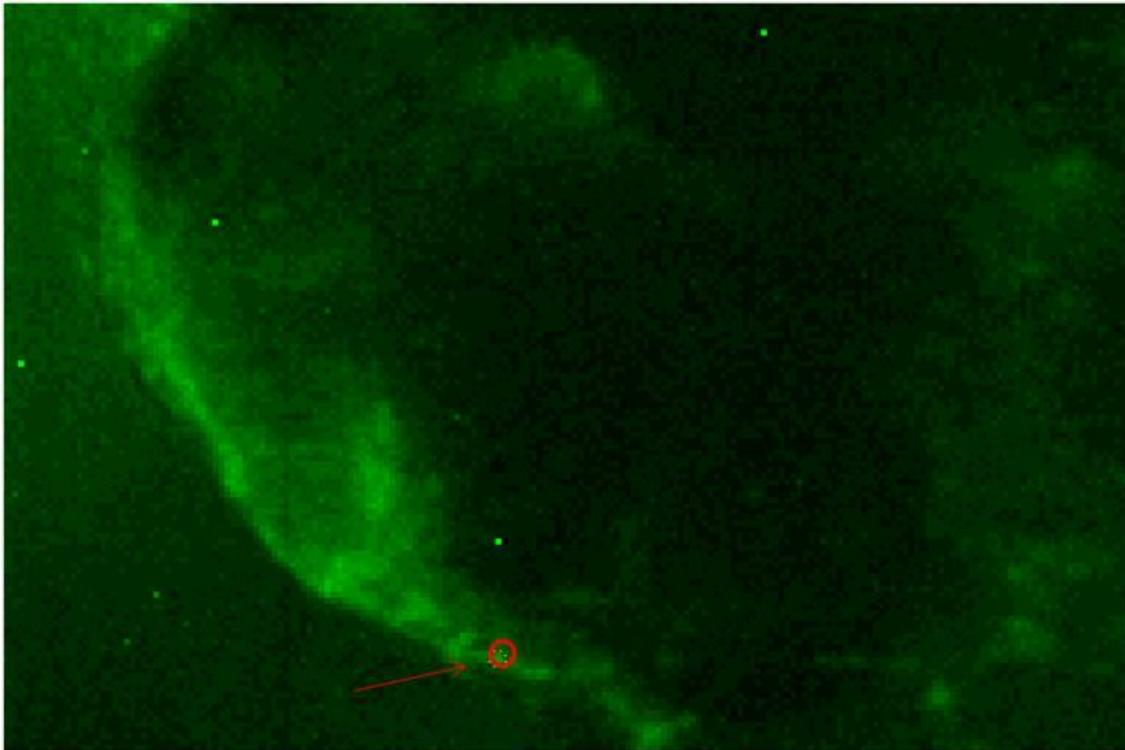


Figura 5.4. Imagen de una mono capa en la cual se señala con una flecha el área seleccionada para graficar.

Esta gráfica nos muestra la frecuencia de contracción natural o inicial de las células (estado basal con perfusión de Hanks), previa al ingreso del estímulo. De la figura 5.5 podemos obtener el intervalo interpulso que sirve de referencia para comparar el efecto del estímulo adrenérgico. El intervalo interpulso promedio es de 4.2231 [s] con una desviación estándar de 1.5466 (ver Anexo 5).

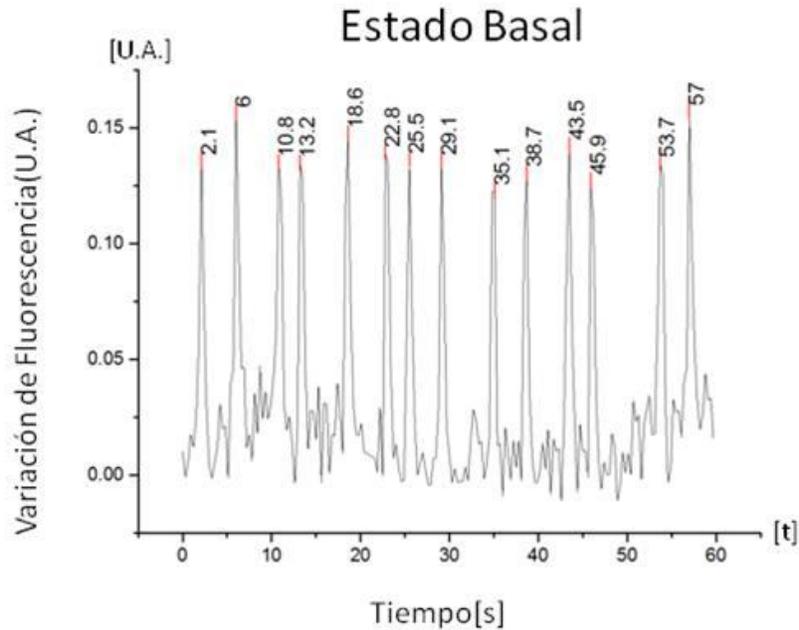


Figura 5.5. Se muestra la gráfica del estado basal y el Intervalo interpulso de la monocapa de cardiomiocitos.

Posteriormente se perfunde el agente adrenérgico Isoproterenol. El efecto en la actividad de la monocapa de cardiomiocitos producida por el ingreso del Isoproterenol se observa en la figura 5.6. El intervalo Interpulso promedio que se obtiene en esta etapa es de 1.9 [s] y su desviación estándar es de 0.506509 (ver Anexo 6) con lo que se puede observar un cambio en la señal con respecto a la figura 5.5 correspondiente al estado basal. Con esto podemos decir que hay una respuesta clara a la presencia del Isoproterenol durante los 60 segundos que dura la exposición al agente bioquímico, introducido por la plataforma microfluídica de perfusión y estimulación.

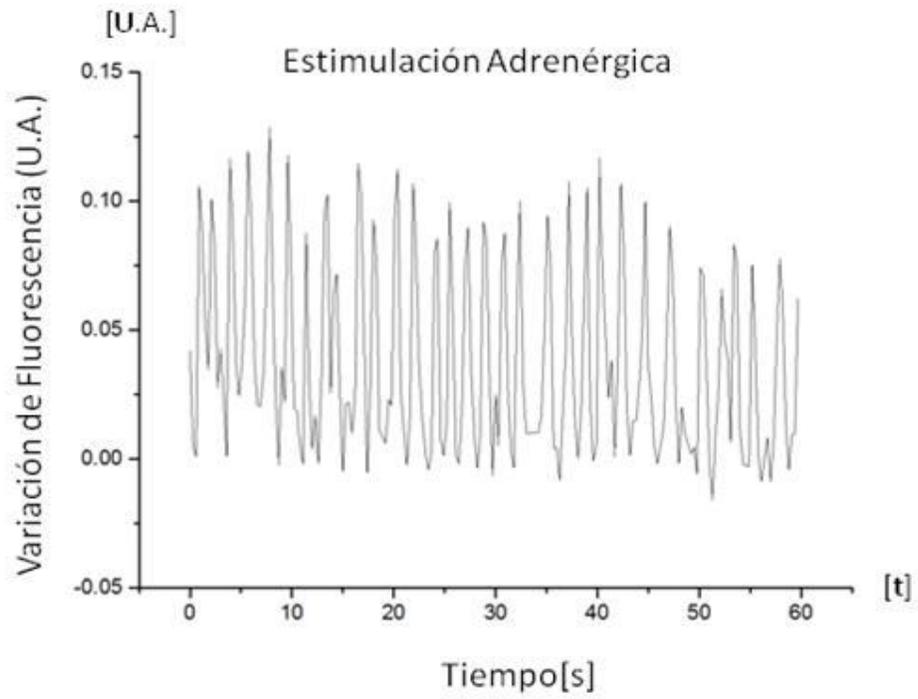


Figura 5.6. En la gráfica se muestra la reacción de la mono capa al Isoproterenol (estimulación adrenérgica).

CAPÍTULO 6

Análisis de resultados y conclusiones

Se logró fabricar un dispositivo para cultivo celular con sistema de perfusión y excitación microfluídico, utilizando una técnica de creación del molde basada en láminas de poliestireno termoplástico, comercialmente conocidas como *Shrinky Dinks*, que permite replicar micro plataformas de PDMS de una forma económica y de fácil acceso para investigación y docencia.

Se midió la topografía del micro-dispositivo empleando el sistema MSA-400 Polytec que incluye un método no invasivo de interferometría de luz blanca, y se obtuvieron los siguientes valores:

	Pozo				Canal
	Sección A	Sección B	Sección C	Sección D	
Ancho	482 [μm]	578 [μm]	455 [μm]	455 [μm]	673 [μm]
Profundidad	68[μm]	93 [μm]	78 [μm]	de 55 [μm]	57 [μm]

Tabla 3 Mediciones del pozo en sus diferentes secciones y del micro canal de perfusión.

El molde se diseñó con las siguientes medidas: dos canales de entrada de 0.3 [cm] de longitud, un canal principal con longitud de 1.55 [cm]. En la parte central del canal principal se ubicó el pozo circular de cultivo de 0.8 [mm]. Se realizaron las réplicas del molde en polímero elastomérico PDMS que se sabe es biocompatible, tiene capacidad de replicar hasta nanómetros, es flexible y ópticamente transparente. Se selló el sistema de micro canales y pozo con otra capa delgada de PDMS, activando las superficies por medio del efecto corona para mejorar las propiedades de adhesión de superficies.

Se implementaron las interfaces de conexión micro-macro y macro-micro, a la entrada y salida de los fluidos respectivamente, estas interfaces se hicieron con

cuadrados de 0.25[cm] de lado y en el centro orificios. Una vez insertadas las células dentro del micro-dispositivo y efectuado el protocolo correspondiente para el cultivo de células, se sella la entrada de alimentación empleando Agar al 10%.

Se implementó un sistema de bombeo externo con jeringas de infusión. Se caracterizó el flujo de perfusión por medio de microscopía de fluorescencia. A través de este registro óptico, se calculó el tiempo de residencia o permanecía de las sustancias que ingresan al micro-dispositivo para arribar al pozo de cultivo, lo que equivaldría al tiempo que tardaría la sustancia estimulante en estar en contacto con las células; resultando en promedio 16.7 [s] a un flujo de 10[μ l/min] y un tiempo transitorio promedio de 1.2 [s].

Se demostró que el micro-dispositivo es viable para albergar un cultivo celular, introduciendo al pozo de cultivo células embrionarias de corazón de pollo, las cuales después de 24 horas formaron mono-capas en diversas áreas del pozo y se les estimuló mediante micro-perfusión de un agente adrenérgico, Isoproterenol, observando una respuesta que se refleja en el cambio de la frecuencia de contracción de la monocapa. Con esto demostramos que es factible mantener un flujo controlado a micro escala que posibilita cultivos celulares viables y realizar cambios de soluciones de interés con su respectivo lavado post-estimulación.

CONCLUSIONES

En este trabajo se describió el diseño, fabricación e implementación de un micro-dispositivo con canales de perfusión microfluídicos para implementarlo en cultivo de células excitables (cardiomocitos), de los resultados que se obtuvieron se puede concluir lo siguiente:

Se escaló satisfactoriamente a micro-escala el sistema de cultivo celular que se utiliza en el Laboratorio de Biofísica de Sistemas Excitables Extendidos de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se implementó un sistema de perfusión microfluídica controlado por 2 bombas de micro-infusión lo que nos permitió obtener flujos de $5[\mu\text{l}/\text{min}]$ durante el cultivo. El tiempo de residencia de una sustancia en el pozo de cultivo, medido a través de la detección de fluoresceína, es de $16.7 [\text{s}]$ a un flujo de $10[\mu\text{l}/\text{min}]$ estando por debajo de los 30 segundos caracterizados en un sistema macroscópico convencional. Sin embargo, a flujos más altos que pudieran presentar tiempos de residencias mayores, las células eran arrastradas por la perfusión, imposibilitando su estudio. Es así que a una tasa de $10[\mu\text{l}/\text{min}]$ el tiempo de arribo de la fluoresceína es de $16.4 [\text{s}]$ en promedio con un tiempo transitorio de $1.2 [\text{s}]$ en promedio. Se mejoraron los tiempos que se obtenían en un cultivo a macro escala pasando de $30 [\text{s}]$ a $16.7 [\text{s}]$ en promedio.

Es importante enfatizar que esta micro plataforma permite disminuir recursos tanto en células como en reactivos e insumos. Un cultivo tradicional emplea 30 embriones de pollo y $10 [\text{ml}]$ de solución salina Hanks con el micro dispositivo actualmente se emplean 15 embriones y como máximo $1 [\text{ml}]$ de solución salina.

Cuando se realizaron las pruebas para evaluar la respuesta de los agregados de cardiomocitos, se demostró mediante registros ópticos de fluorescencia que se incubaron muestras viables en el dispositivo, se logró una estimulación celular mediante el flujo de micro-perfusión en los tiempos requeridos menores a $30[\text{s}]$. El

micro dispositivo cuenta con las bases para realizar un registro completo para obtención de resultados en sistemas celulares.

TRABAJO FUTURO

Esta técnica se puede mejorar considerablemente para obtener resultados más significativos. Algunos de los problemas a resolver y mejorar en este dispositivo son:

Disminuir la formación de burbujas: Cuando se realiza un intercambio de líquidos se interrumpe el flujo continuo dentro del micro canal, lo cual introduce aire que puede llevar a la formación de burbujas. De tal forma que dentro de las tuberías y micro-canales se forman burbujas que ponen en riesgo la viabilidad de la muestra celular, modificando y obstruyendo el flujo del medio de cultivo o reactivos. La presencia de burbujas también provoca un cambio en la dirección de la luz lo que trae como consecuencia que el foco óptico sea distinto al inicial. Este problema puede resolverse mediante el uso de bombas de infusión programables que controlen desde una computadora los intercambios de líquidos mediante flujo, también se puede posicionar un fluido en una región en específica, debido al comportamiento laminar que se presenta a estas dimensiones o introduciendo en el diseño de la micro plataforma trampas de aire.

Inserción y confinamiento de células: Actualmente las células se ingresan con ayuda de una pipeta por un orificio central, se debe de trabajar en un método de inserción de células que reduzca los esfuerzos sobre las células ya que esto es de suma importancia para que las células se mantengan en buenas condiciones. El confinamiento debe ser mejorado mediante la construcción de andamios o barreras que filtren y mantengan las células en lugares específicos para su observación y se puedan generar agregados tridimensionales.

Control de temperatura: Con la adición de un sistema de temperatura controlada en el micro dispositivo, se puede monitorear el cultivo en sus diferentes etapas sin la necesidad de ingresarla a una incubadora convencional, con esto se lograría incrementar la portabilidad del dispositivo y aumentaría las capacidades experimentales.

Adición de micro-electrodos: En el dispositivo se pueden agregar micro-electrodos para estimulación y sensado del campo del potencial de acción de las células inmersas en el pozo de cultivo. Esto permitiría efectuar electrofisiología en el chip, realizando mediciones no invasivas y de mayor precisión.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de Limpieza

Cajas Petri

- Se lavan con solución de hidróxido de sodio (*Extran MA 01 marca MERCK*) y se enjuagan posteriormente con agua desionizada.
- Se vierte isopropanol hasta la mitad de las cajas y se colocan dentro de un baño ultrasónico (*3510 BRANSON*) por 15 minutos.
- Se retiran del baño y se enjuagan con agua desionizada (para retirar residuos de isopropanol).
- Se secan con aire comprimido filtrado.
- Si se cuenta con un horno, es deseable secarlos por al menos media hora a 80°C

Limpieza de Cristalizador

- Se lava con solución de hidróxido de sodio (*Extran MA 01 marca MERCK*) y se enjuagan posteriormente con agua desionizada.
- Se vierte Acetona hasta la mitad y se coloca dentro del baño ultrasónico por 15 minutos. Se repite la operación con Isopropanol para retirar residuos de Acetona.
- Posteriormente se enjuagan con agua desionizada (para retirar residuos de isopropanol).
- Se secan con aire comprimido filtrado.
- Si se cuenta con un horno, es deseable secarlos para al menos media hora a 80°C.

Limpieza de Moldes

- En un cristalizador (previamente limpio) se colocan los moldes.
- Se vierte isopropanol hasta cubrirlos.

- Se colocan el cristalizador (con los moldes) dentro del baño ultrasónico por 15 minutos.
- Se retiran el cristalizador del baño, se enjuagan los moldes con agua desionizada.
- Se secan con aire comprimido filtrado.
- Importante considerar que no se debe vestir Acetona sobre los moldes ya que este solvente disuelve el poliestireno y el PDMS

Limpieza de la base de vidrio

- La base de vidrio se lava con solución de hidróxido de *sodio (Extran MA 01 marca MERCK)* y se enjuagan posteriormente con agua desionizada.
- Con aire comprimido secamos el recuadro de vidrio.

Limpieza de Réplicas

- Se lava el exterior de la réplica con Alcohol Etílico (marca Morelos, sin desnaturalizar) al 70%.
- Con ayuda de una jeringa y un tubo de perfusión se hace pasar Alcohol etílico al 70% al interior de los canales de la réplica a través de cada uno de los orificios de entrada de perfusión.
- Se colocan en un cristalizador (limpio).
- Se vierte Alcohol al 70% hasta cubrirlas
- Se coloca el cristalizador (con las réplicas) dentro baño ultrasónico por 15 minutos.
- Se retira el cristalizador del baño ultrasónico y se enjuagan las réplicas con agua desionizada.
- Se secan las réplicas con aire a presión.

Anexo 2. Tablas de calibración de las bombas de micro infusión

Bomba SP200 Series Syringe Pumps

Table 1 SYRINGE DIAMETERS

(1) Air tite “All plastic”		(6)Ranfac	
1cc	4.70[mm]	2cc	9.12[mm]
2.5	9.70	5	12.34
5.0	12.48	10	14.56
10	15.89	20	19.86
20	20.00	30	23.20
30	22.50	50	27.60
50	28.90		
		(7)Scientific Glass Engineer	
(2)Becton Dickinson		SGE	
Interim, WW design, Plastipak		25ul	0.73[mm]
<u>1cc</u>	<u>4.70[mm]</u>	50	1.03
3	8.79	100	1.46
5	11.99	250	2.30
10	14.48	500	3.26
20	19.05	1[ml]	4.61[mm]
30	21.59	2.5	7.28
60	26.60	5	10.30
		10	14.57
(3)Bacton Dickson			
Glass-alltypes		(8)Sherwood-Monojet Plasic	

0.5cc	4.64[mm]	1cc	4.65[mm]
1	4.64	3	0.94
2.5	8.66	6	12.70
5	11.86	12	15.90
10	14.34	20	20.40
20	19.13	35	23.80
30	22.70	50	26.60
60	28.60		

Syringe diameters and Rate Limits

Model: NE-300 syringe pump

Syringe Manufacturer	Syringe (cc)	Inside Diameter (mm)	Maximum Rate (mL/hr)	Minimum Rate (µl/hr)
B-D	1	4.699	39.27	0.73
	3	8.585	131	2.434
	5	11.99	255.6	4.748
	10	14.43	370.3	6.876
	20	19.05	545.4	11.99
	30	21.59	829	15.4
	60	26.59	1257	23.35

Bomba SP200 Series Syringe Pumps

Syringe size	Minimun	Maximun
10 µl	0.001 µl/h	22.98 µl/min
25 µl	0.001 µl/h	60.68 µl/min
50 µl	0.001 µl/h	105.8 µl/min
100 µl	0.001 µl/h	212.6 µl/min
250 µl	0.001 µl/h	527.6 µl/min
500 µl	0.001 µl/h	1.06 ml/min
1 ml	0.001 µl/h	2.203 ml/min
2.5 ml	0.001 µl/h	5.28 ml/min
3 ml	0.001 µl/h	7.36 ml/min
5 ml	0.001 µl/h	14.33 ml/min
10 ml	0.001 µl/h	20.91 ml/min
20 ml	0.001 µl/h	36.19 ml/min
30 ml	0.001 µl/h	46.49 ml/min
60 ml	0.001 µl/h	70.57 ml/min

Anexo 3. Tabla de la caracterización del flujo en el micro-dispositivo.

Flujo [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Xa número de Diapositivas	Xb número de Diapositivas	X1 número de Diapositivas	X2 número de Diapositivas	Tiempo de fluorescencia (x2-x1)(0.300) [s]	Tiempo en el pozo (xb-xa)(.300) [s]	Tiempo de llegada de la fluoresceína (X1*0.3)[s]	Tiempo transitorio de subida((Xa-X1)*0.3) [s]	Tiempo transitorio de bajada((X2-Xb)*0.3) [s]
10	57	115	53	128	22.5	17.4	15.9	1.2	3.9
10	58	114	54	131	23.1	16.8	16.2	1.2	5.1
10	61	114	57	130	21.9	15.9	17.1	1.2	4.8
35	53	107	49	116	20.1	16.2	14.7	1.2	2.7
35	53	107	49	116	20.1	16.2	14.7	1.2	2.7
35	53	107	49	116	20.1	16.2	14.7	1.2	2.7
75	51	111	48	114	19.8	18	14.4	0.9	0.9
75	50	108	46	112	19.8	17.4	13.8	1.2	1.2
75	52	108	48	113	19.5	16.8	14.4	1.2	1.5
150	48	107	44	112	20.4	17.7	13.2	1.2	1.5
150	49	105	45	108	18.9	16.8	13.5	1.2	0.9
150	48	106	45	109	19.2	17.4	13.5	0.9	0.9

	Información de flujo a 10[μl/min]
	Información de flujo a 75[μl/min]
	Información de flujo a 10[μl/min]
	Información de flujo a 10[μl/min]

De los valores obtenidos en la tabla anterior podemos encontrar el número de diapositivas en la que se detecta fluorescencia, así como el número de diapositivas en la que se deja de detectar la fluorescencia (X_1 y X_2 respectivamente). También podemos encontrar el número de diapositivas en donde la fluorescencia es estable y hasta que empieza a disminuir la fluorescencia (como se visualiza en la figura 35 a). Sabiendo estos valores y el tiempo entre cada diapositiva podemos determinar los siguientes datos de la tabla: Tiempo de Fluorescencia (TF), Tiempo en el pozo (TP), Tiempo de Llegada de la Fluoresceína (TLF), Tiempo Transitorio de Subida (TTS) y el Tiempo Transitorio de Bajada (TTB).

$$TF = (X_1 - X_2) \times (0.300)$$

$$TP = (X_b - X_a) \times (0.300)$$

$$TLF = (X_1) \times (0.300)$$

$$TTS = (X_a - X_1) \times (0.300)$$

$$TTB = (X_2 - X_b) \times (0.300)$$

Anexo 4. Solución de Hanks

Compuest o	Concentra ción(Mm)	P.M.	(g)
NaCl	125	58.4	3.653
KCl	0.9	78.6	0.03354
NaHCO ₃	3.6	84	0.151
Na ₂ HPO ₃	0.3	142	0.0213
KH ₂ PO ₄	0.4	136.1	0.0272
MgCl ₂	0.5	203.3	0.0508
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.4	246.5	0.0493
Glucose	10	180.1 6	0.901
Sucrose	2.9	342.3	0.496
Hepes	9.9	110.9 9	1.180
CaCl ₂ H ₂ O	3.9	129.9 9	0.1996

- a) Disolver los polvos en 400[ml] de agua estéril
- b) Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N llevar al aforo a 500[ml]
- c) Filtrar dentro de la campana.

Anexo 5. Tabla donde se muestra el intervalo inter-pulso del estado Basal.

Estado Basal	
Segundos	Intervalo entre pulsos
2.1	
6	3.9
10.8	4.8
13.2	2.4
18.6	5.4
22.8	4.2
25.5	2.7
29.1	3.6
35.1	6
38.7	3.6
43.5	4.8
45.9	2.4
53.7	7.8
57	3.3

Anexo 6. Tabla donde se muestra el intervalo inter-pulso de la estimulación Adrenérgica.

Estimulación Adrenérgica	
Segundos	Intervalo entre pulsos
0.9	
2.1	1.2
3.9	1.8
5.7	1.8
7.8	2.1
9.6	1.8
11.4	1.8
13.5	2.1
14.4	0.9
16.5	2.1
18	1.5
20.4	2.4
21.9	1.5
24.3	2.4
25.5	1.2
27.3	1.8
28.8	1.5
30.9	2.1
32.4	1.5
35.1	2.7
37.2	2.1
39	1.8
40.2	1.2
42.3	2.1
44.7	2.4
47.1	2.4
50.1	3
52.2	2.1
53.4	1.2
55.2	1.8
57.9	2.7

BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Berthier, E. W. K. Young, and D. Beebe, "Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia.," *Lab on a chip*, Feb. 2012.
- [2] J. Voldman, M. L. Gray, and M. a Schmidt, "Microfabrication in biology and medicine.," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 1, pp. 401–25, Jan. 1999.
- [3] C. and M. Huang, "The Scale of the Universe 2," 2012. [Online]. Available: <http://htwins.net/scale2/lang.html>. [Accessed: 25-Jun-2013].
- [4] Y. Ben, P. L. Bergstrom, M. Gad-el-Hak, and et. al, *The MEMS Handbook: MEMS Applications*, Second Edi. Mohamed Gad-el-Hak, 2006.
- [5] N. Maluf and K. Williams, *An Introduction to Microelectromechanical Systems Engineering*, Second Edi. Norwood, USA, 2004.
- [6] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press, First published 2008, p. 346.
- [7] B. Vazquez Sanchez, "Implementación de un sistema láser para la detección continua de fluorescencia dentro de micro gotas," Tesis de Maestría en Ingeniería Eléctrica -Sistemas Electrónicos Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2012.
- [8] Y. A. Cengel and J. M. Cimbala, *Mecánica de Fluidos Fundamentos y Aplicaciones*. McGraw-Hill 2006.
- [9] N. Korin, A. Bransky, M. Khoury, U. Dinnar, and S. Levenberg, "Design of well and groove microchannel bioreactors for cell culture.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 102, no. 4, pp. 1222–30, Mar. 2009.
- [10] R. Bashir, "BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 56, no. 11, pp. 1565–86, Sep. 2004.
- [11] M. Ni, W. H. Tong, D. Choudhury, N. A. A. Rahim, C. Iliescu, and H. Yu, "Cell culture on MEMS platforms: A review.," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10, no. 12, pp. 5411–41, Dec. 2009.
- [12] K. Gupta, D.-H. Kim, D. Ellison, C. Smith, A. Kundu, J. Tuan, K.-Y. Suh, and A. Levchenko, "Lab-on-a-chip devices as an emerging platform for stem cell biology.," *Lab on a chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2019–31, Aug. 2010.

- [13] L. Kim, Y.-C. Toh, J. Voldman, and H. Yu, "A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells.," *Lab on a chip*, vol. 7, no. 6, pp. 681–94, Jun. 2007.
- [14] P. D. Arthur C. Guyton, M.D., John E. Hall, *Tratado de fisiología Moderna*, Décima Edi. Philadelphia Pennsylvania, U.S.A.: Mc Grall Hill Interamericana editores, S.A. de C.V., 2000.
- [15] J. Jiménez Medina, "Patrones de actividad contráctil en rebanadas de corazón embrionario de pollo," Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2012.
- [16] "No Title." [Online]. Available: <http://www.flashcardmachine.com/cardiovascular-function.html>. [Accessed: 20-Apr-2013].
- [17] Beatriz Gal Iglesias, et al., *Bases de la Fisiología*, 2da edición. Madrid: Editorial Tebar S.L., 2007.
- [18] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft Lithography", *Annual Review of Materials Science*, vol. 37, no. 5, pp. 550–575, Mar. 1998.
- [19] S. Tuomikoski, "Fabrication of SU-8 microstructures for analytical microfluidic applications," Doctoral Dissertation, Helsinki University of Technology, 2007.
- [20] A. Tan, K. Rodgers, J. Murrphy, C. O'Mathuna, and J. D. Glennon, "Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying.," *Lab on a chip*, vol. 1, no. 1, pp. 7–9, Sep. 2001.
- [21] A. Grimes, D. N. Breslauer, M. Long, J. Pegan, L. P. Lee, and M. Khine, "Shrinky-Dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns.," *Lab on a chip*, vol. 8, no. 1, pp. 170–2, Jan. 2008.
- [22] J. Soto Olmos, "Inducción de Rejillas de Periodo largo en fibras ópticas mediante la aplicación de dispositivos MEMS de polímero," Tesis de Maestría en Ingeniería Eléctrica -Sistemas Electrónicos, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2011.
- [23] C. Terrón de Alba, "Efecto de dos subtratos celulares sobre la actividad espontánea de cardiomiocitos en cultivo," Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2012.
- [24] M. R. Guevara, A. Shrier, and L. Glass, "Phase-locked rhythms in periodically stimulated heart cell aggregates Phase-locked rhythms heart cell

aggregates in periodically stimulated,” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* publishes, 1988.

- [25] Berne & Levy, *Physiology*, 6th edition. Mosby Elsevier 2008.
- [26] T. Scott and M. Eagleson, “Sigma-Aldrich,” *Concise Encyclopedia: Biochemistry, 2nd Ed, Walter de Gruyter*. [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/a5054pis.pdf. [Accessed: 12-Aug-2013].
- [27] A. Macías, S. Juárez, A. Falcón, A. Torres, M. Hautefeuille, and H. González, “Low cost micro-platform for culturing and stimulation of cardiomyocyte tissue,” *24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pp. 912–915, 2011.
- [28] K. Haubert, T. Drier, and D. Beebe, “PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system.,” *Lab on a chip*, vol. 6, no. 12, pp. 1548–9, Dec. 2006.
- [29] M. a Eddings, M. a Johnson, and B. K. Gale, “Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 18, no. 6, p. 067001, Jun. 2008.
- [30] “Polytec Advancing measurements by light,” *Microsystem & MEMS Analyzers*. [Online]. Available: <http://www.polytec.com/us/products/microsystem-mems-analyzers>. [Accessed: 01-Jul-2013].
- [31] “Polytec Advancing measurements by light,” *MSA-400 Micro System Analyzer. Measuring 3-D MEMS Dynamics and Topography*. [Online]. Available: http://www.dbkes.com.tr/brosur/msa_400.pdf. [Accessed: 21-Aug-2013].
- [32] “Life Technologies,” *The Molecular Probes® Handbook*. [Online]. Available: <http://es-mx.invitrogen.com/site/mx/es/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Introduction-to-Fluorescence-Techniques.html>. [Accessed: 12-Aug-2013].
- [33] M. Abramowitz, *Fluorescence Microscopy the essentials*, Volume 4. 1993.
- [34] “Life Technologies,” *Fluorescence Tutorials*. [Online]. Available: <http://es-mx.invitrogen.com/site/mx/es/home/support/Tutorials.html>. [Accessed: 13-Aug-2013].
- [35] “Life Technologies,” *Fluorescence SpectraViewer*. [Online]. Available: <http://es-mx.invitrogen.com/site/mx/es/home/Products-and->

Services/Applications/Cell-Analysis/Labeling-Chemistry/Fluorescence-SpectraViewer.html. [Accessed: 14-Aug-2013].

- [36] “La Microscopía: Herramienta para estudiar células y tejidos.” [Online]. Available: http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_5.htm. [Accessed: 10-Jun-2013].
- [37] “Invitrogen TM- Molecular Probes TM.” [Online]. Available: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C3012?ICID=====search-c3012>. [Accessed: 04-Jul-2013].
- [38] R. Rottenfusser and T. B. Gines, “Zeiss Education in Microscopy and Digital Imaging,” *Inverted Microscope Lightpaths*. [Online]. Available: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/basics/axioobserver/index.html>. [Accessed: 14-Aug-2013].
- [39] R. Rottenfusser and M. W. Davidson, “Introduction to fluorescence Microscopy.” [Online]. Available: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>. [Accessed: 03-Jul-2013].
- [40] A. Scordato and J. D. Griffin, “Nikon Microscopy U The source for microscopy education,” *Fluorescence Filter Combinations*. [Online]. Available: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/dual/fitctexasred/fitctexasredindex.html>. [Accessed: 14-Aug-2013].
- [41] “Elveflow Microfluidic Innovation Center,” *Syringe pumps and microfluidic applications*. [Online]. Available: <http://www.elveflow.com/microfluidic-archive/syringe-pumps-and-microfluidic-applications>. [Accessed: 16-Aug-2013].
- [42] M. E. Dailey and D. C. Focht, “Nikon Microscopy U The source microscopy educatio,” *Culture Chambers for Live-Cell Imaging*. [Online]. Available: <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/culturechambers.html>. [Accessed: 16-Aug-2013].