

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Ingeniería Electrónica

Estructura microfluídica para espectroscopía de impedancia de células humanas

para optar por el título de

Magister Scientiae en Ingeniería Electrónica con Énfasis en Sistemas
Microelectromecánicos.

Con el grado académico de

Magister Scientiae

Maria José Morales Ballesteros

Cartago, 2 de Mayo del 2016.

Declaro que el presente documento de tesis ha sido realizado enteramente por mi persona, utilizando y aplicando literatura referente al tema e introduciendo conocimientos y resultados experimentales propios.

En los casos en que he utilizado bibliografía he procedido a indicar las fuentes mediante las respectivas citas bibliográficas. En consecuencia, asumo la responsabilidad total por el trabajo de tesis realizado y por el contenido del presente documento.

Maria José Morales Ballesteros

Cartago, 2 de Mayo del 2016

Céd: 186200558533

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Escuela de Ingeniería Electrónica
Tesis de Maestría
Tribunal evaluador

Tesis de maestría defendida ante el presente Tribunal Evaluador como requisito para optar por el grado académico de maestría, del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Miembros del Tribunal



M.Sc. Laura Rojas Rojas
Profesor lector



M.Sc. Cristopher Vega Sánchez
Profesor lector



Dr-Ing. Paola Vega Castillo
Directora de Tesis

Los miembros de este Tribunal dan fe de que la presente tesis ha sido aprobada y cumple con las normas establecidas por la Escuela de Ingeniería Electrónica.

Lunes 27 de junio de 2016

Resumen

Esta tesis de maestría forma parte de un proyecto de investigación del Tecnológico de Costa Rica, el cual se basa en confinar células en dispositivos microfluídicos para posteriormente ser analizadas por medio de espectroscopía de impedancia. El problema de confinamiento de células es ideal para ser resuelto mediante microfluídica, ya que esta permite trabajar con dimensiones micrométricas y medir múltiples muestras simultáneamente. La tesis presenta estudios de simulación de diferentes estructuras microfluídicas para lograr un diseño funcional de confinamiento de un conjunto de células vivas. Para el estudio de la dinámica de fluidos y el comportamiento de las células ante el fluido se utilizó COMSOL Multiphysics como herramienta de simulación. Se simularon diferentes geometrías y dimensiones, tras definir parámetros como la velocidad de perfusión, el diámetro de la célula y la densidad del medio de cultivo.

El objetivo de esta tesis es diseñar una microestructura que permita confinar células manteniendo la velocidad de perfusión, donde el dispositivo consta de una entrada del fluido y una salida del mismo. La salida del fluido es necesaria debido al flujo constante de medio de cultivo necesario para mantener células humanas.

Palabras clave: microfluídica, velocidad de perfusión, esfuerzo cortante, espectroscopía de impedancia, células.

Abstract

This master's project is part of a research project at Instituto Tecnológico de Costa Rica, aiming at confining cells in microfluidic devices to be subsequently analyzed by impedance spectroscopy. The problem of confining cells is an ideal case to be solved by means of microfluidics, as this allows working with micrometric dimensions. This thesis presents studies of different microfluidic structures for a functional design for confinement of a set of living cells. Simulations were carried out using COMSOL Multiphysics for the study of fluid dynamics and the cell behavior in response to the fluid flow. Different geometries and dimensions were simulated after defining parameters such as perfusion velocity, cell diameter, and culture medium density.

The goal of this thesis is to design a microstructure that allows confining cells maintaining the perfusion velocity. The device comprises a fluid inlet and outlet. The fluid outlet is necessary due to the requirement of a constant flow for maintaining the cell culture.

Keywords: Microfluidics, perfusion velocity, shears stress, human cells, impedance spectroscopy.

*Dedicado a mi Madre, mi Hermana, mi sobrina, mis abuelos y a mi tío
Oswaldo Rodríguez, han sido mi motor y mi energía.*

Agradecimientos

Primeramente, Gracias a Dios que me dio la vida y la salud para cumplir una meta más en mi vida, sin Su gracia y misericordia nada de esto hubiese ocurrido.

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de la Dr.-Ing. Paola Vega que me ayudó durante toda la maestría y lo más importante me ayudo a seguir cuando ya no podía hacerlo. Sin su ayuda profesora, no hubiese sido posible que yo terminada esta maestría. Infinitas Gracias.

A Grettel Trejos por ayudarme y siempre darme palabras de aliento y de motivación, gracias por esas palabras que causaron en mí fuerza de voluntad para seguir.

A mi madre y mi hermana por siempre acompañarme y apoyarme en todo este camino.

A mi novio Esteban Montero, y mi suegra Marielos Rodriguez, por su apoyo incondicional y siempre ofrecerme su ayuda y su casa para poder terminar mis tareas de los cursos de maestría.

A mis lectores Laura Rojas y Christopher Vega por el apoyo brindado en la realización de este trabajo de maestría y por compartir sus conocimientos para lograr un proyecto funcional.

Gracias.

Maria José Morales Ballesteros

Cartago, 2 de Mayo de 2016

Índice general

Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Agradecimiento.....	ix
Contenidos.....	x
Índice de figuras	xi
Índice de tablas.....	xiii
CAPITULO I	
1 Introducción.....	1
1.1 Objetivo General.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos.....	2
CAPITULO II	
Marco teórico.....	2
2.1 Técnicas de fabricación de canales microfluídicos.....	3
3. Movimiento del fluido dentro de un microcanal.....	3
3.1 Fuerzas Viscosas.....	3
3.2 Tensión Superficial.....	4
3.3 Número de Reynolds.....	5
3.4 Diámetro y resistencia hidráulica.....	5
3.5 Difusión.....	8
3.6 Movimiento de una partícula en el fluido.....	9
4. La célula y sus propiedades eléctricas.....	10
5. Espectroscopía de impedancia.....	13
5.1. Técnicas de medición para la medición de la impedancia de células....	14
6. Estado del arte de estructuras microfluídicas para el confinamiento de células...	16
CAPITULO III	
3.1 Herramientas De Modelado y Simulación.....	35
3.2 Resultados.....	35
CAPITULO IV	
Análisis de resultados.....	60
CAPITULO V	
Conclusiones y Recomendaciones.....	83
Bibliografía.....	85

Índice de figuras

Figura 1 Comportamientos representativos de un líquido en contacto con una superficie sólida horizontal [2].	5
Figura 2 Perfil de velocidades de un canal con 3 resistencias hidráulicas en serie.	7
Figura 3 Perfil de velocidades de un canal con 3 resistencias hidráulicas en paralelo. El color celeste representa la velocidad menor, mientras que el color rojo representa la velocidad máxima.	8
Figura 4 Esquema de la membrana celular [4].	Error! Bookmark not defined.
Figura 5 Modelo eléctrico de los principales mecanismos que determinan la impedancia de una suspensión celular [8].	12
Figura 6. Representación eléctrica de la ecuación de Debye, con relajación y $\alpha=0$ [8].	12
Figura 7. Modelo eléctrico del modelo de Cole-Cole para una célula [8].	13
Figura 8. Representación ideal de la permitividad y resistividad de tejidos biológicos en función de la frecuencia [8].	15
Figura 9. Circuito equivalente de un electrodo para medición de biopotencial [10].	16
Figura 10. Trampa hidrodinámica propuesta en [11].	17
Figura 11 Resultado de la simulación para diferentes tiempos [11].	18
Figura 12. Comparación de la simulación y los datos experimentales de microcámaras con diferentes disposiciones de dos aperturas de captura de tamices forma de U: a) tamiz A en forma de U, b) tamiz B en forma de U, c) tamiz C en forma de U con apertura dual [11].	19
Figura 13. Esquema de dispositivo microfluídico con trampa hidrodinámica [12].	20
Figura 14. a) Esquemático del dispositivo en 3D y el procedimiento de captura de la célula. b) esquema en 2D del dispositivo [13].	21
Figura 15. Campo de velocidades alrededor de los [13].	22
Figura 16. Célula HeLa atrapada [13].	22
Figura 17. Método utilizado para la preparación del CTC-chip polimérico [14].	23
Figura 18. a) Imágenes del CTC-chip polimérico y anticuerpo inmovilizado en él. En b) y c) se observan los micropilares que constituyen la microestructura superficial, d) los anticuerpos inmovilizados se observan en la zona brillante [14].	24
Figura 19. El CTC-chip se encuentra en el soporte para la inyección de la muestra de líquido [14].	24
Figura 20. Imágenes del chip polimérico CTC después de la prueba de flujo con la suspensión de la línea celular de cáncer dispersa en PBS. a) Imagen del chip recubierto con el anticuerpo anti-EpCAM. b) Imagen ampliada del mismo chip como en a). Las pequeñas esferas capturadas en los grandes círculos (micropilares) son las células cancerígenas. c) Imagen del chip recubierto con el anticuerpo anti-EpCAM [14].	25
Figura 21. Micrografías electrónicas de barrido moldeadas PEG de los micropocillos [15].	26
Figura 22. Esquema para la fabricación de microestructuras expuestas y no expuestas dentro de microcanales [15].	27
Figura 23. a) Micrografías de barrido electrónico de las ranuras moldeadas con la técnica PEG, b) patrones individuales de micropocillos circulares con una altura de $25\mu\text{m}$ [15].	28
Figura 24. a) Diferencias entre el número de células atrapadas con sustratos no expuestos y b) con sustratos expuestos [15].	28

Figura 25. Células NIH-3T3 fueron inmovilizados dentro de micropocillos generados a partir de microestructuras de PEG. a) Micropocillos, b) Células viables, c) tinción con SSEA, d) Células dañadas [15].	29
Figura 26. Esquema de la matriz de micro-cámara de cultivo de células en el chip cultivo de perfusión. a) Diseño de chips con la red de microcanales. b) Estructura de cada microcámara	31
Figura 27. Carga de líquido utilizando chips de cultivo de perfusión impulsado por presión. a) Se añadieron soluciones acuosas que contienen ocho tintes diferentes a las cámaras utilizando una micropipeta. b) Las soluciones se entregan mediante la aplicación de una presión de la fuente de presión externa única a través de un filtro de aire de ventilación estéril. c) Fotografía de la matriz de microcámaras. d) Ampliación de la microcámara. [16].	33
Figura 28. Crecimiento de las células HeLa en la microcámara. a) Después de cargar el celular. b) Después de 1 día de cultivo estático, las células se habían adherido a la superficie de PDMS. c) Después de 2 días de cultivo en perfusión, las células habían crecido en la microcámara [16].	34
Figura 29. Fluorometría para medición de crecimiento de células para el ensayo de citotoxicidad de drogas. a) imagen de microscopio fluorescente de la matriz de microcámaras tomada después del cultivo en medios tratados de manera diferente. b) Efecto de siete medicamentos contra el cáncer en el crecimiento celular evaluada utilizando la matriz de cultivo celular en la microcámara (blanco) y la microplaca (negro) [16].	35
Figura 30. Geometría del modelo A.	38
Figura 31. a) Magnitud de velocidad (m/s). Las líneas representan el campo de velocidad.	39
Figura 32. Mapa de Poincaré en 3D para el modelo A.	41
Figura 33. Mapa de Poincaré en dos dimensiones para el modelo A.	41
Figura 34. Arreglo geométrico de 6 dispositivos microfluídicos.	41
Figura 35. Condiciones de frontera para el Modelo A.	42
Figura 36. Diagrama de Poincaré 3D para un tiempo de 1500s.	43
Figura 37. Diagrama de Poincaré 2D para el modelo C.	43
Figura 38. Geometría del modelo microfluídico B, basado en [17].	44
Figura 39. Dimensiones de la vista lateral de la microestructura del dispositivo B, basado en [17].	45
Figura 40. . Capas de la microestructura del dispositivo microfluídico B, basado en [17].	45
Figura 41. Magnitud de la velocidad (m/s) y frentes de velocidad cero.	47
Figura 42. Líneas de campo de velocidad.	48
Figura 43. Trayectoria de las partículas en $t=3000s$.	48
Figura 44. Número de partículas confinadas vs tiempo en el modelo B.	49
Figura 45. Gráfico de Poincaré 3D para el modelo B.	50
Figura 46. Mapa de Poincaré 2D Para el modelo B.	50
Figura 47. Diagrama de Poincaré en 3D para el modelo B.	51
Figura 48. Conexión de dos dispositivos en paralelo del modelo B.	52
Figura 49. Cortes transversales representando la magnitud de la velocidad en m/s para el arreglo de dispositivos del modelo B.	52
Figura 50. Mapa de Poincaré en 3D para un arreglo de dos dispositivos del modelo B.	53
Figura 51. Mapa de Poincaré en 2D para el arreglo de dos dispositivos del modelo B.	54
Figura 52. Número total de partículas en función del tiempo para el arreglo de dos dispositivos del modelo B.	54
Figura 53. Geometría de la microestructura del modelo C para el confinamiento de células.	55
Figura 54. Dimensiones de la microestructura del modelo C.	55
Figura 55. Magnitud de velocidad dentro del microcanal.	56

Figura 56. Cortes representativos de la magnitud de la velocidad para el modelo C.....	57
Figura 57. Distribución de las partículas en el modelo C.	58
Figura 58. Número total de partículas en función del tiempo en el modelo C.....	58
Figura 59. Magnitud de la velocidad y distribución de las partículas en t=3600s para el modelo C.....	59
Figura 60. Mapa de Poincaré en 3D para el modelo C.....	60
Figura 61. Valores de esfuerzos cortante para diferentes vasos reportado por Lipowsky et al [33].	63
Figura 62. Disposición geométrica del modelo A conectado en serie.	64
Figura 63. Magnitud de Velocidad para el modelo A con tres dispositivos en serie.	65
Figura 64. Gráfico de Poincaré para el modelo A con tres dispositivos en serie.....	66
Figura 65. Número total de partículas en función del tiempo de para 3 dispositivos del modelo A conectados en serie.....	67
Figura 66. Esfuerzo cortante en toda la superficie del modelo y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante presentes en el arreglo de dispositivos del modelo A.	68
Figura 67. Arreglo de 3 dispositivos microfluídicos del modelo B en paralelo.....	69
Figura 68. Magnitud de la velocidad para el modelo B.	69
Figura 69. Gráfico de Poincaré para el modelo B.	70
Figura 70. Número total de partículas en función del tiempo de para el arreglo de 3 dispositivos del modelo B.	70
Figura 71. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de dispositivos del modelo B.	71
Figura 72. Arreglo de tres dispositivos microfluídicos del modelo C.....	72
Figura 73. Magnitud de la Velocidad para el modelo C.	72
Figura 74. Gráfico de Poincaré para el modelo C.	73
Figura 75. Total de partículas confinadas en función del tiempo del arreglo de tres dispositivos del modelo C.	74
Figura 76. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de tres dispositivos del modelo C.....	74
La geometría utilizada fue la de Figura 62, donde se hizo una nueva corrida con las condiciones de la tabla 16, donde se obtuvo un perfil de velocidad representado en la figura 77, en la figura 78 se muestra la ubicación de las partículas confinadas en un plano cortante de 20 μm para el final de la corrida de la simulación mediante un diagrama de poincare.....	75
Figura 78. Mapa de poincare del modelo C a los 3600s	77
Figura 79. Numero de partículas confinadas en función del tiempo del modelo A.	77
Figura 80. Esfuerzo cortante en toda la superficie del modelo y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante presentes en el arreglo de dispositivos del modelo A.	78
Figura 81. Magnitud de la Velocidad para el Modelo B.	79
Figura 82. Diagrama de Poincaré para el modelo B.....	79
Figura 83. Número total de partículas en función del tiempo de para el arreglo de 3 dispositivos del modelo B.	80
Figura 84. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de dispositivos del modelo B.	80
Figura 85. Magnitud de la Velocidad para el modelo C.	81
Figura 86. Mapa de poincare del modelo C para un tiempo de 3600s.	82
Figura 87. Cantidad de partículas confinadas al transcurrir el tiempo para el modelo C.....	83
Figura 88. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de tres dispositivos del modelo C.....	83

Índice de tablas

Tabla 1. Diámetros hidráulicos para secciones de canales en forma circular, rectangular o anillo. También se detalla el área de la sección y la línea de contacto [2].	6
Tabla 2. Diámetros típicos según el tipo de célula [7].	10
Tabla 3. Dimensiones y parámetros hidrodinámicos de microcámara de cultivo celular [16].	31
Tabla 4. Parámetros del agua utilizados en la simulación de los dispositivos microfluídicos de confinamiento de células.	36
Tabla 5. Condiciones de frontera para el modelo A.	36
Tabla 6. Condiciones de frontera para el modelo microfluídico A.	42
Tabla 7. Condiciones de Frontera del modelo microfluídico B.	46
Tabla 8. Características del mallado del modelo microfluídico B.	46
Tabla 9. Condiciones de frontera para el modelo B con múltiples cámaras.	51
Tabla 10. Condiciones de frontera para el modelo C.	56
Tabla 11. Técnicas de microfabricación sugeridas para cada diseño.	61
Tabla 12. Eficiencia de los arreglos de dispositivos de cada modelo.	62
Tabla 13. Rangos aproximados de esfuerzos cortantes en vasos sanguíneos humanos y órganos artificiales [32].	62
Tabla 14. Condiciones de simulación para comparación de modelos.	63
Tabla 15. Comparación de los arreglos de tres dispositivos para un tiempo de corrida de 3600s	75
Tabla 16. Comparación de los arreglos de tres dispositivos en estado estable	75
Tabla 17. Condiciones de simulación para los 3 modelos.	75

CAPITULO I

Introducción

El proceso de capturar células y confinarlas es un reto tecnológico debido a las pequeñas dimensiones que requiere la geometría del canal microfluídico para lograr el confinamiento mecánico. Sin embargo, existen otros mecanismos de confinamiento por medio de la aplicación de otros efectos físicos, como es el caso del confinamiento de células por dielectroforesis, magnetoforesis, electroforesis, entre otras. En cada uno de estos casos, el confinamiento de las células involucra la atracción por una fuerza externa, como un campo eléctrico o un campo magnético.

La importancia de confinar células radica en el estudio del cáncer y su propagación por medio del torrente sanguíneo produciendo la metástasis. El estudio de estas células, conocidas como las células tumorales circulantes (CTC), es de gran importancia para mejorar los fármacos contra el cáncer y proveer al paciente de terapias médicas más eficientes y personalizadas, las cuales requieren realizar muchas pruebas simultáneas. Esto puede lograrse utilizando dispositivos microfluídicos para el confinamiento de células.

La microfluídica está actualmente siendo muy utilizada en aplicaciones farmacéuticas y en la biomedicina para el diagnóstico de enfermedades y de diferentes tipos de cáncer mediante el estudio de las células que son las responsables de producir los diferentes tipos de cáncer. Estas células son particularmente raras y resistentes, y por ello se dificulta obtener una cura para los diversos tipos de cáncer. Estas células tienen la capacidad de mutar en diferentes formas y en diferentes zonas del cuerpo. Si los avances tecnológicos permitieran predecir el comportamiento de un tipo de célula para un tipo específico de cáncer se podría obtener un fármaco que controle la célula cancerosa y así salvar la vida de miles de personas.

Además de la biocompatibilidad del soluto en el cual se encuentran las células, el estudio reológico de estructuras microfluídicas para el óptimo confinamiento de células debe tomar en cuenta varios factores importantes para mantener a la célula con vida durante los experimentos. Uno de estos factores es la necesidad de un flujo de perfusión.

En el cuerpo humano las células son jóvenes, exceptuando las células de la corteza cerebral, que permanecen hasta la muerte del individuo. Por ejemplo, el tiempo de vida de los glóbulos rojos se aproxima a los 4 meses, luego mueren para ser sustituidos por nuevas células. En el cuerpo humano, las células cumplen su ciclo de vida gracias al flujo constante de sangre. El torrente sanguíneo que les permite nutrirse, oxigenarse y cumplir su ciclo metabólico, este mismo principio es el requerido por los dispositivos microfluídicos al realizar estudios con células de cualquier índole.

Por esta razón, es importante que el dispositivo microfluídico tenga salidas de flujo, pues las células necesitan de un flujo constante (flujo de perfusión) para el suministro de nutrientes y la recolección de desechos celulares, permitiéndoles tener un metabolismo celular óptimo. En estructuras microfluídicas sin perfusión, las células morirían debido a sus propios desechos.

Por otra parte, la velocidad de perfusión es una variable importante debido a que las células son muy sensibles a los esfuerzos cortantes, que pueden causar daño o muerte celular.

En esta tesis se compararán, por medio de simulación, tres diseños de dispositivos microfluídicos para el confinamiento de células para su caracterización y estudio con la técnica de espectroscopía de impedancia.

1.1 Objetivo General

Diseñar una estructura microfluídica que permita la distribución y confinamiento de células para experimentos de espectroscopía de impedancia.

1.2 Objetivo Especifico

- 1.2.1 Identificar estructuras para el confinamiento de células en aplicaciones microfluídicas.
- 1.2.2 Analizar las estructuras microfluídicas identificadas en el objetivo 1 y compararlas con respecto a los requerimientos de espectroscopía de impedancia y condiciones requeridas por las células.
- 1.2.3 Comparar las estructuras microfluídicas más relevantes para la distribución y confinamiento de células para la aplicación de espectroscopía de impedancia obtenidas en el objetivo 1.2.2.
- 1.2.4 Evaluar, por medio de simulación, la estructura diseñada y determinar su eficiencia y eficacia para la aplicación de espectroscopía de impedancia

CAPITULO III

MARCO TEORICO

El estudio de la manipulación de pequeñas cantidades de líquidos (entre 10^{-9} y 10^{-18} litros) se conoce como microfluídica. La microfluídica involucra múltiples disciplinas, entre las que se puede mencionar la química, física, biotecnología, la mecánica y la microfabricación. Estos aspectos son necesarios para lograr la correcta manipulación del fluido.

En microfluídica se utilizan canales con dimensiones entre las decenas hasta las centenas de micrómetro [1]. Para manipular estos fluidos en los microcanales es necesario conocer el comportamiento del fluido dentro del microcanal.

Uno de los usos más frecuentes de la microfluídica es la investigación biomédica y clínica ya que presenta diversas ventajas. Entre ellas, el volumen de fluido dentro de estos canales es muy pequeño, y por lo tanto la cantidad de reactivos empleados es muy pequeña, permitiendo reducir costos. Por otra parte, la cantidad de muestra también puede reducirse.

2.1 TECNICAS DE FABRICACIÓN DE CANALES MICROFLUIDICOS

En general, las técnicas de fabricación empleadas en la construcción de estos microdispositivos son relativamente baratas y permiten su producción en masa. La tecnología de los microdispositivos permite la fabricación de dispositivos integrados, es decir, incorporan diferentes funciones en el mismo chip.

Los dispositivos microfluídicos han tenido un rápido desarrollo en sus métodos de fabricación, los microcanales que sirven como tuberías y otras estructuras como las microválvulas, los micromezcladores y las microbombas, son elementos esenciales de las fábricas microquímicas en un chip

La microelectrónica ha tenido un importante papel en el desarrollo de los microfluídos; gracias a ella se han desarrollado materiales para sistemas especializados que requieran estabilidad térmica y química. Por ejemplo, el silicio y el vidrio son empleados en el campo de los nanofluídos (el estudio de fluidos en canales a escala nanométrica, idealmente menores a 50 nm), en donde los canales deben ser de paredes rígidas.

Muchos de los sistemas microfluídicos se han construido con polidimetilsiloxano (PDMS), este material es ópticamente transparente y es un elastómero suave. La facilidad con que se pueden llevar a cabo las pruebas en este material y su capacidad para resistir diversos componentes, como las válvulas neumáticas, han convertido al PDMS en el principal material para construir dispositivos microfluídicos.

3. MOVIMIENTO DEL FLUIDO DENTRO DE UN MICROCANAL

A medida que se reduce la escala de los dispositivos microfluídicos cambia el comportamiento del fluido que conducen. Al reducir el tamaño del canal, los principios físicos no cambian, pero empiezan a tomar importancia ciertos fenómenos que no se presentan en la macroescala. A continuación se describen algunos parámetros necesarios para la comprensión del comportamiento del fluido dentro de estructuras microfluídicas.

3.1 Fuerzas Viscosas

Estas pueden definirse como una fuerza de resistencia presente en el fluido. Un sólido dentro del líquido experimentará una fuerza de fricción y también las paredes del canal presentan resistencia al movimiento del fluido. Estas fuerzas son las responsables que dentro de los microcanales el flujo sea laminar. El comportamiento de la interfaz líquido-sólido es de difícil previsión porque las moléculas del líquido existentes en la interfaz están en continua interacción por un lado con otras moléculas del líquido y por otro con el sólido.

A nivel microscópico, las fuerzas que afectan a cada molécula son diferentes en el interior del líquido que en la superficie. Así, en el seno de un líquido cada molécula está sometida a fuerzas de atracción que en promedio se anulan. Esto permite que la molécula tenga una energía bastante baja. Sin embargo, en la superficie existe una fuerza neta hacia el interior

del líquido. Energéticamente, las moléculas situadas en la superficie tienen una mayor energía promedio que las situadas en el interior, por lo tanto la tendencia del sistema será disminuir la energía total. Para ello se disminuye el número de moléculas situadas en la superficie, de ahí la reducción de área hasta el mínimo posible [2].

3.2 Tensión Superficial

La tensión superficial (γ) mide las fuerzas internas que hay que vencer para poder expandir el área superficial de un líquido. La energía necesaria para crear una nueva área superficial, trasladando las moléculas de la masa líquida a la superficie de la misma. La tensión superficial tiene como principal efecto la tendencia a disminuir en lo posible la superficie de un líquido para un volumen dado, de aquí que un líquido rodeado de aire adopte forma esférica, ya que es la forma con menor relación área-volumen y menos energía. El valor de la tensión superficial depende de la temperatura y de la naturaleza de las dos fases puestas en contacto [2].

Cuando una gota se encuentra sobre una superficie sólida, la tensión superficial también intenta minimizar la energía total. El ángulo definido por la curvatura de la gota sobre la superficie se conoce como ángulo de contacto (θ). Este ángulo se utiliza para medir la capacidad que tiene un líquido para mojar una superficie. La Figura 1 muestra dos ejemplos representativos del comportamiento de un líquido sobre una superficie sólida horizontal. Principalmente depende de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas existentes en el interior del líquido.

Cuando las fuerzas adhesivas (líquido-superficie) con la superficie del sólido son muy grandes en relación a las fuerzas cohesivas (dentro del líquido), el ángulo de contacto es menor de 90 grados, teniendo como resultado que el líquido moja la superficie, se expande sobre la superficie. Cuando esto ocurre se habla de superficies hidrofílicas, como se muestra en la Figura 1a). Un ejemplo se encontraría depositando una gota de agua sobre una capa de óxido de silicio, donde el agua se distribuiría por esta superficie. Por el contrario, una superficie es hidrofóbica, como muestra la Figura 1b), cuando el ángulo de contacto es mayor de 90°. Las fuerzas cohesivas del líquido son mayores, esto significa que mantiene su forma de gota y no moja la superficie. Un ejemplo de este fenómeno se puede observar cuando se deposita agua sobre la superficie de una oblea de silicio [2].

Para una superficie hidrofílica el ángulo de contacto es menor de 90°, el líquido se extiende sobre la superficie. Por el contrario, cuando el ángulo formado entre el líquido y la superficie es mayor de 90°, el líquido se contrae y mantiene forma de gota sobre una superficie hidrofóbica [2].

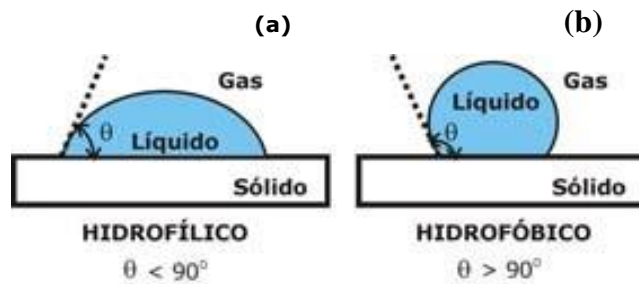


Figura 1 Comportamientos representativos de un líquido en contacto con una superficie sólida horizontal [2].

3.3 Número de Reynolds

Osborne Reynolds fue el primero en reportar que existían regímenes diferentes de flujo, asignando valores numéricos a los regímenes. Reynolds observó que el tipo de flujo adquirido por un líquido que fluye dentro de una tubería depende de la velocidad del líquido, el diámetro de la tubería y de algunas propiedades físicas del fluido. El número de Reynolds es un número adimensional que relaciona las propiedades físicas del flujo, su velocidad y la geometría del ducto por el que fluye y está dado por:

$$Re = \frac{D \cdot v \cdot \rho}{\mu} \quad (1)$$

donde:

Re= Numero de Reynolds

D= Diámetro del ducto

v= velocidad promedio del líquido

ρ = densidad del líquido

μ = viscosidad del líquido

La ecuación 1 es solo para diámetros donde la sección transversal del ducto es circular. Cuando el ducto no es circular, se utiliza el diámetro equivalente el cual está definido como:

$$D_e = 4 \cdot \frac{\text{Area transversal del flujo}}{\text{perimetro mojado}} \quad (2)$$

En la mayoría de los casos si el número de Reynolds RE se encuentra por debajo de 2100 el flujo es laminar, para el intervalo entre 2100 y 4000 se considera como flujo de transición y para valores mayores de 4000 se considera como flujo turbulento.

3.4 Diámetro y resistencia hidráulica

La sección transversal del canal es uno de los factores que determina el comportamiento del líquido en su interior y se denomina diámetro hidráulico (D_h). Este depende del área y del perímetro del canal:

$$D_h = \frac{4S}{P_m} \quad (3)$$

Donde S es la sección mojada del canal y P_m el perímetro mojado. Esto significa que para una sección circular, D_h queda definido como:

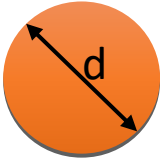
$$D_h = d \quad (4)$$

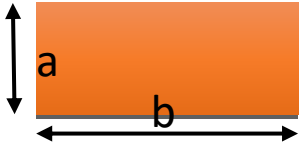
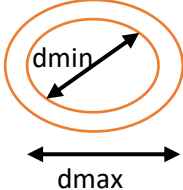
Donde d el diámetro del canal. Mientras la sección transversal del conducto no sea circular o este se consideraría que el canal está lleno de líquido, estos datos coinciden con el área (a) y el perímetro (b) de la sección transversal y D_h quedará definido como [3]

$$D_h = \frac{2a}{a + b} \quad (5)$$

En la Tabla 1 se muestran ejemplos del cálculo del diámetro hidráulico en secciones de canales con diferentes formas y suponiendo que se encuentran llenos de líquido. En canales rectangulares al existir dos lados con medidas diferentes, se suele hablar de diámetro equivalente. Es importante notar que si un lado es mucho mayor que el otro ($b \gg a$) el diámetro hidráulico se puede simplificar ($D_h \approx 2a$); esto significa que la dimensión más pequeña del canal será la que determine el comportamiento del flujo [2].

Tabla 1. Diámetros hidráulicos para secciones de canales en forma circular, rectangular o anillo. También se detalla el área de la sección y la línea de contacto [2].

Tipo de sección transversal	Figura	Área de la sección transversal	Línea de contacto	Diámetro hidráulico
Circular		$\frac{\pi d^2}{4}$	$\pi \cdot d$	d

Rectángular		$a b$	$2a + 2b$	$a + b$
Anillo		$\pi(d_{max}^2 - d_{min}^2)$	$\pi(d_{max} + d_{min})$	$\pi(d_{max} + d_{min})$

La resistencia hidráulica es la oposición de un fluido a circular a través de un canal, donde existe una energía disipada. En este caso esa energía disipada es mecánica y es provocada por la viscosidad del fluido. Esta propiedad influye directamente en la variación de presión dentro del canal, lo que matemáticamente se representa como [4]:

$$\Delta p = R_{hid} Q \quad (6)$$

Donde R_{hid} es igual al radio hidráulico y Q es el caudal y sus dimensiones vienen en volumen/tiempo.

Para cada geometría la resistencia hidráulica va a variar, debido a que el diseño de los microcanales es diferente. La resistencia hidráulica es análoga a la resistencia eléctrica. Para evaluar los diseños de microcanales se consideran circuitos hidráulicos de tipo serie y paralelo tan cual se trabajan las resistencias eléctricas. En la Figura 2 se observa una conexión de tres resistencias hidráulicas en serie, debido a que las secciones transversales tienen dimensiones diferentes.

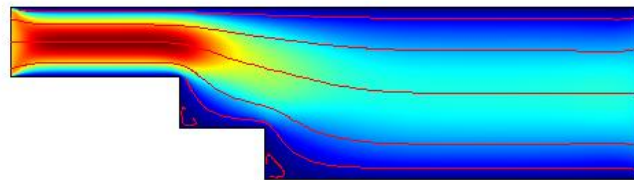


Figura 2 Perfil de velocidades de un canal con 3 resistencias hidráulicas en serie.

La diferencia de presión a lo largo del microcanal compuestos por las diferentes dimensiones se puede expresar como la suma de sus resistencias hidráulicas:

$$\Delta p = (R_1 + R_2 + R_3) Q \quad (7)$$

En la Figura 3 se muestra un canal microfluídico donde presenta dos resistencias hidráulicas en paralelo, y su diferencia de presión se expresa de la siguiente manera:

$$\Delta p = \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) Q \quad (8)$$

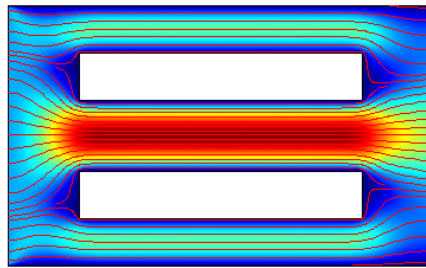


Figura 3 Perfil de velocidades de un canal con 3 resistencias hidráulicas en paralelo. El color celeste representa la velocidad menor, mientras que el color rojo representa la velocidad máxima.

3.5 Difusión

La difusión implica propagar la materia de zonas de mayor a menor concentración. Este fenómeno es el principal fundamento de los dispositivos microfluídicos, donde generalmente se requiere transportar partículas utilizando como medio el fluido para su transporte. El movimiento que describen estas partículas es aleatorio; se van distribuyendo de manera no uniforme y no siguen trayectorias rectas. El desplazamiento cuadrático medio se describe por:

$$l^2(N) \sim 4Dt \quad (9)$$

Donde $l^2(N)$ es la posición inicial de la partícula N, D es el coeficiente de difusión y t es el tiempo que tarda en recorrer la partícula de la posición inicial a la posición final.

El coeficiente de difusión determina la velocidad de difusión de una sustancia, por lo que el tiempo de difusión de las partículas dependerá de las características del fluido, por lo que se hace necesario tomar en cuenta la viscosidad. Langevin expuso el equilibrio mecánico de una partícula inmersa en un fluido sujeta a las fuerzas de fricción, su propia inercia y a la presencia de colisiones. Matemáticamente se define como [4]:

$$\frac{du}{dt} - \beta u = f(t) \quad (10)$$

En donde u es una de las componentes de velocidad de la partícula a difundir y β es el coeficiente de fricción.

El coeficiente de difusión de las partículas puede estimarse a partir de la ecuación de Einstein [5]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (11)$$

En donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, y r es el radio de la partícula.

El tiempo (t_{diff}) necesario para que las partículas se difundan en una distancia dada (L) depende de su coeficiente de difusión (D),

$$t_{diff} = \frac{L^2}{D} \quad (13)$$

3.6 Movimiento de una partícula en el fluido

El momentum de las partículas proviene de la segunda ley de Newton, que establece que la fuerza neta sobre una partícula es igual a su tasa de cambio en el tiempo de su momento lineal en un sistema de referencia inercial. Existen tres fuerzas que actúan sobre una partícula que se mueve a través de un fluido:

$$\frac{d}{dt}(m_p v) = F_D + F_g + F_{ext} \quad (14)$$

F_D = fuerza de arrastre, que aparece cada vez que hay movimiento relativo entre la partícula y el fluido

F_g = fuerza gravitatoria

F_{ext} = La fuerza externa

En dinámica de fluidos la fuerza de arrastre F_D se refiere a las fuerzas que se oponen al movimiento relativo entre el fluido y el objeto que se mueve a través del fluido, y se define matemáticamente como:

$$F_D = \frac{1}{\tau_p} m_p (u - v) \quad (15)$$

Donde

m_p = masa de la partícula

τ_p = es el tiempo de respuesta de velocidad de las partículas

v = es la velocidad de la partícula

u = es la velocidad del fluido.

El tiempo de respuesta velocidad de la partícula para partículas esféricas en un flujo laminar se define como:

$$\tau_p = \frac{\rho_p d_p^2}{18\mu} \quad (16)$$

Donde μ es la viscosidad del fluido, ρ_p es la densidad de las partículas, y d_p es el diámetro de partícula. Esta expresión es conocida como la ley de Drag.

3.7 Herramientas para simulación

Comsol Multiphysics es un software para el modelado y solución de problemas físicos, basado en ecuaciones diferenciales parciales y elementos finitos para realizar análisis estacionario o dependiente del tiempo, lineal o no lineal, análisis de modales y de valores propios. Este software tiene la ventaja de extrapolar modelos convencionales a modelos multifísicos, resolviendo modelos físicos acoplados de manera simultánea, en el caso de que se requiera acoples de diferentes físicas.

Debido a su interfaz gráfica es posible diseñar modelos geométricos, en los cuales se definen las condiciones de frontera y cantidades físicas relevantes, tales como las propiedades del material, cargas, fuerzas, fuentes y flujos. También es posible aplicar variables, expresiones o un valor número a los dominios, fronteras y puntos.

4. LA CÉLULA Y SUS PROPIEDADES ELÉCTRICAS

En el interior de la cedula se dan numerosas reacciones químicas que les permite crecer, reproducir energía y eliminar desechos. El tamaño de las células puede variar dependiendo del tipo de célula. La mayoría de las células son de tamaños muy pequeños; este diámetro puede variar de 5 a 150 μm , siendo este último el diámetro del óvulo humano, como se muestra en los ejemplos que se resumen en la Tabla 2. Además, las células pueden tener diferentes formas, entre ellas esférica, cúbica, aplanada, irregular, poliédrica, de bastón, etc.

Tabla 2. Diámetros típicos según el tipo de célula [7].

Célula	Cuenta Relativa (%)	Diámetro celular (μm)
Neutrófilo	54-62	9-15
Linfocito	20-40	7-10
Monocito	4-10	12-30
Eosinófilo	1-3	12-17
Basófilo	0-1	10-14
Plaqueta		2-3

La mayoría de las células constan de tres estructuras básicas: la membrana plasmática, el citoplasma y el núcleo. La membrana plasmática es una barrera cuya función principal es regular el intercambio de materia entre la célula y su exterior. El citoplasma ocupa la mayor parte del interior de la célula, dentro de él hay otras estructuras (organelas), que son las encargadas de realizar las actividades para el funcionamiento de la célula. Por otra parte el núcleo regula todo lo que ocurre dentro de la célula y contiene toda la información genética.

La membrana celular consta de una bicapa lipídica en la cual se encuentra distribuidas las proteínas como se observa en la Figura 4. Debido a sus componentes moleculares de la membrana celular se comporta como una interfaz dieléctrica, permitiendo representar eléctricamente a la una membrana como un capacitor. Cuando se le aplica un campo eléctrico constante a la membrana los iones que están cargados eléctricamente presentan movimiento y se van acumulando a ambos lados de la membrana. Cuando el campo eléctrico aplicado es alterno, ocasiona corrientes de desplazamiento a través de la pared celular y así se produce el llamado fenómeno de relajación.

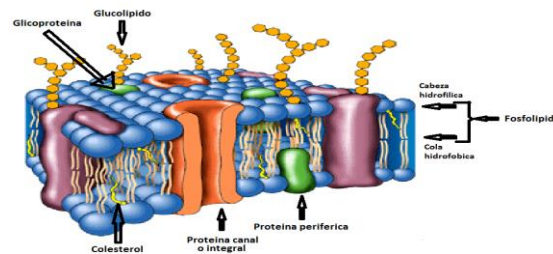


Figura 4. Esquema de la membrana celular [4].

Debido a los distintos fenómenos de relajación, todos los tejidos biológicos presentan un comportamiento eléctrico dependiente de los parámetros dieléctricos con la frecuencia del estímulo.

A medida de que la frecuencia del estímulo eléctrico aplicado aumenta, la conductividad de la mayoría de los tejidos se incrementa desde un valor bajo en corriente directa, que depende del volumen extracelular, hasta un nivel constante en el rango de la frecuencia desde 10 a 100MHz [6].

Para la modelación eléctrica de una muestra biológica se utiliza un circuito eléctrico de dos terminales, donde la impedancia representa el tejido estudiado. Los modelos eléctricos que representan el comportamiento de los sistemas biológicos se denominan “modelos de parámetros concentrados”. Estos permiten una interpretación física o fisiológica de la bioimpedancia. En la Figura 5 se muestra un modelo eléctrico de una célula inmersa en un medio iónico, donde R_i es la resistencia del medio intracelular, R_e es la resistencia del medio extracelular, C_{mc} es la capacidad de la membrana celular y R_{mc} es su resistencia.

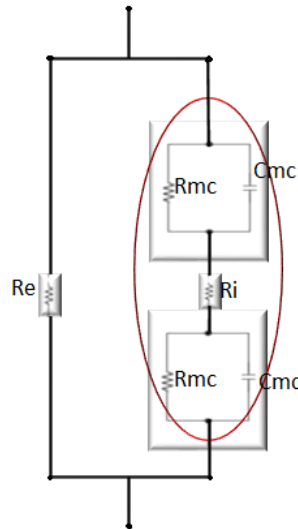


Figura 4 Modelo eléctrico de los principales mecanismos que determinan la impedancia de una suspensión celular [8].

Una representación eléctrica muy conocida es el modelo Cole-Cole. La función de Cole-Cole está desarrollada bajo el modelo de Debye sobre el comportamiento dieléctrico de las suspensiones celulares de los dipolos libres.

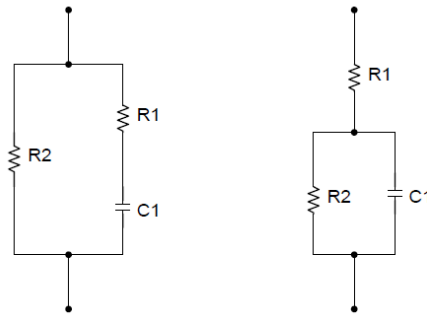


Figura 5. Representación eléctrica de la ecuación de Debye, con relajación y $\alpha=0$ [8].

La permitividad compleja de Debye está dada por la siguiente ecuación:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + j\omega t} \quad (17)$$

Donde ε_s y ε_{∞} son la permitividad a baja y alta frecuencia respectivamente y t es el tiempo de relajación. En la Figura 6 se observa la representación eléctrica del modelo de Debye, donde R_2 representa la resistencia a baja frecuencia, R_1 representa la resistencia a alta frecuencia y C_1 es la capacitancia correspondiente a la membrana celular. Esta representación suele ser de utilidad cuando se necesita hacer medidas sobre algún tipo de tejido orgánico. Sin embargo, para representar tejidos biológicos muchos autores prefieren utilizar la ecuación de permitividad de Cole-Cole:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega(\tau_c)^{(1-\alpha)}} - j \frac{\sigma_s}{\omega \varepsilon_0} \quad (18)$$

Donde α es un parámetro empírico característico de la distribución de la frecuencia de relajación, f_c ($\tau_c = \frac{1}{2\pi f_c}$). Esto da una idea de la dispersión de las constantes de tiempo asociadas con el fenómeno de relajación. La expresión análoga para la impedancia se expresa como:

$$z = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + j\omega\left(\frac{1}{2\pi f_c}\right)^{(1-\alpha)}} \quad (19)$$

Un tejido orgánico representa un arreglo de células, cada una de esas células representa el modelo equivalente presentado en la Figura 7.

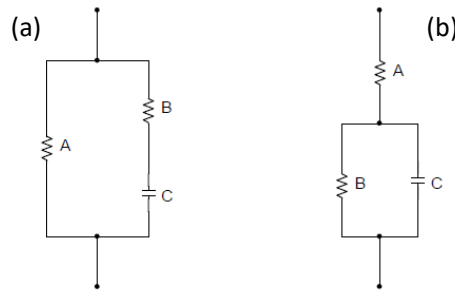


Figura 6. Modelo eléctrico del modelo de Cole-Cole para una célula [8].

Las ecuaciones que rigen los parámetros del modelo eléctrico de la Figura 7a) son:

$$A = R_0 \quad (20)$$

$$B = \frac{R_0 R_\infty}{R_0 - R_\infty} \quad (21)$$

$$C = -j \left(\frac{R_0^2}{R_0 - R_\infty} \right) \left(\frac{f_c}{f} \right)^{(1-\alpha)} \quad (22)$$

Las ecuaciones que rigen el modelo eléctrico de la Figura 7b) son:

$$A = R_\infty \quad (23)$$

$$B = \Delta R = R_0 - R_\infty \quad (24)$$

$$C = -j \Delta R \left(\frac{f_c}{f} \right)^{(1-\alpha)} \quad (25)$$

5. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA

La espectroscopía de impedancia es muy utilizada para la medición de impedancia en tejidos celulares y organismos biológicos basándose en las propiedades físicas de las células y sus componentes o bien a partir de la obtención de parámetros relacionados con la

célula y su actividad celular. La espectroscopía de impedancia se basa en la medida de las características eléctricas de los organismos, tejidos y materiales biológicos en general. Esta técnica es no invasiva, mediante esta técnica aprovechamos la propiedad pasiva que variará en función de la composición de la suspensión y que proporcionará la información de la masa celular. Dicha información forma parte de las propiedades eléctricas pasivas del material como lo son la conductividad σ , y la permitividad ϵ .

Para la obtención de la impedancia se aplica un estímulo eléctrico variable en frecuencia a un material biológico. En el caso de esta tesis sería a un concentrado celular. La medición tendrá un comportamiento diferente en función de la frecuencia debido a la estructura celular. Este comportamiento diferente en frecuencia se refleja en una variación en el espectro de impedancia del conjunto celular. La variación de la impedancia, llamada relajación, se encuentra en unas frecuencias determinadas. En concreto la relajación que nos aporta información sobre los parámetros de interés es la llamada relajación β . Esta relajación β permite obtener un modelo eléctrico en parámetros concentrados que representan los diferentes fenómenos de conducción eléctrica que tienen lugar en ella. Para esto es necesario tener como mínimo dos medidas exactas de dos frecuencias antes y después de la relación β .

Las variaciones del espectro de la impedancia en función de la frecuencia del estímulo eléctrico se muestran en la Figura 8. Esta variación de impedancia de un material biológico en función de la frecuencia es decreciente y presenta una serie de relajaciones llamadas dispersiones [9]. En concreto se dan tres tipos de dispersiones:

- Existe una zona de relajación llamada α ; esta se produce a frecuencias más bajas. Antes de que aparezca la relajación α la impedancia es elevada, disminuyendo a un rango de frecuencias de 10 Hz a 10 kHz, esto va a depender de la naturaleza de la célula.
- Otra relajación de la cual se puede extraer más información y que es la más utilizada para extraer información estructural de la suspensión celular, es la ya nombrada relajación β . Esta abarca el rango entre los 10 kHz y 30 MHz y se debe a la pérdida de polarización de la membrana provocada por un incremento de la frecuencia. Presenta un valor de impedancia medio y es debido a la carga capacitiva de la membrana citoplasmática [9]. La relajación en la región β resulta de la interrelación de la membrana citoplasmática y el medio celular. Cuando se aplica a la suspensión una señal de baja frecuencia, ésta fluye por el medio extracelular ya que los iones cuentan con suficiente tiempo para polarizar la membrana, creando una fuerte oposición a la corriente; como consecuencia de este fenómeno se tiene una impedancia elevada en la medición. Ocurre lo contrario cuando se aplica frecuencias altas, los iones no tienen suficiente tiempo para polarizar la membrana y disminuye la resistencia al paso de la corriente, por consiguiente se tiene un valor de impedancia menor.

- Por último está la dispersión γ , que se ubica alrededor de los 25 GHz y su aparición se debe a la relación de las moléculas del agua.

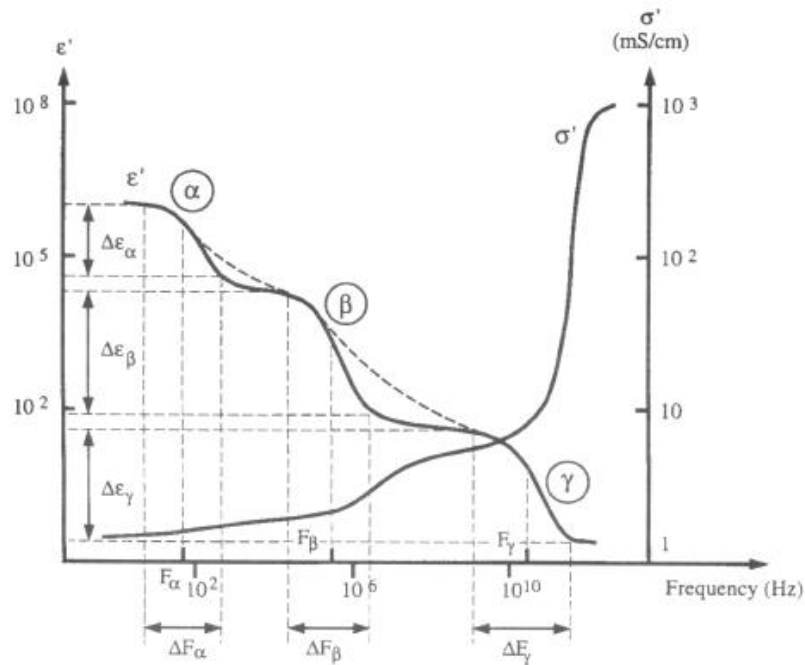


Figura 7. Representación ideal de la permitividad y resistividad de tejidos biológicos en función de la frecuencia [8].

5.1. TECNICAS DE MEDICION PARA LA MEDICION DE LA IMPEDANCIA DE CELULAS

5.1.1 Electrodo

Los electrodos son elementos transductores entre la corriente eléctrica del equipo de medida y la corriente iónica del tejido biológico [10]. Para reducir las tensiones parasitas inducida por los propios electrodos, es primordial y necesario que los electrodos tenga una baja impedancia de entrada para evitar que la medición se vea afectada por estas capacitancias parasitas.

Los electrodos más utilizados en la bibliografía para la medición de fenómenos bioeléctricos son tres: microelectrodos, utilizados para medir potenciales bioeléctricos cerca o dentro de una célula, electrodos superficiales, utilizados para medir potenciales en la superficie de la piel, usados en electrocardiograma (ECG), electroencefalograma (EEG) y electro miografía (EMG) y electrodos de aguja, que atraviesan la piel para el registro de potencial y son usados para mediciones EEG o musculares específicas.

La interfaz entre el contacto metálico de los electrodos y las diferentes disoluciones da lugar a un potencial eléctrico denominado potencial de electrodo. Para alcanzar el equilibrio se forma una capa en la interfaz, en realidad una doble capa, donde la capa

próxima a la disolución presenta polaridad opuesta a la capa próxima al metal. En las mediciones bioeléctricas el potencial del electrodo se produce entre la interface del metal y un electrolito. La doble capa de interfaz actúa como capacitor. La Figura 9 muestra el circuito equivalente del electrodo para biopotenciales en contacto con el cuerpo [10]. Dado que las medidas de los potenciales bioeléctricos requieren dos electrodos, la tensión medida es en realidad la diferencia entre los potenciales instantáneos de ambos [10].

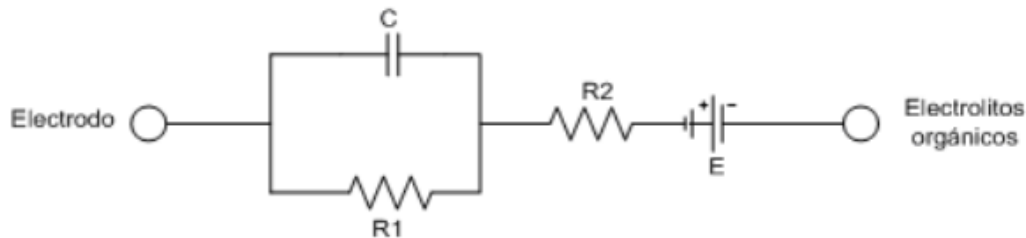


Figura 8. Circuito equivalente de un electrodo para medición de biopotencial [10].

La Figura 9 muestra la representación de la impedancia de los electrodos (una de sus características más importantes) como una red compuesta por una resistencia y un capacitor en paralelo cuyos valores son fijos. En realidad, estos valores son afectados al variar la frecuencia debido al efecto de polarización. Cuando los electrodos difieren entre sí se produce una tensión conocida como tensión de offset, y esto como consecuencia provoca un flujo de corriente donde ocasiona fluctuaciones en la medida, provocando error en la medición. Para evitar este fenómeno deben seleccionarse materiales adecuados y se utilizan técnicas como recubrir los electrodos con electrolíticos.

Actualmente existen dos métodos para la medición de la impedancia, estos son conocidos como el método de dos electrodos (2EM: 2 Electrode Method) y el método de 4 electrodos (4M: 4 Electrode Method). A continuación se describirán cada uno de ellos.

5.1.2 Método de los 4 electrodos (4M)

Este método consiste en hacer circular una corriente senoidal I_0 de frecuencia variable y que esté en el rango de la zona de dispersión β a través de dos electrodos para que un par de segundos electrodos sea usado para medir el potencial a través de la célula.

El objetivo de este método es reducir o eliminar la impedancia de los electrodos. Esto va a ocurrir siempre y cuando la impedancia sea pequeña en comparación con la impedancia de entrada del circuito utilizado para detectar el valor de la tensión V_0 y así no provocar una saturación de los circuitos que proporcionar la corriente I_0 .

5.1.2 Método a dos electrodos (2EM)

En este método se hace circular una corriente de valor constante I_0 a través de dos electrodos. Los electrodos tienen una impedancia representada como Z_e cuyo valor es usualmente mayor que el de la impedancia de interés entre los electrodos y el valor de voltaje V_0 (función de la impedancia entre electrodos y los cambios fisiológicos). La impedancia medida la relaciona:

$$Z = \frac{V_0}{I_0} = Z_{e1} + Z_{e2} + Z_{e3} \quad (26)$$

Si se considera que los dos electrodos tienen las mismas características de fabricación, es decir $Z_{e1} = Z_{e2}$, la impedancia resultante es:

$$Z = \frac{V_0}{I_0} = Z_e + Z_x \quad (27)$$

6. ESTADO DEL ARTE DE ESTRUCTURAS MICROFLUÍDICAS PARA EL CONFINAMIENTO DE CELULAS

Uno de los estudios a nivel computacional que tuvo éxito se reporta en [11], donde se describe un diseño para confinar células formando una trampa hidrodinámica, donde se pueden confinar de 10 a 15 células por cada trampa dispuesta en el chip. El diseño propuesto se muestra en la Figura 10.

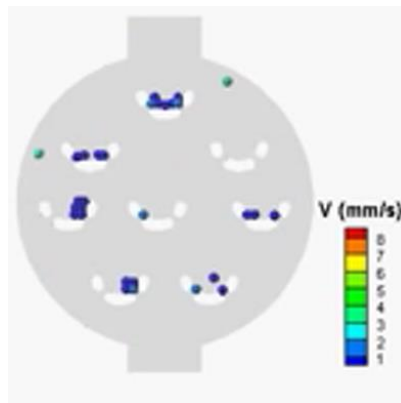


Figura 9. Trampa hidrodinámica propuesta en [11].

Para lograr que las células se quedaran atrapadas, utilizaron células 3T3 como un sistema, donde calcularon el movimiento de cada célula por el método de Lagrange para observar la interacción de las células. Solo consideraron que las células tenían interacción cuando estaban atrapadas y sedimentadas.

La geometría de la Figura 10 se diseñó el 2D para luego ser extruida y obtener en diseño microfluídico en 3 dimensiones. Esta cámara contiene de 8 a 9 trampas en forma de U. Para la fabricación de las trampas en forma de U se utilizó PDMS y la estructura se fabricó por moldeo de litografía blanda (soft lithography). El PDMS fue moldeado sobre una oblea de silicio utilizando transparencias de alta resolución con una máscara para definir las estructuras de los microcanales. Los moldes se calentaron en una placa caliente (hot plate) a 150°C durante 1 min para endurecer y para extender la vida útil del molde, luego se vertió el PDMS en el molde con un espesor de 5mm y se calentó a 80°C durante 30 min. Después del calentamiento, el dispositivo de PDMS fue despegado el molde y los orificios de entrada y salida fueron perforados. Posteriormente se limpiaron con isopropanol para eliminar residuos y se secó con un flujo de nitrógeno.

Los canales de entrada y salida tienen una dimensión de $40\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$. Estas entradas y salidas se conectan a una cámara circular de $400\mu\text{m}$ de diámetro. Las trampas que están dentro de la cámara tienen una geometría semicircular de $80\mu\text{m}$ de diámetro, $20\mu\text{m}$ de ancho y $40\mu\text{m}$ de alto con dos aperturas de $8\mu\text{m}$.

Para efectos de la simulación se utilizó una concentración de células de 5×10^6 ml, una velocidad máxima de $1\mu\text{l}/\text{min}$ y un diámetro de célula de $10\mu\text{m}$ suspendida en una solución acuosa, corriendo la simulación por un tiempo de 90s como se observa en la Figura 11. La máxima capacidad de captura se logra a los 60s, ya que a partir de este tiempo las colisiones elásticas entre células hacen que se salgan de la microcámara donde están atrapadas. El medio en el cual fueron suspendidas las células está compuesto de 10% de suero de bovino fetal. En la preparación de la captura, 10ml de células pasadas fueron transferidas a un tubo cónico de 50ml y se centrifugaron suavemente a 2000 rpm por 5 min y se re-suspendieron en 5ml en PBS (solución salina de fosfato) con un pH de 7.4. El flujo de células se inyectó al diseño microfluídico por un periodo de 90 segundos utilizando una jeringa a una tasa de flujo volumétrico de $1\mu\text{L}/\text{min}$. Las células se contabilizaron usando un microscopio de luz invertida después de que las células quedaron atrapadas dentro de las trampas.

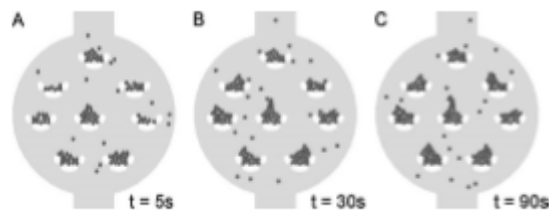


Figura 10 Resultado de la simulación para diferentes tiempos [11].

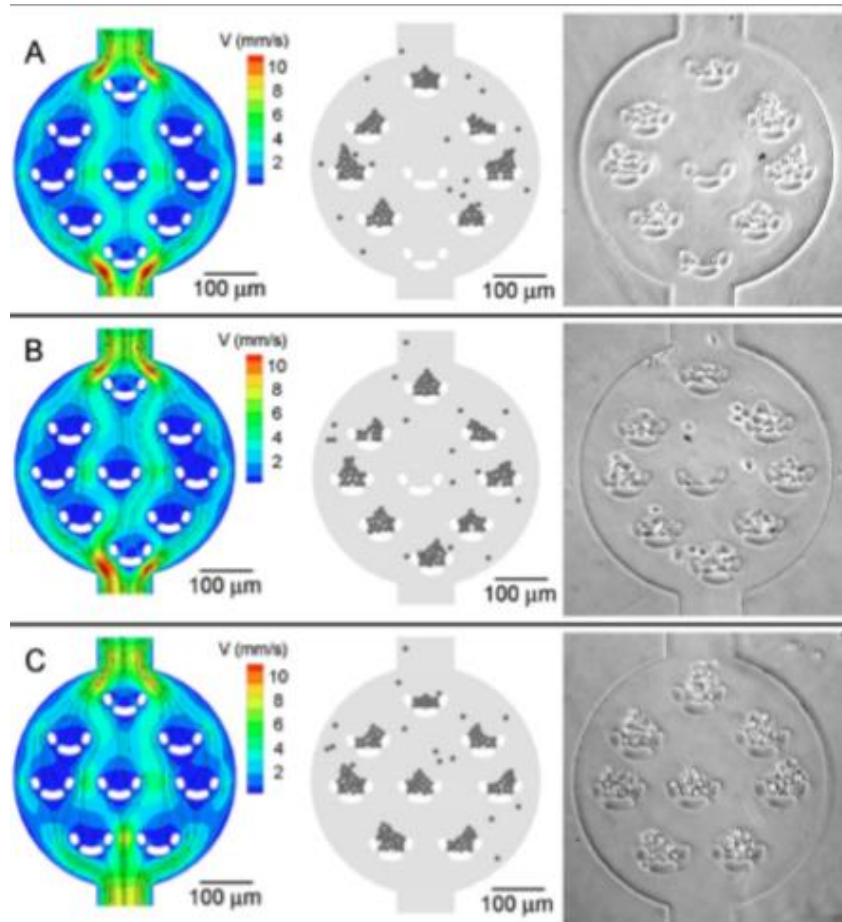


Figura 11. Comparación de la simulación y los datos experimentales de microcámaras con diferentes disposiciones de dos aperturas de captura de tamices forma de U: a) tamiz A en forma de U, b) tamiz B en forma de U, c) tamiz C en forma de U con apertura dual [11].

La Figura 12 muestra las microcámaras; el panel izquierdo muestra contornos magnitud de la velocidad del fluido y líneas de corriente de flujo, en el panel central muestra el estado final de las células atrapadas como resultados de cada simulación en los tres cámaras diferentes, y el panel derecho muestra el estado final de las células atrapadas como resultados de cada experimento en las tres diferentes cámaras.

En la Figura 12a) los investigadores mostraron los nueve tamices en forma de U, donde éstos están dispuestos simétricamente a través de la cámara. Allí las células fluyeron, aunque esta disposición hace que las células se acumulen en los tamices periféricos dejando los tamices centrales vacíos. Al cambiar la disposición de los tamices, moviendo los dos tamices inferiores más próximos a la salida de la cámara $10\mu\text{m}$ a la izquierda y a la derecha, como se muestra en la Figura 12b), se logró el confinamiento de células en todos los tamices excepto en el tamiz del centro. En la Figura 12c) se retiró la trampa más cercana a la salida de la cámara, la posición de las trampas de la tercera fila se restauró con respecto a la configuración del caso A, y la trampa de la parte superior más cercana a la entrada se desplazó $10\mu\text{m}$ hacia abajo. Con esta configuración de la Figura 11c) se mostró una buena correlación entre los resultados simulados y el confinamiento experimental con las células 3T3; este resultado mostró una captura eficiente de una pequeña población de células en cada trampa.

Este dispositivo microfluídico sobresale de los otros dispositivos microfluídicos, ya que permite realizar una captura de un grupo de células manteniendo un fluido constante, esto no lo han logrado los demás diseños debido a que se basan en la captura de una única célula.

Sin embargo, la aglomeración de las células en las regiones en forma de U es desfavorable para las células, ya que al estar todas agrupadas se reduce rápidamente los nutrientes y por lo tanto la oxigenación, ocasionando que mueran las células por necrosis o apoptosis. El tiempo máximo de captura de las células en las cámaras en forma de U es hasta 60s. Otra desventaja es el proceso de fabricación, el cual es un proceso costoso, ya que utilizan técnicas de moldeo sobre una oblea de silicio utilizando alta resolución.

Otro diseño relevante para el estudio de esta tesis es reportado en [12], donde se propone la captura de un simple célula mediante la dinámica de fluidos utilizando una trampa hidrodinámica. Este dispositivo microfluídico consiste en una geometría de dos canales colocados transversalmente, donde dos corrientes laminares opuestas convergen generando así un punto de estancamiento del fluido. Esto genera un punto de velocidad cero justo donde se interceptan los dos microcanales, quedando atrapada la célula. Para la verificación de esta hipótesis utilizaron un algoritmo de control de retroalimentación implementado en LabVIEW. La Figura 13 muestra el esquema del dispositivo microfluídico que implementado para atrapar la célula.

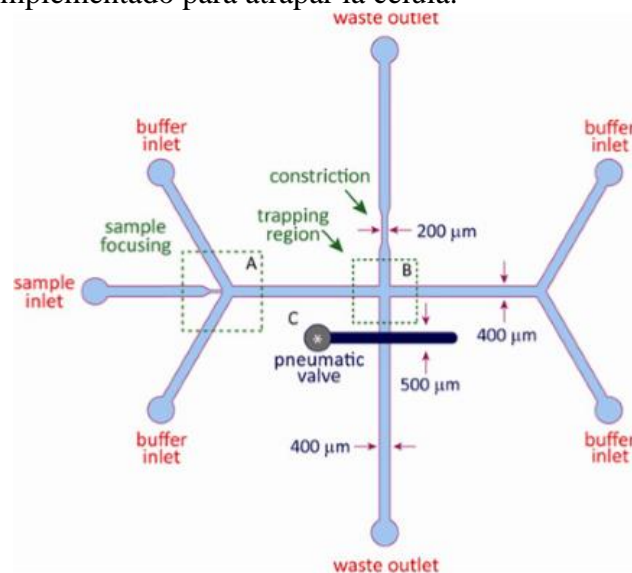


Figura 12. Esquema de dispositivo microfluídico con trampa hidrodinámica [12].

Este dispositivo consta de 4 entradas y una entrada para la muestra y dos salidas de residuos. El sistema de control consiste en una válvula de membrana neumática situada justo en la parte superior de uno de los canales de salida, como se muestra en la Figura 13. El fluido de la salida opuesta proporciona una presión de desplazamiento hacia el canal donde está la válvula. En la zona A los fluidos entrantes llegan a la zona B donde se encuentran las corrientes opuestas y convergen los fluidos en el cruce transversal del microcanal, quedando atrapadas. El punto de estancamiento es modulado mediante la

regulación de la presión que debe ejercer la válvula para mantener un fluido opuesto y seguir generando el estancamiento.

La solución de muestra para la experimentación consiste en una suspensión de partículas (por ejemplo, perlas de poliestireno fluorescentes). Se hizo pasar 1ml de solución y para la entrada con la muestra experimentaron con 250 μ l. En las 4 entradas a la solución se le añadió 0.02% v-v de Triton X-100. Para la fabricación del dispositivo se utilizó la técnica del moldeado, con PDMS como material de fabricación. Para el proceso de fabricación se utilizó un molde de silicio en cual resulta costoso. Además, al incluir la válvula, requiere un sistema de control para mantener la presión.

Este diseño presenta una captura eficaz y la geometría permite la colocación de los electrodos necesarios para la medición de impedancia, sin embargo está físicamente diseñado para atrapar sólo una célula.

Un estudio de relevancia fue el desarrollado en [13], donde se reporta un dispositivo microfluídico para capturar una célula HeLa (human cervical epithelioid carcinoma) en un canal para caracterizar la célula por medio de espectroscopía de impedancia. El diseño se fabricó utilizando PDMS con un molde de SU-8 para los canales y los micropilares; los electrodos se colocaron en un sustrato de vidrio donde se colocaron los electrodos.

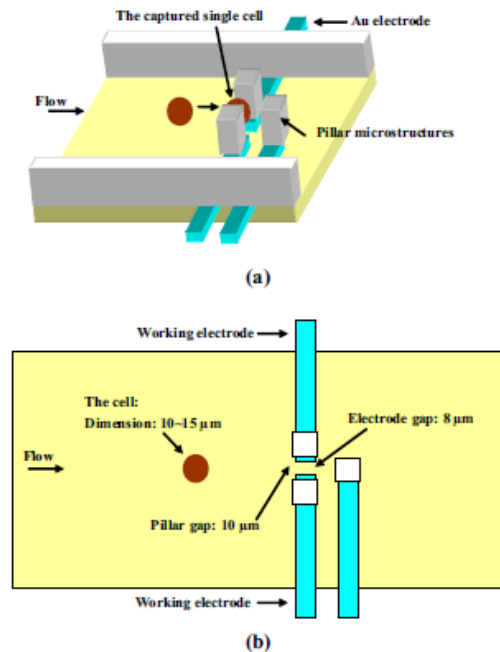


Figura 13. a) Esquemático del dispositivo en 3D y el procedimiento de captura de la célula. b) esquema en 2D del dispositivo [13].

El ancho y la profundidad del microcanal son de 100 μ m y 25 μ m, respectivamente. El tamaño de los micropilares es de 10 \times 10 \times 25 μ m. Los electrodos fueron depositados en el sustrato de vidrio con una capa de 15nm de espesor de Cr y 65nm de espesor de Au. El

diseño que utilizaron para la captura y la medición de la impedancia de la célula HeLa se muestra en la Figura 14.a en 3D y 14.b en 2D.

La Figura 15 muestra la simulación realizada, donde existe una presión diferencial de 100Pa entre la entrada y la salida del canal. La velocidad máxima del fluido cerca de la región de los tres micropilares es de 0.026m/s. La probabilidad de captura de células se calculó a partir del porcentaje del ancho del canal, donde los vectores de velocidad del flujo entran en la trampa. De acuerdo con el campo de velocidad obtenido, la probabilidad de captura de células por tres micro pilares fue de alrededor de 10%.

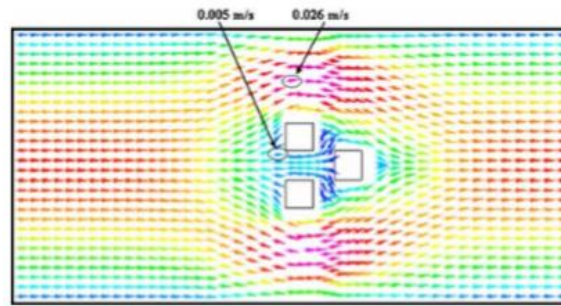


Figura 14. Campo de velocidades alrededor de los [13].

La solución utilizada como medio de cultivo para las células consistió en 90% de un medio esencial con BSS Eagle, 2mM L-glutamina, 1.5g/l bicarbonato de sodio, 0.1 nM aminoácidos no esenciales, y 1.0 mM de piruvato de sodio + 10% de suero fetal de bovino. La solución de células HeLa con una concentración de 2.25×10^5 células/cc se inyectó en el canal microfluídico usando una bomba de infusión a una velocidad de flujo de 5 ml/h. En la Figura 16 se muestra la captura de una célula HeLa así como la dirección del fluido. Una vez que se capturó la célula, la bomba de infusión se desconecta para permitir la medición de impedancia utilizando analizadores de impedancia de precisión.

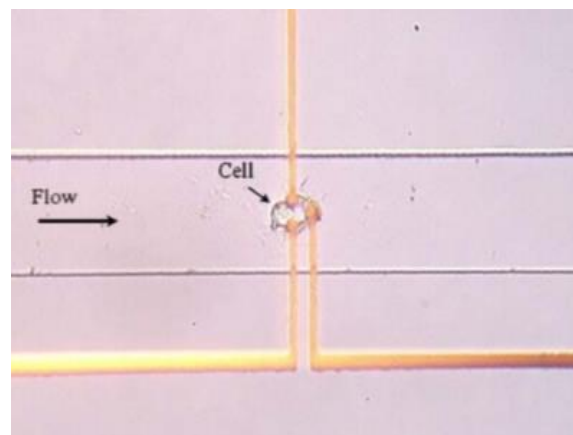


Figura 15. Célula HeLa atrapada [13].

El dispositivo microfluídico es óptimo para la medición de impedancia y fue fabricado utilizando un substrato de vidrio con micropilares de PDMS. Esto facilita la observación de la célula atrapada.

Con este dispositivo sólo es posible capturar y medir una única célula. Durante la medición se corta el paso del fluido.

En [14] se desarrolló un dispositivo microfluídico para el aislamiento de células tumorales circundantes (CTC). Estos investigadores utilizaron una línea celular de cáncer de esófago, KYSE220, dispersadas en un buffer de fosfato salino.

El proceso de fabricación del chip se muestra en la Figura 17. Resina fotosensible a la luz ultravioleta (UV) fue vertida en un molde cubierto con una placa de vidrio. Luego la resina se curó por exposición a luz UV a través de la placa de vidrio por 3 minutos. La suspensión de células fue introducida en los canales por medio del bombeo por jeringa.

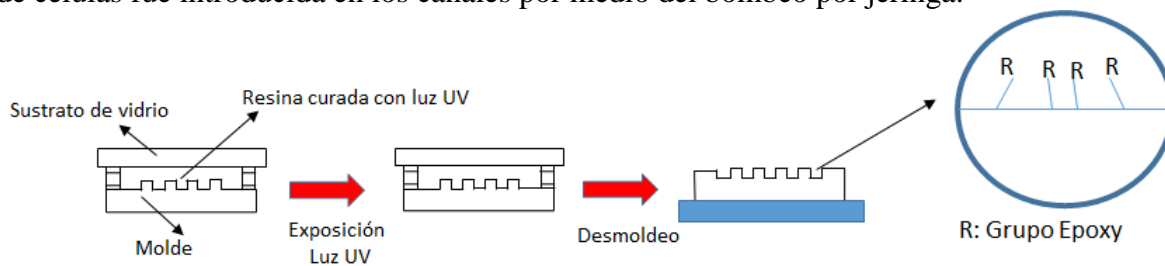


Figura 16. Método utilizado para la preparación del CTC-chip polimérico [14].

En el diseño incluyeron cerca de 30,000 micropilares los cuales están distribuidos a lo ancho del canal, según muestra la Figura 18a). El chip tiene un tamaño de 75x25mm; el diámetro y la altura de los micropilares es de 100 μ m (Figuras 18b y 18c).

Expusieron al chip con una solución de anticuerpo (Cy3), y observaron que el área de contacto se tornó brillante (figura 18d) esto le sugirió que la superficie del chip podría inmovilizar moléculas de anticuerpo.

La superficie de la interfaz con las células fue funcionalizada para lograr una mejor captura de las células. El primer anticuerpo utilizado es el IgG en una solución salina de fosfato (PBS) a una concentración de 20 μ g/ml durante una hora, luego el chip se expuso a otro anticuerpo humano EpCAM, igualmente en una solución salina de fosfato a una concentración de 20 μ g/ml reaccionando con los anticuerpos IgG.

El chip lo fijaron en un soporte como el mostrado en la Figura 19, donde se observan los dos puertos de entrada y salida del fluido. Luego de examinar la muestra lavaron el canal con PBS con el fin de eliminar las células suspendidas.

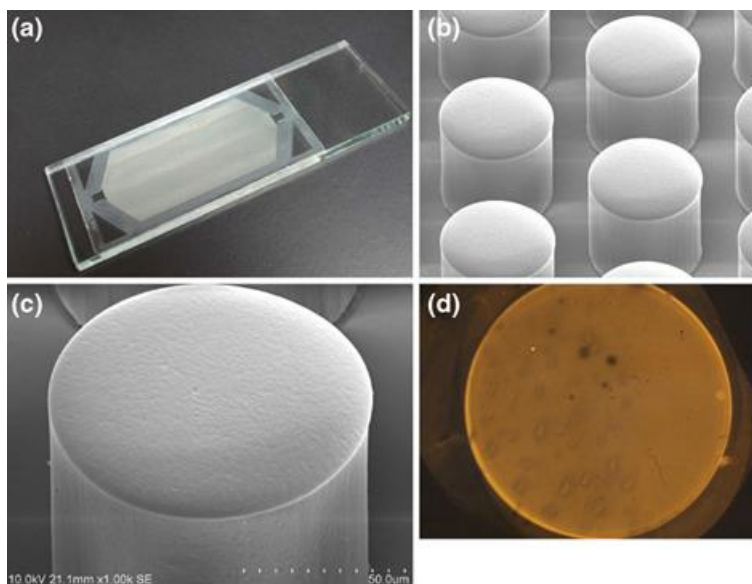


Figura 17. a) Imágenes del CTC-chip polimérico y anticuerpo inmovilizado en él. En b) y c) se observan los micropilares que constituyen la microestructura superficial, d) los anticuerpos inmovilizados se observan en la zona brillante [14].



Figura 18. El CTC-chip se encuentra en el soporte para la inyección de la muestra de líquido [14].

En primer lugar, realizaron las pruebas de flujo utilizando la suspensión de células en PBS (Solución de salina de fosfato), con y sin una capa de anticuerpo anti-EpCAM sobre la superficie del chip. En la Figura 20a) y 20b) se observan un gran número de células capturadas en los micropilares del chip debido al anticuerpo anti-EpCAM. En la Figura 20c) apenas se lograron observar las células, debido a que la superficie del chip solo se

revistió con el anticuerpo anti-IgG. Para este experimento utilizaron una concentración de células de 4×10^5 células/ml, con una velocidad del fluido de 1.5ml/h, durante 1 hora.

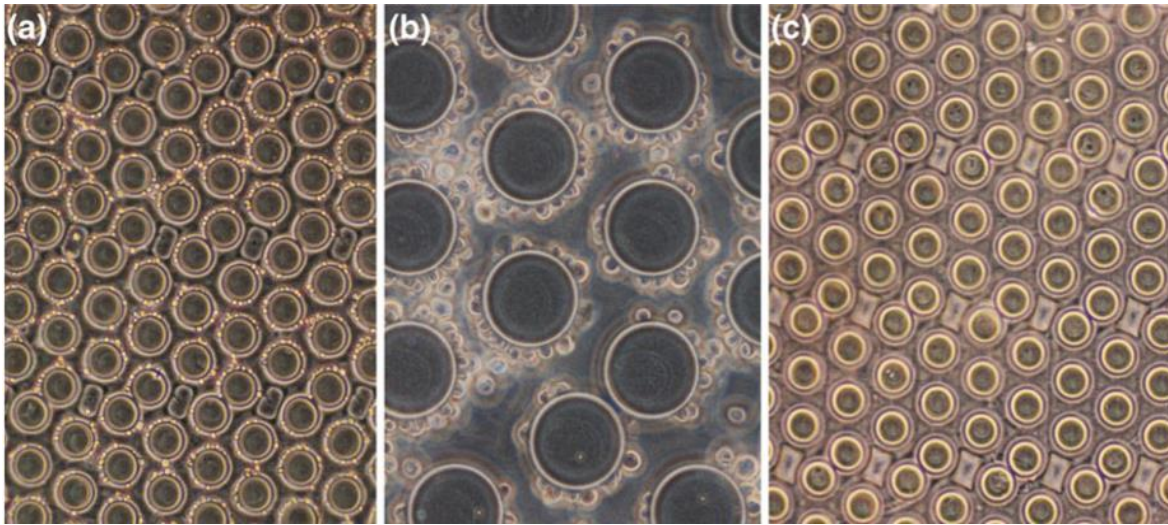


Figura 19. Imágenes del chip polimérico CTC después de la prueba de flujo con la suspensión de la línea celular de cáncer dispersa en PBS. a) Imagen del chip recubierto con el anticuerpo anti-EpCAM. b) Imagen ampliada del mismo chip como en a). Las pequeñas esferas capturadas en los grandes círculos (micropilares) son las células cancerígenas. c) Imagen del chip recubierto con el anticuerpo anti-IgG [14].

Debido a la transparencia del chip polimérico las células capturadas se pueden analizar por medio de microscopía óptica, utilizando contraste para la identificación de las células. La geometría del dispositivo permitiría colocar electrodos para la medición de la impedancia de las células confinadas.

La eficiencia en la captura de las células está relacionada con la concentración del anticuerpo.

Un informe registrado en el 2004 [15] muestra un método de fabricación de microestructuras para el confinamiento de células con la técnica PEG (poly ethylene glycol). El confinamiento de las células se realizó con un arreglo de micropocillos ubicados a lo largo y ancho del dispositivo microfluídico como se muestra en la Figura 21.

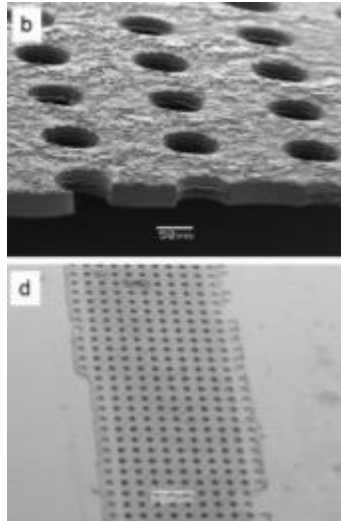


Figura 20. Micrografías electrónicas de barrido moldeadas PEG de los micropocillos [15].

Para fabricar los micropocillos, los moldes se alinearon en sustratos que había sido pre-estampados con microestructuras PEG. El sello PDMS se dejó reposar después del moldeo y el resto del sustrato fue tratado con plasma para permitir la adhesión del sustrato al molde de PDMS. El proceso se ilustra en la Figura 22; resalta aquí la capacidad del molde microfluídico elastomérico para sellar los canales a pesar de las diferencias topográficas entre la región de modelado y los alrededores.

Se utilizaron dos enfoques diferentes para generar los sustratos con diferentes características expuestos y no expuestos unas gotas de polímero PEG se distribuyeron de manera uniforme sobre el sustrato, mientras que para generar características con el sustrato expuesto unas pocas gotas de la pre-polímero se distribuyeron uniformemente en el sello PDMS como se observa en la Figura 22.

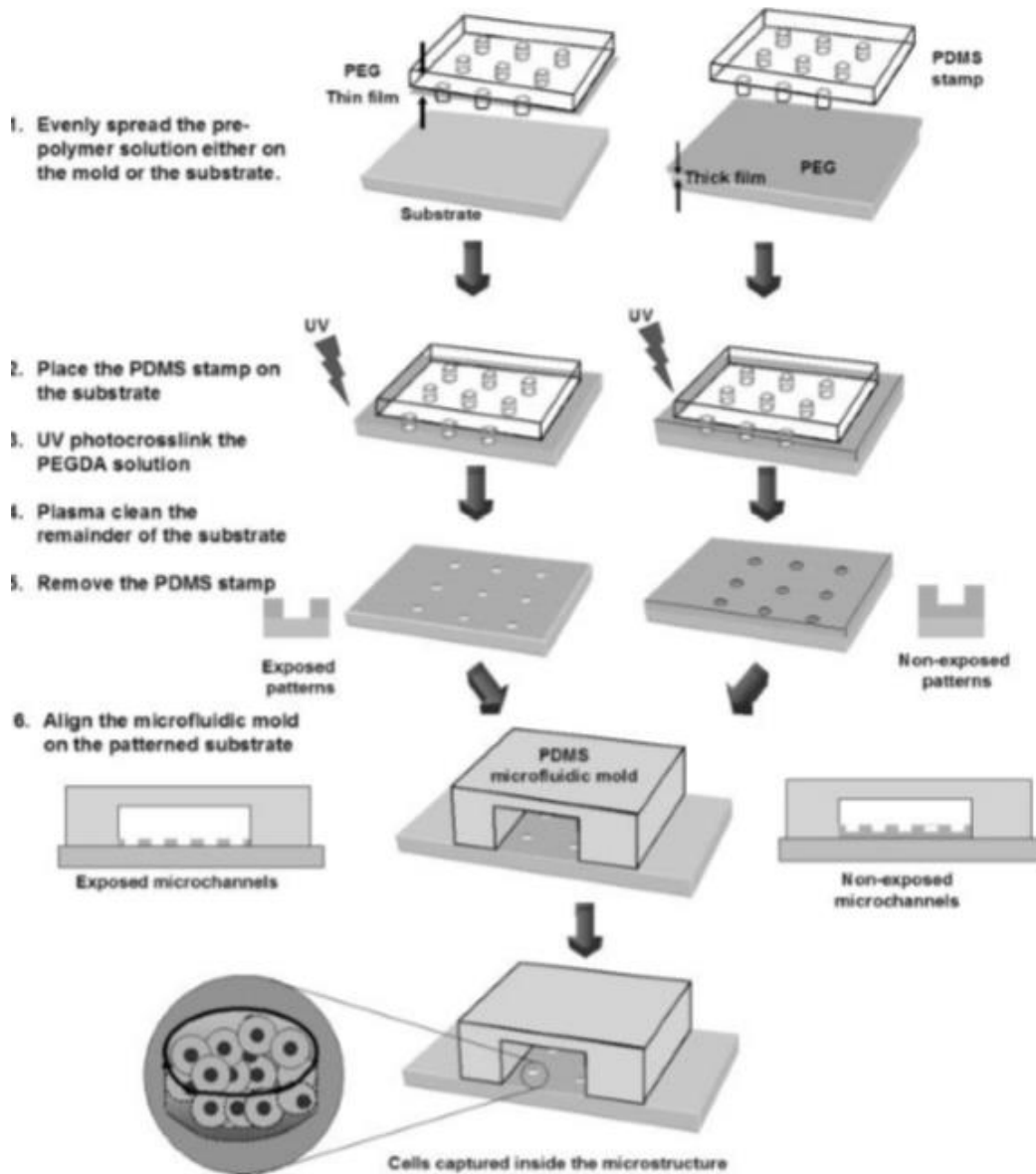


Figura 21. Esquema para la fabricación de microestructuras expuestas y no expuestas dentro de microcanales [15].

En todos los experimentos se estudiaron células madres embrionarias de ratón (ES) el cual fueron teñidas para ser visualizadas. Las células se mantuvieron en una cámara incubadora a 37 °C con un 5% de CO₂. El canal fue tratado con etanol (95%) para eliminar posibles burbujas de aire, y posteriormente expuesto con PBS durante 10min a una velocidad del fluido de 1μl/min. Para los estudios de adhesión celular se inyectó fibronectin (25 mg/ml) por 15 min. Las células se introdujeron en el canal y el flujo se detuvo para sedimentar las células en los micropocillos de 25μm de altura. Después de 10 minutos el flujo se reinició y se mantuvo a una velocidad de 1μl/min.

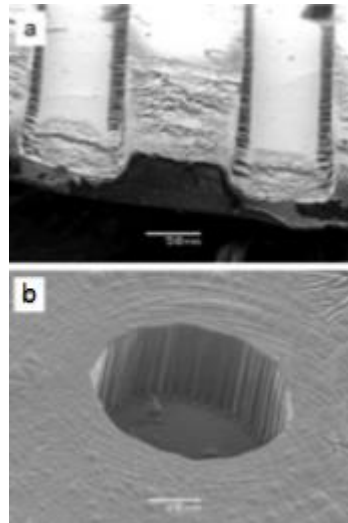


Figura 22. a) Micrografías de barrido electrónico de las ranuras moldeadas con la técnica PEG, b) patrones individuales de micropocillos circulares con una altura de $25\mu\text{m}$ [15].

En la Figura 23 se muestran las imágenes de los microcanales y de los micropocillos. En pruebas con células NIH-3T3, los sustratos tratados con anticuerpos adhirieron bien las células, según se observa en la Figura 24b) mientras que en los sustratos no tratados las células fueron completamente arrastradas a pesar de que fueron colocadas dentro de los pozos, como se observa en la Figura 24a).

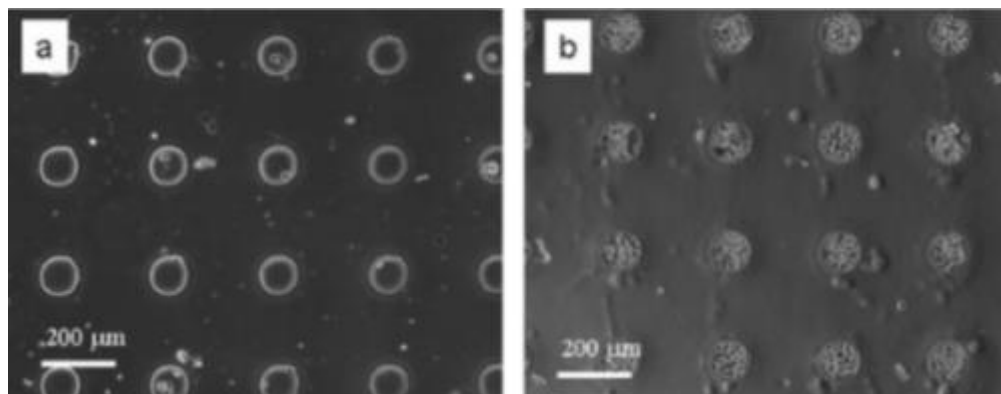


Figura 23. a) Diferencias entre el número de células atrapadas con sustratos no expuestos y b) con sustratos expuestos [15].

Para probar la capacidad de los microcanales para actuar como potenciales biorreactores y herramientas de análisis, las células se analizaron utilizando una variedad de técnicas. Para analizar la viabilidad celular y la capacidad de realizar reacciones enzimáticas, se hicieron fluir homodímero de etidio y calceína AM. Homodímero de etidio es un colorante de unión al ADN que tiñe la membrana de las células cuando la membrana está dañada. Por otro lado, la calceína es un compuesto que es transportado a través de la membrana celular y dentro de células vivas se transforma en calceína AM, una molécula verde fluorescente. Por lo tanto, las células 'vivas' se pueden visualizar de color verde, mientras que las células muertas se visualizan con color rojo. El 98% de las células NIH-3T3 que fueron

inmovilizadas dentro de los canales se mantuvieron vivas, identificadas con el colorante fluorescente verde, como se presenta en la Figura 25.

También se experimentó con células ES, las células ES son células madres embrionarias de ratón estas se inyectaron en del canal y, posteriormente, se tiñeron para la expresión de un marcador de células madre indiferenciadas, SSEA-1. Esto se obtuvo mediante la realización de un proceso de tinción de dos pasos: el medio que contiene el anticuerpo SSEA-1 se hizo fluir en el canal seguido por una solución que contiene el anticuerpo secundario, y luego de un medio no fluorescente para lavar la unión. Como se muestra en la Figura 25 c) y d), las células ES se tiñeron directamente dentro de las microestructuras. Aproximadamente el 95% de las células podría ser vista como resultado de la tinción con SSEA-1, que es similar a los resultados obtenidos cuando las células se tiñeron y circularon a través de un citómetro de flujo.

Estos resultados demostraron una potencial aplicación de la técnica para capturar las células para una amplia gama de aplicaciones posteriores tales como biorreactores y análisis, incluyendo la tinción de anticuerpos.

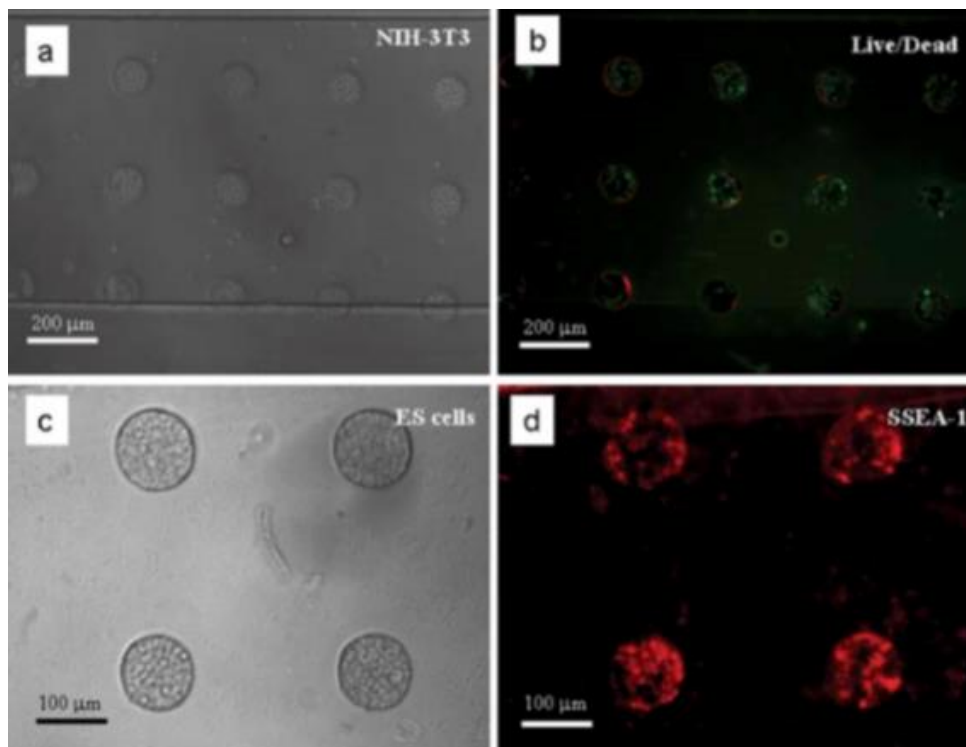


Figura 24. Células NIH-3T3 fueron inmovilizados dentro de micropocillos generados a partir de microestructuras de PEG. a) Micropocillos, b) Células viables, c) tinción con SSEA, d) Células dañadas [15].

Los micropocillos lograron realizar una captura eficiente de un grupo de células donde el método de fabricación obtiene microcanales robustos y tienen la versatilidad de estar o no expuestos a sustancias químicas para incrementar el porcentaje de capturas en los micropocillos, donde el dispositivo utilizado es transparente lo cual permite tener una

buena visualización de comportamiento del fluido y permite el estudio de las células con microscopios ópticos. La geometría utilizada permite colocar electrodos para un posible estudio de medición de impedancia de las células atrapadas.

Se requiere tratar la superficie para utilizar anticuerpos para lograr la adherencia de las células en los micropillos, de lo contrario las células se escaparían con el pasar del fluido.

El modelo A estudiado en esta tesis fue reportado en [16], donde se describe el desarrollo de un chip de cultivo de perfusión impulsado por presión para el ensayo de citotoxicidad paralela de medicamentos. El dispositivo se compone de un arreglo de 85 microcámaras para el cultivo de células con canales de perfusión independiente. La estructura de la microcámara fue diseñada cuidadosamente con consideración de los parámetros hidrodinámicos y se fabricó de un polidimetilsiloxano mediante el uso de fotolitografía de múltiples capas y moldeo de réplicas. La microestructura desarrollada permite la carga de célula uniforme y cultivo de perfusión sin contaminación cruzada entre las microcámaras vecinas.

Cada microcámara fue construida para tener un microcanal perfusión independiente con un diseño hidrodinámico único para la prevención de la contaminación cruzada entre microcámaras vecinos y para permitir una fácil extracción de burbujas de aire, la carga de célula uniforme, y cultivo de perfusión impulsado por presión a largo plazo en ensayos basados en células cuantitativos. Se utilizó el chip de cultivo de perfusión manejada con presión para un ensayo de citotoxicidad en paralelo de siete medicamentos contra el cáncer. El diseño de este modelo A se presenta en la Figura 26.

La matriz de 8 x 5 microcámaras se fabricó en un microchip de polidimetilsiloxano (PDMS) y se utilizó para investigar la citotoxicidad de siete medicamentos contra el cáncer utilizando análisis estadístico. El medio de cultivo, que contiene siete medicamentos contra el cáncer, y un medio de control se suministran a través de las cámaras de la Figura 26a) (lado izquierdo). La red de microcanales se conecta a partir de ocho cámaras de almacenamiento de medio a 40 microcámaras, y de las microcámaras a una cámara donde entran las células.

La figura 26b muestra la estructura de cada microcámara, y la Tabla I resume las dimensiones de cada componente de la microcámara. La microcámara se compone de un canal de medio de entrada de derivación (4-mm de profundidad), una microcámara de cultivo celular (180-mm de profundidad) con una estructura de terraza poco profunda (65 mm de profundidad), y un canal de ramificación medio salida/entrada de las células (65 mm de profundidad). El canal de ramificación medio de entrada es significativamente más estrecho que los otros canales, y así exhibe la mayor resistencia fluídica durante la perfusión.

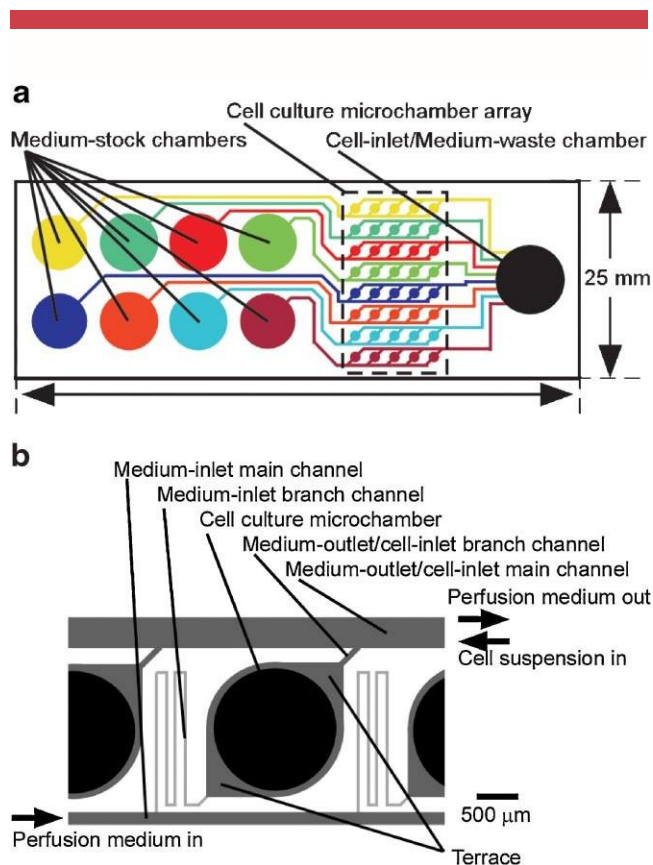


Figura 25. Esquema de la matriz de micro-cámara de cultivo de células en el chip cultivo de perfusión. a) Diseño de chips con la red de microcanales. b) Estructura de cada microcámara

Tabla 3. Dimensiones y parámetros hidrodinámicos de microcámara de cultivo celular [16].

	Medium-inlet main channel	Medium-inlet branch channel	Cell culture microchamber	Medium-outlet/cell-inlet branch channel	Medium-outlet/cell-inlet main channel
Profundidad (H) [mm]	65	4	180	65	65
Ancho (W) [mm]	100	30	1,43 mm de diámetro	50	250
Largo (L) [mm]	>15,000	6,500		210	>15,000
Velocidad promedio del flujo (U) [mm/s]	86	930	0.4	34	34
Tiempo de retención[s]	>180	7.0	2,600	6.2	>440
Esfuerzo cortante [Pa]	1.4	103	105	103	103
Diferencial de presión [Pa] ^a	6.1	$5 \cdot 10^3$	104	101	1.7
Re ($\frac{1}{4}rUD_{eq}/h$) ^b	102	102	104	103	103
Pe ($\frac{1}{4}LU/D$) ^c	10^4	10^4	6.2^d	10^2	10^4

Para la caracterización de flujo en la microcámara, se simuló el modelo A utilizando el Módulo de Ingeniería Química de COMSOL Multiphysics (versión 3.3a). Se calcularon los perfiles de velocidad de flujo. Como condición de frontera se consideró un perfil de velocidad de flujo homogéneo en la entrada, con una velocidad de flujo promedio de 930 mm/s. Presión cero y ausencia de deslizamiento se fijaron en el punto de conexión al canal de salida como condiciones de frontera.

En [16] se experimentó con células HeLa de carcinoma cervical humano, obtenidas de Riken Bioresource Center (Tsukuba, Japón), y se mantuvieron en un medio esencial mínimo de Eagle, suplementado con 10% de suero de bovino fetal a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Se recogieron las células HeLa después de la adición de tripsina y después se suspendieron en el medio de cultivo. La suspensión celular fue de $3,5 \times 10^5$ células/ml. La suspensión se inyectó y las células se cargaron en las microcámaras mediante la aplicación de 10 kPa.

El chip de cultivo de perfusión impulsado por presión totalmente ensamblado se muestra en la Figura 27. Los medios de cultivo se añadieron fácilmente a las cámaras utilizando una micropipeta (Fig. 27a). La cámara de almacenamiento medio se cerró con una tapa plana sujeta con una pinza o una banda de goma. Se aplicó presión a través de un filtro de aire de ventilación estéril (Fig. 27b).

Mediante el uso de una fuente de presión individual, ocho medios de cultivo diferentes fueron liberados de las cámaras, y ocho condiciones de cultivo diferentes fueron fácilmente creados en la matriz de microcámaras (Fig. 27c). Las ocho soluciones de colorante se introdujeron en la matriz de la micro-cámara sin contaminación cruzada y sin formación de burbujas. La Figura 27d) muestra una ampliación de cada microcámara. La intensidad de color indica la profundidad de la microestructura (4, 65, y 180 mm), lo que indica la fabricación exitosa de la matriz por fotolitografía de múltiples capas.

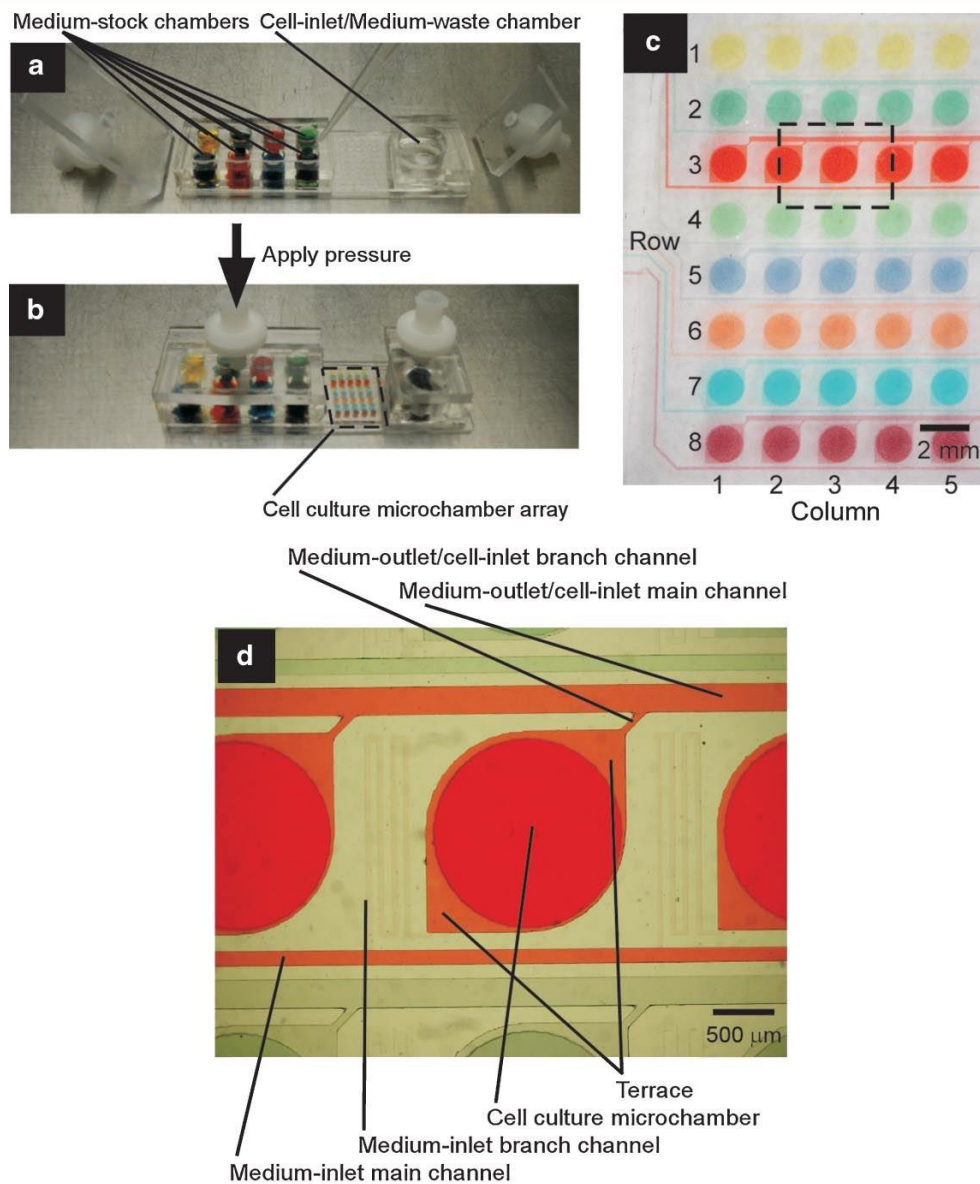


Figura 26. Carga de líquido utilizando chips de cultivo de perfusión impulsado por presión.

a) Se añadieron soluciones acuosas que contienen ocho tintes diferentes a las cámaras utilizando una micropipeta. b) Las soluciones se entregan mediante la aplicación de una presión de la fuente de presión externa única a través de un filtro de aire de ventilación estéril. c) Fotografía de la matriz de microcámaras. d) Ampliación de la microcámara. [16].

Las células HeLa se cultivaron en microcámaras durante 3 días (Fig. 28). Las células adheridas a la superficie de PDMS y crecieron durante el período de cultivo de 3 días, lo que indica que el cultivo de perfusión de chips con su pared PDMS permeable al oxígeno y su microcanal nutrición de alimentación alimentado a presión de la red son una tecnología aplicable para el análisis del crecimiento celular [16].

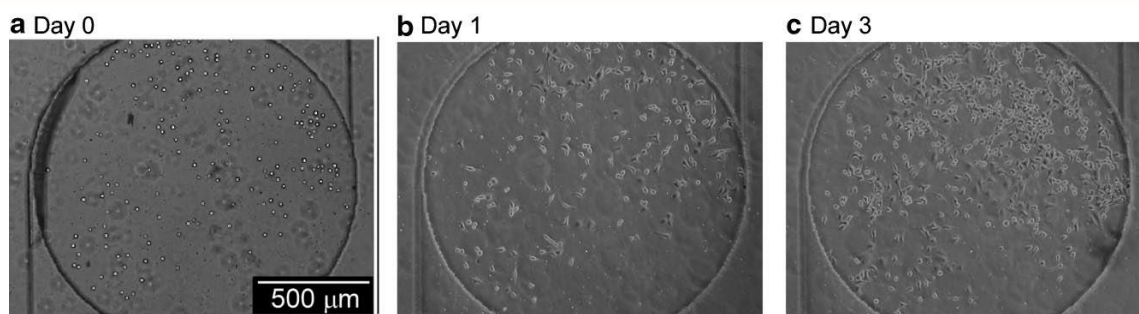


Figura 27. Crecimiento de las células HeLa en la microcámara. a) Después de cargar el celular. b) Después de 1 día de cultivo estático, las células se habían adherido a la superficie de PDMS. c) Después de 2 días de cultivo en perfusión, las células habían crecido en la microcámara [16].

La matriz de microcámaras de cultivo se utilizó para un ensayo de citotoxicidad en paralelo de siete medicamentos contra el cáncer. Después de 1 día de cultivo estático de las células HeLa en las microcámaras, cultivo de perfusión se llevó a cabo usando ocho medios de cultivo diferentes: siete medios contenían 100 ng/ml de cada medicamento contra el cáncer y un medio de control negativo. Después de 3 días de cultivo de perfusión, las células vivas se tiñeron con calceína-AM (Fig. 29a), y el número de células fue cuantificado fluorométricamente (Fig. 29b). También se analizó la citotoxicidad de los mismos medicamentos contra el cáncer usando una microplaca convencional (Fig. 29b).

Los datos de crecimiento de células obtenidos con la matriz de microcámara de cultivo de células mostraron buena concordancia con la obtenida con la microplaca, a excepción de la doxorubicina. Aunque los datos representados en la Figura 29b muestra la ligera diferencia de la inhibición del crecimiento de células de citarabina entre la microcámara y la microplaca, los autores concluyen que la diferencia está dentro del error experimental. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los experimentos para la inhibición del crecimiento de células de citarabina.

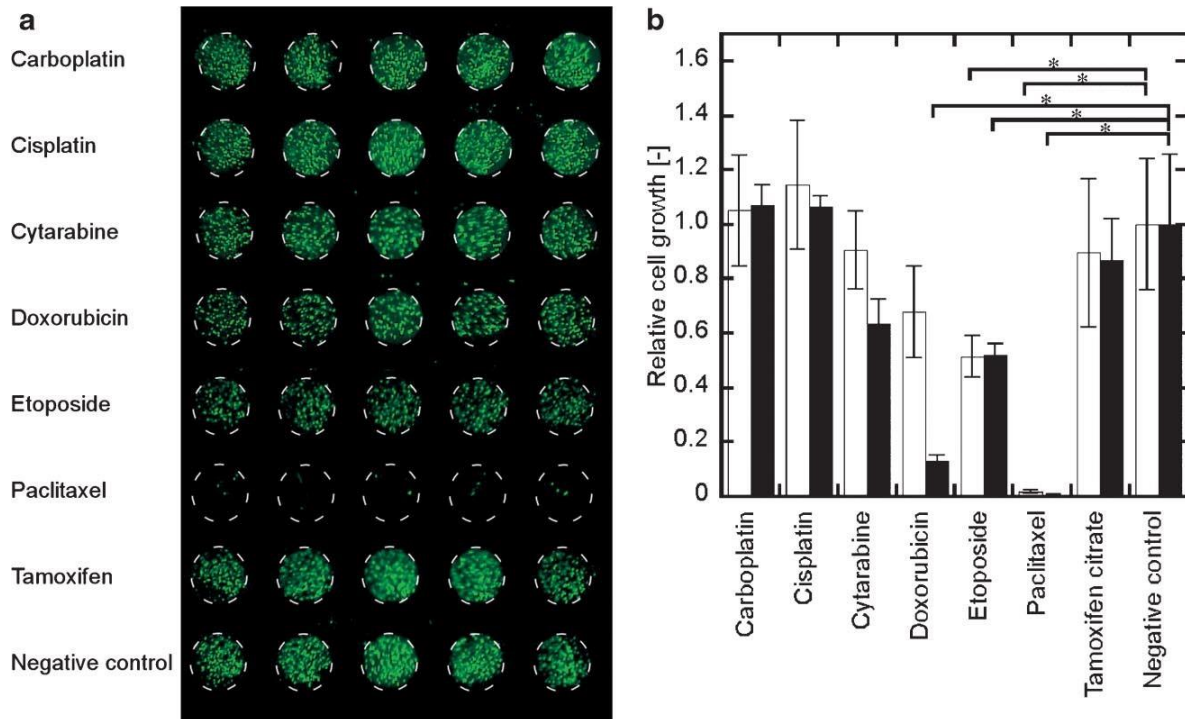


Figura 28. Fluorimetría para medición de crecimiento de células para el ensayo de citotoxicidad de drogas. a) imagen de microscopio fluorescente de la matriz de microcámaras tomada después del cultivo en medios tratados de manera diferente. b) Efecto de siete medicamentos contra el cáncer en el crecimiento celular evaluada utilizando la matriz de cultivo celular en la microcámara (blanco) y la microplaca (negro) [16].

El dispositivo facilita una fácil extracción de las burbujas de aire, la carga de célula uniforme, y el análisis de crecimiento de células cuantitativo. El chip cultivo de perfusión impulsado por presión permite la entrega simultánea de múltiples muestras líquidas y por lo tanto permite la evaluación simultánea de múltiples medicamentos. Este dispositivo cuenta con una interfaz sencilla de micropipetas que el cual utiliza solo una fuente de presión. El sistema de detección fluorométrica utilizada es compatible tanto con un lector de microplacas o un escáner de matriz. Estas características convenientes son ventajosas para un ensayo basado en células de alto rendimiento totalmente integrado en un microchip.

CAPITULO III

RESULTADOS

Se simularon 3 diferentes microestructuras microfluídicas con la finalidad de confinar un conjunto de células mediante determinadas características geométricas de cada diseño. Se simuló el comportamiento del fluido en los microcanales así como el comportamiento de las células por medio de COMSOL Multiphysics.

Primero se analizó cada dispositivo como medio de confinamiento de forma individual. Luego, al demostrar que el dispositivo confinaba eficientemente las células, se procedió a analizar el funcionamiento del mismo dispositivo en un arreglo de dispositivos en paralelo. Los modelos fueron implementados en la versión 5 de Comsol Multiphysics, donde el fluido considerado para realizar las simulaciones fue el agua debido a la similitud de sus características reológicas con el medio de cultivo. Para esto se utilizaron las propiedades del agua que Comsol ya calcula (tabla 4)

Tabla 4. Parámetros del agua utilizados en la simulación de los dispositivos microfluídicos de confinamiento de células.

Nombre	Valor	Unidad
Viscosidad Dinámica	$\eta(T[1/K])$	Pa*s
Densidad	$\rho(T[1/K])$	kg/m ³

Las partículas incluidas en la simulación representan las células. El diámetro escogido para las células es de 7 μ m considerando que este es el diámetro de un leucocito, una de las células más pequeñas del cuerpo humano.

El diseño geométrico se dibujó con la misma herramienta. Posteriormente en COMSOL Multiphysics, estos diseños geométricos se convierten en sólidos al proveer dimensiones específicas para cada modelo estudiado. Tras contar con la geometría, se seleccionaron las caras que funcionaron como entradas y salidas de agua, a las cuales también se les asigna la condición de frontera. La Tabla 5 resume las condiciones de frontera utilizadas en el modelo A.

Tabla 5. Condiciones de frontera para el modelo A.

Nombre	Valor	Unidad	Descripción
Vin	10	μ m/s	Velocidad de Entrada
Pout	0	Pa	Presion de Salida

MODELO A.

Este consta de una cámara la cual cumple la función del reservorio de las partículas; la cámara tiene una altura de 180 mm y un diámetro de 1,430 mm, la terraza tiene una profundidad de 65 mm. Para el análisis de esta estructura para su aplicación en espectroscopía de impedancia, se modificaron sus dimensiones: la cámara tiene una altura de 30 μm y un diámetro de 60 μm , la terraza tiene un grosor de 10 μm . Las dimensiones fueron modificadas debido a la dificultad de crear estructuras con una razón de aspecto alta, por lo tanto se buscó simplificar la fabricación y mejorar la reproducibilidad sin sacrificar el confinamiento. La Figura 30 muestra la geometría utilizada para simular este modelo.

En la Figura 30 se muestra las condiciones de frontera de entrada y de salida del fluido y de las partículas en el dispositivo microfluídico.

Según los resultados obtenidos, las dimensiones utilizadas para la simulación son adecuadas para el confinamiento. Si la altura del reservorio aumentara a un valor cercano o mayor que el radio del reservorio el campo de velocidad sería casi nulo en la cámara y al entrar las partículas seguirían la línea de campo de mayor intensidad. En este caso esa línea es la de salida y por lo tanto no habría confinamiento de las partículas, y éstas saldrían directamente. Es por esta razón que el radio del reservorio debe ser por lo menos 2 veces la altura del mismo.

Como se muestra en la Figura 31b), las líneas del campo de velocidad presentan una pequeña ondulación solamente en el área de la terraza, pero inmediatamente buscan la salida del dispositivo, por lo tanto, las células harán este mismo recorrido. Para otras razones de aspecto del reservorio, aunque la velocidad en el fondo es cero, las células no se asientan o acercan al fondo sino que siguen la trayectoria de mayor velocidad y por lo tanto no se logra el confinamiento. Este comportamiento se empieza a observar para una altura de 50 μm y un radio de 60 μm ; a partir de estos valores ya se deja de observar confinamiento.

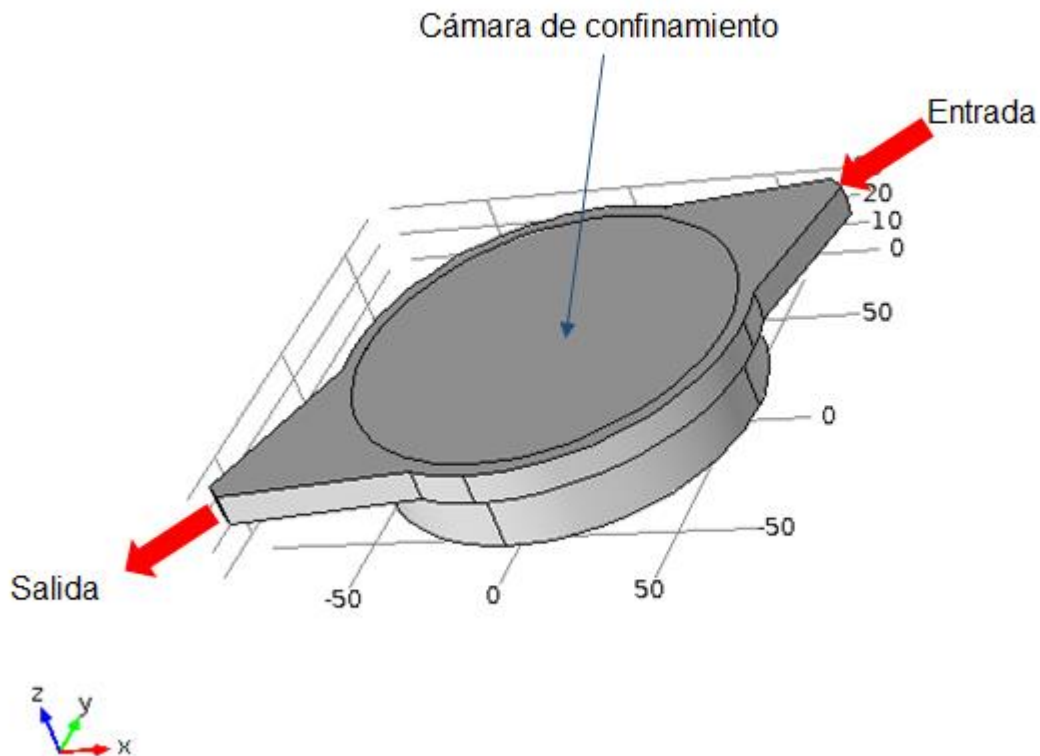


Figura 29. Geometría del modelo A.

En la Figura 31 se puede observar la distribución de velocidades. Las líneas rojas representan el campo de velocidad y los cortes transversales indican la magnitud de la velocidad. El color azul representa una velocidad nula o casi nula mientras que el color amarillo representa una velocidad intermedia y el color rojo representa la máxima velocidad existente en todo el sistema.

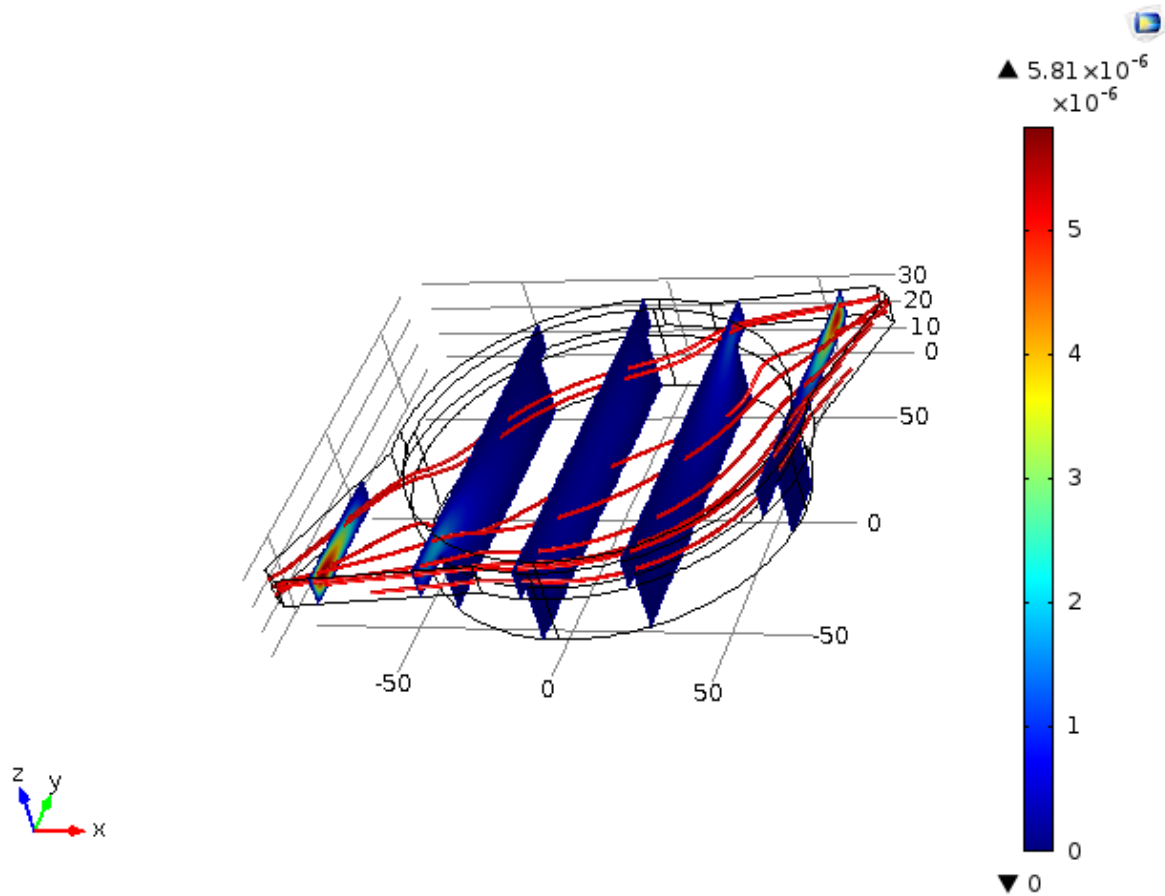


Figura 30. a) Magnitud de velocidad (m/s). Las líneas representan el campo de velocidad.

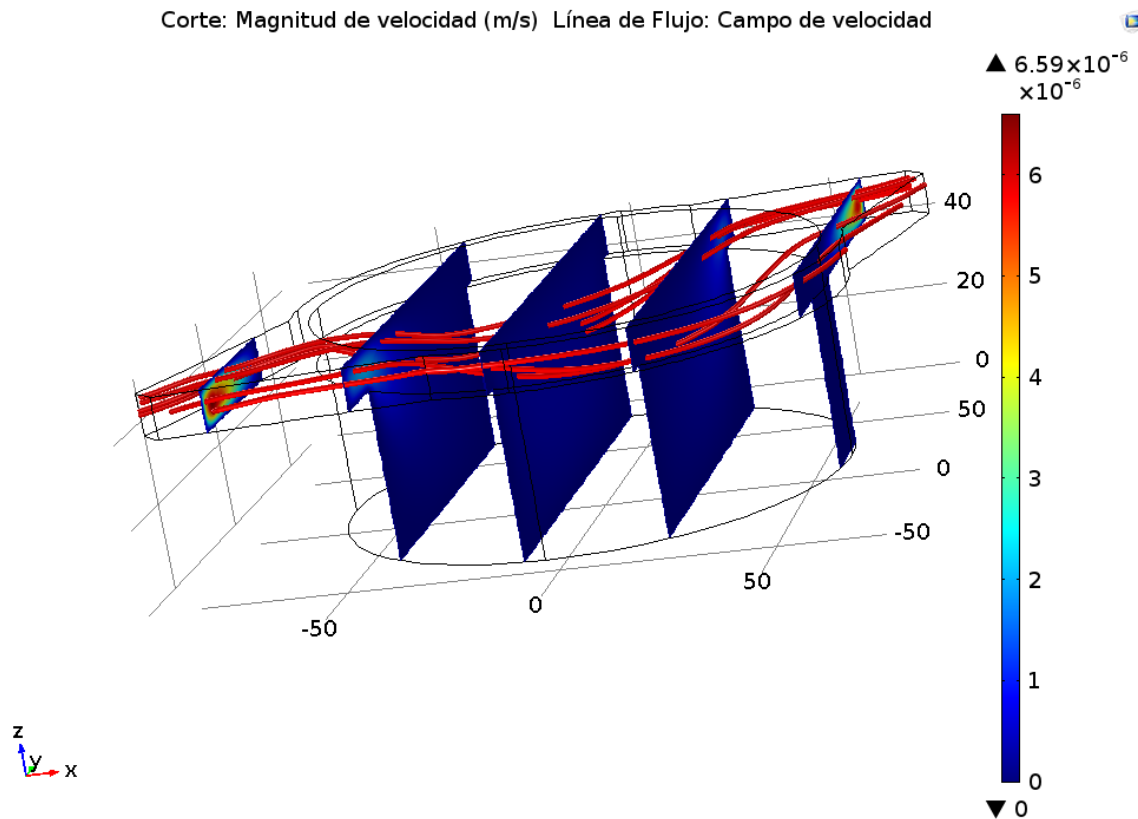


Figura 31b). Magnitud de la velocidad y líneas del campo de velocidad para una altura de $50 \mu\text{m}$ y un radio de $60 \mu\text{m}$

Para conocer la eficiencia del modelo A para la aplicación de confinamiento se hizo uso de la herramienta COMSOL Multiphysics y su módulo tracing particle; esta física cuenta con una herramienta de conteo de partículas. Para esto se seleccionó el área o dominio donde se desea contabilizar las partículas confinadas en el tiempo final de la simulación. Una vez seleccionado el dominio puede añadirse en la sección de estadísticas de partícula la expresión `<phys>.Nsel`. Esta expresión da el número total de partículas en la sección seleccionada donde se quiere contar. Para un tiempo de 3000s el número de partículas confinadas fue de 167 de un conteo inicial de 200.

Con el fin de conocer la trayectoria de las partículas se realizó un gráfico que representa la posición de la partícula en una sección transversal del dispositivo. El mapa de Poincaré se muestra en las Figuras 32 y 33. Este mapa muestra la posición de las partículas en el eje z y se obtuvo haciendo un corte transversal del plano xy, como se muestra en la Figura 32. En este caso se selecciona la opción de graficar el mapa de Poincaré en 3D. En la Figura 32 se representa el mismo corte transversal seleccionado para la Figura 33 en el mismo plano de Poincaré pero esta vez en 2D. El color celeste de las partículas en el diagrama de Poincaré indica una expresión lógica de la posición de la partícula en un tiempo seleccionado.

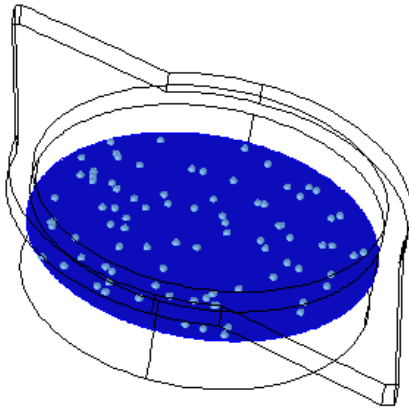


Figura 31. Mapa de Poincaré en 3D para el modelo A.

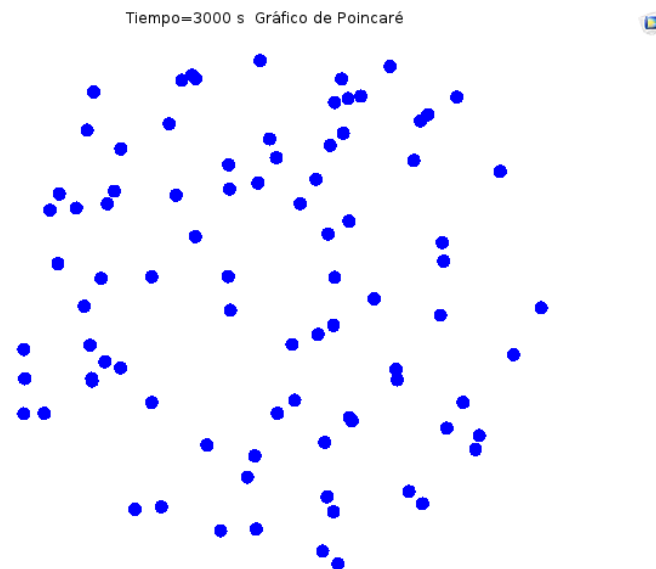


Figura 32. Mapa de Poincaré en dos dimensiones para el modelo A.

Con el fin de analizar el confinamiento con varios dispositivos en serie se procedió a realizar un arreglo con la geometría representada en la Figura 34. En la Figura 34 se muestra la propuesta de la posible conexión de 6 dispositivos que comparten la misma entrada del fluido y la misma salida.

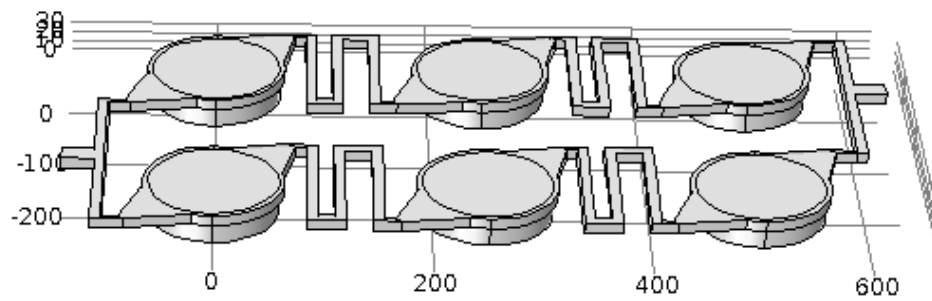


Figura 33. Arreglo geométrico de 6 dispositivos microfluídicos.

En la Figura 35 se ejemplifica la condición de frontera para la entrada y salida del fluido, la cual es la misma para las partículas, según se resume en la Tabla 6, y se muestra el arreglo de 6 dispositivos para funcionar como cámaras de confinamiento.

Tabla 6. Condiciones de frontera para el modelo microfluídico A.

Nombre	Valor	Unidad	Descripción
V_{in}	200	μm/s	Velocidad de Entrada
P_{out}	0	Pa	Presión de Salida

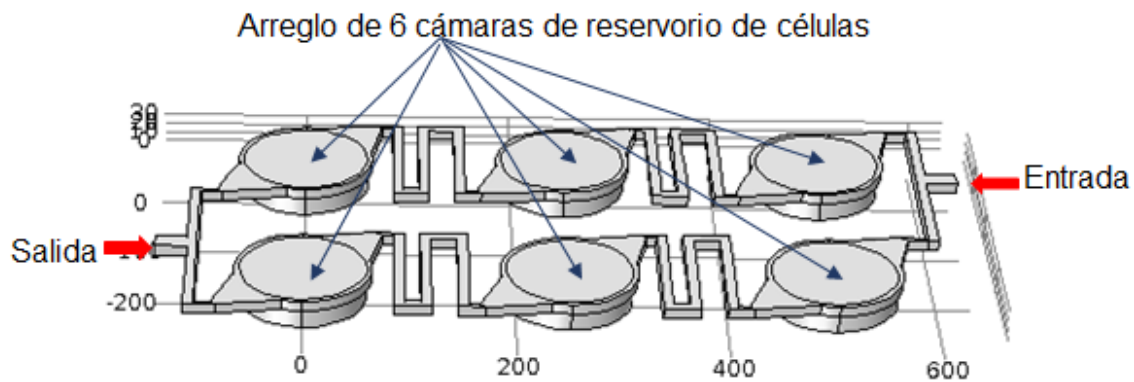


Figura 34. Condiciones de frontera para el Modelo A.

Nuevamente se utilizó el conteo de partículas para cada reservorio individual en el mismo tiempo. Se dibujó el plano de Poincaré para conocer la trayectoria exacta de las partículas en un tiempo de 1500 s. Las Figuras 36 y 37 muestran el mapa de Poincaré en 3D y en 2D, respectivamente.

En este arreglo se introdujeron 2000 partículas. Mediante el conteo se determinó que en $t=1500s$ hubo un confinamiento de 1116 partículas repartidas en los 6 dispositivos

Tiempo=1500 s Gráfico de Poincaré

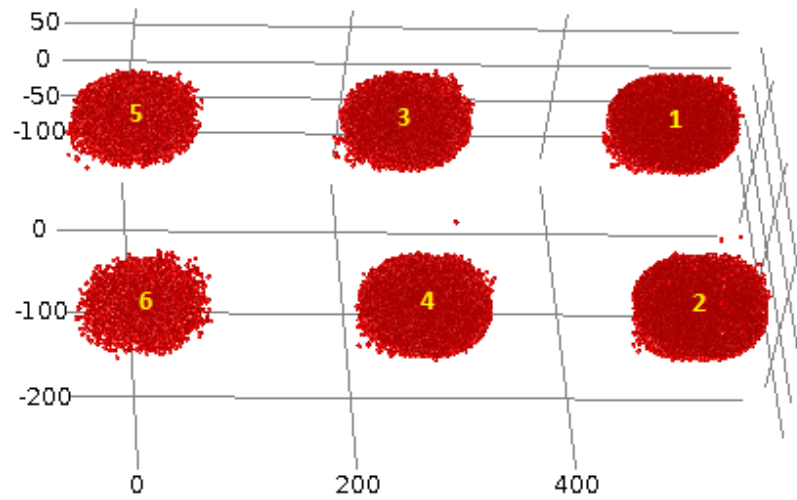


Figura 35. Diagrama de Poincaré 3D para un tiempo de 1500s.

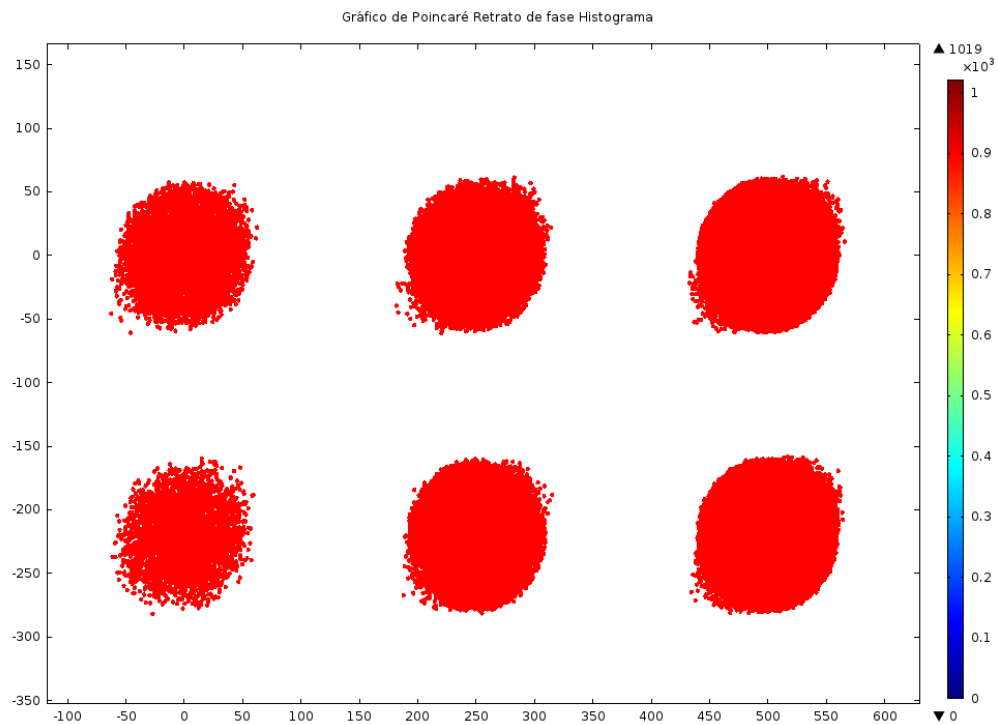


Figura 36. Diagrama de Poincaré 2D para el modelo C

MODELO B

El concepto del modelo B se describe en [17], a partir del cual se completó y modificó el dimensionamiento, dando como resultado las dimensiones indicadas en las Figuras 38 y 39.

Consiste en 3 cámaras donde cada una de esas cámaras tiene sus entradas y salidas conectadas en paralelo entre sí. Este dispositivo consta de 5 capas, como se muestra en la Figura 40. Para lograr el confinamiento se requiere crear un perfil de velocidad nulo; este efecto se logra con la conexión en paralelo de todas las entradas y todas las salidas. El fluido siempre buscará la salida pero a la vez se encontrará con la entrada del mismo fluido. Esto crea una convergencia de ambos y en este proceso se generan puntos de velocidad cero donde se logra el confinamiento. Así se logra el confinamiento en un dispositivo de una sola entra y una sola salida del fluido.

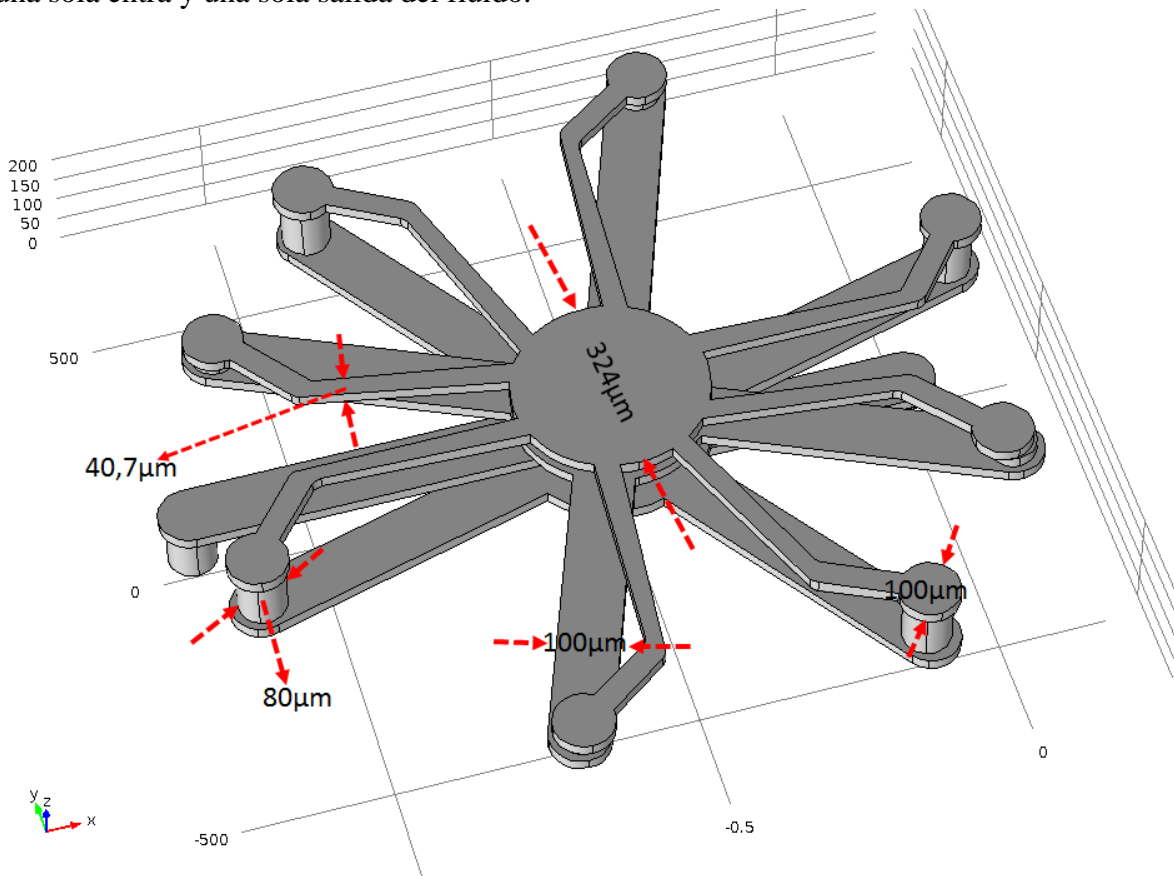


Figura 37. Geometría del modelo microfluídico B, basado en [17].

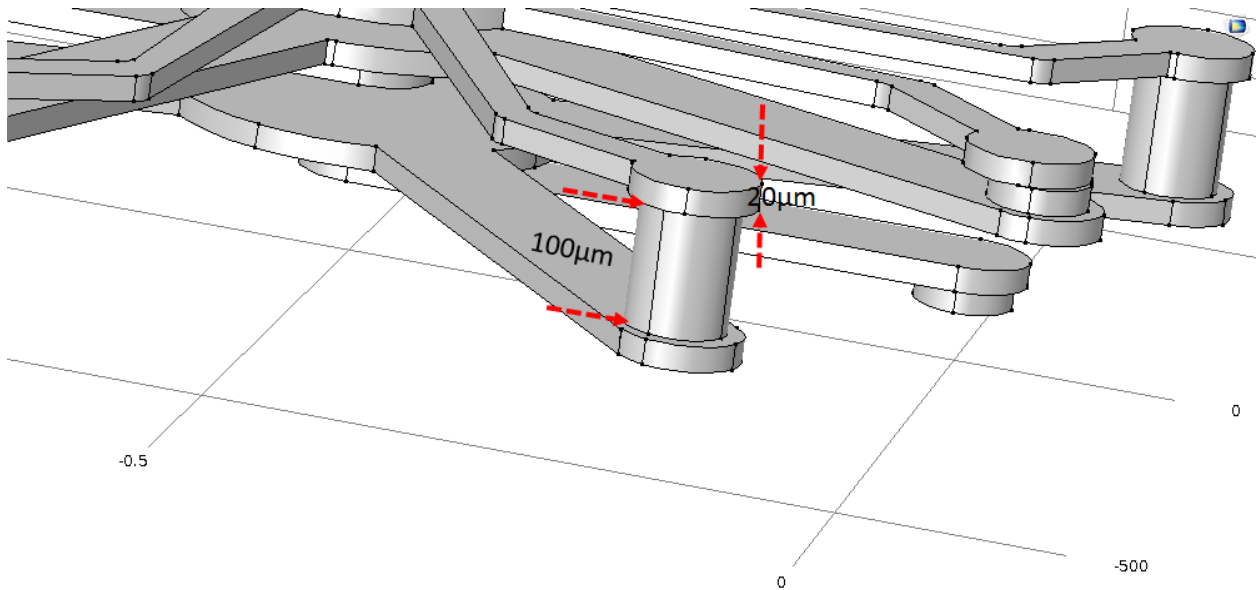


Figura 38. Dimensiones de la vista lateral de la microestructura del dispositivo B, basado en [17].

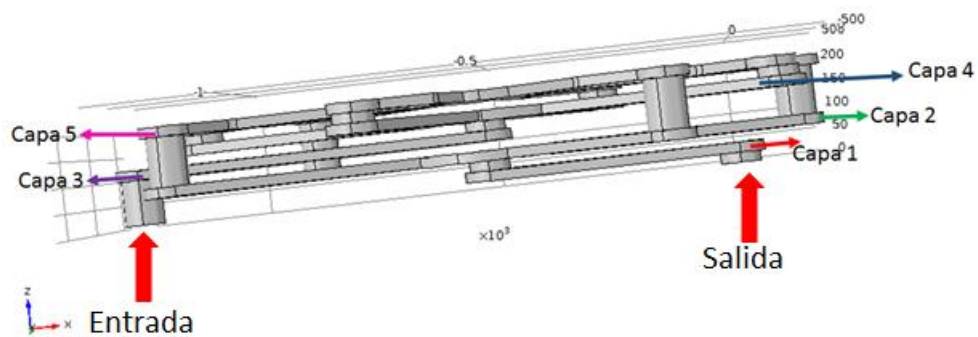


Figura 39. . Capas de la microestructura del dispositivo microfluídico B, basado en [17].

El fluido considerado para la simulación fue el mismo utilizado en el modelo A y sus parámetros corresponden a los mostrados en la Tabla 4. Las condiciones de frontera utilizadas en el modelo B se especifican en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de Frontera del modelo microfluídico B.

Nombre	Valor	Unidad	Descripción
Vin	50	$\mu\text{m/s}$	Velocidad de Entrada
Pout	0	Pa	Presión de Salida

La complejidad de esta geometría generó problemas de mallado, por lo que fue necesario utilizar un mallado tetraédrico en toda la geometría y realizar ajustes a la malla con el fin para optimizarla para el solucionador. Los parámetros utilizados para el mallado se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Características del mallado del modelo microfluídico B.

Propiedad	Valor
Calidad mínima de elemento	0.01018
Calidad media de elemento	0.6344
Elementos tetraédricos	82359
Elementos triangulares	25682
Elementos de arista	5926
Elementos de vértice	924

La magnitud de la velocidad del fluido se representa en la Figura 41. Los cortes transversales en los canales de la geometría indican la velocidad del fluido. Se puede observar que en la cercanía de las paredes de los canales la velocidad es más baja que en el centro del canal, donde se perfila una velocidad mucho mayor. Por otra parte, las líneas rojas en la Figura 42 permiten visualizar el campo de velocidad. El fluido entra por el contorno de la tercera capa para pasar a la cuarta capa, distribuyéndose por medio de los microcanales y posteriormente subiendo a la quinta capa para luego bajar a la segunda capa en busca de la frontera seleccionada como la salida del fluido que se encuentra en la primera capa. Con el arreglo de entradas y salidas en paralelo se busca jugar con la dinámica de fluidos para obtener perfiles de velocidades nulas en las cámaras y en ciertos microcanales con el fin de que las partículas queden atrapadas al experimentar fuerzas nulas o casi nulas, como se muestra en la Figura 43.

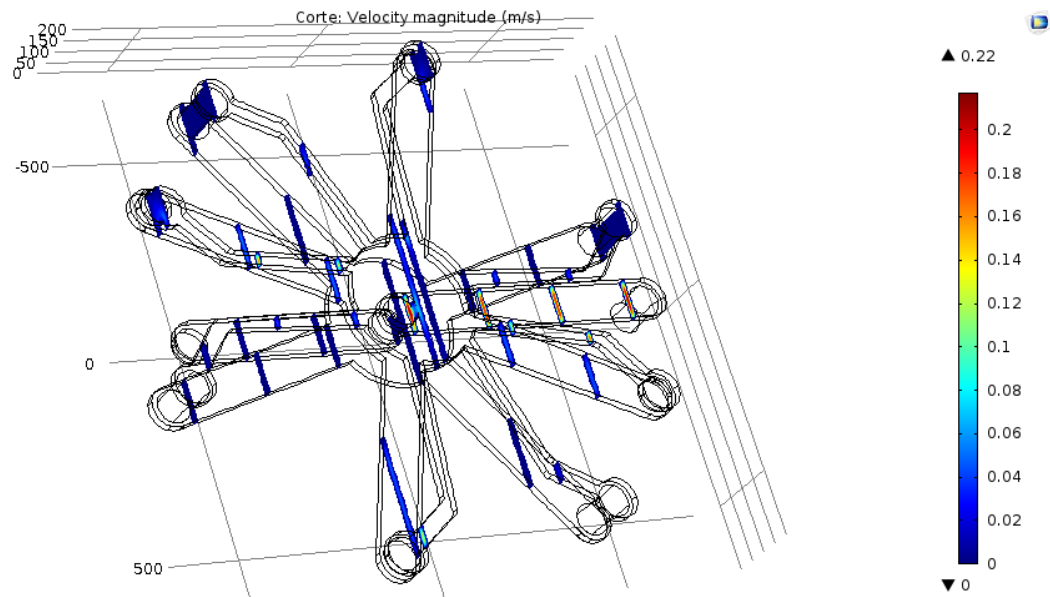


Figura 40. Magnitud de la velocidad (m/s) y frentes de velocidad cero.

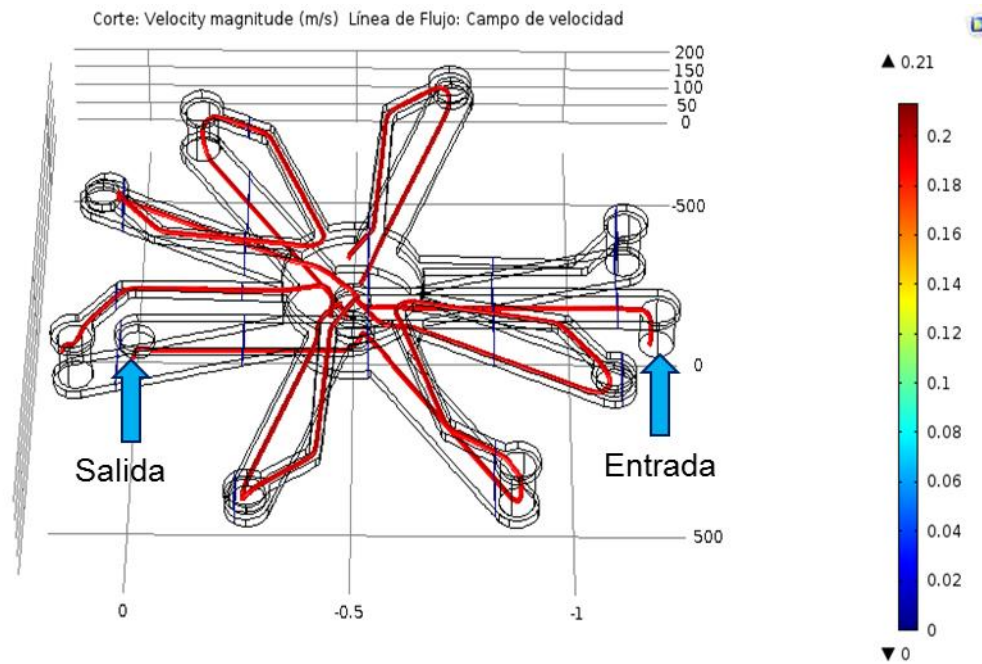


Figura 41. Líneas de campo de velocidad.

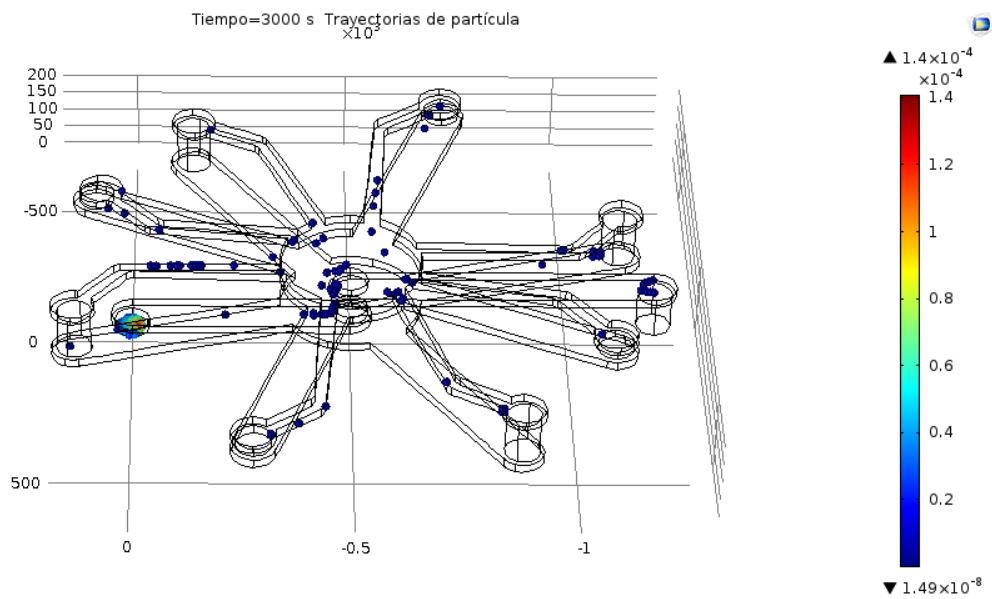


Figura 42. Trayectoria de las partículas en $t=3000s$.

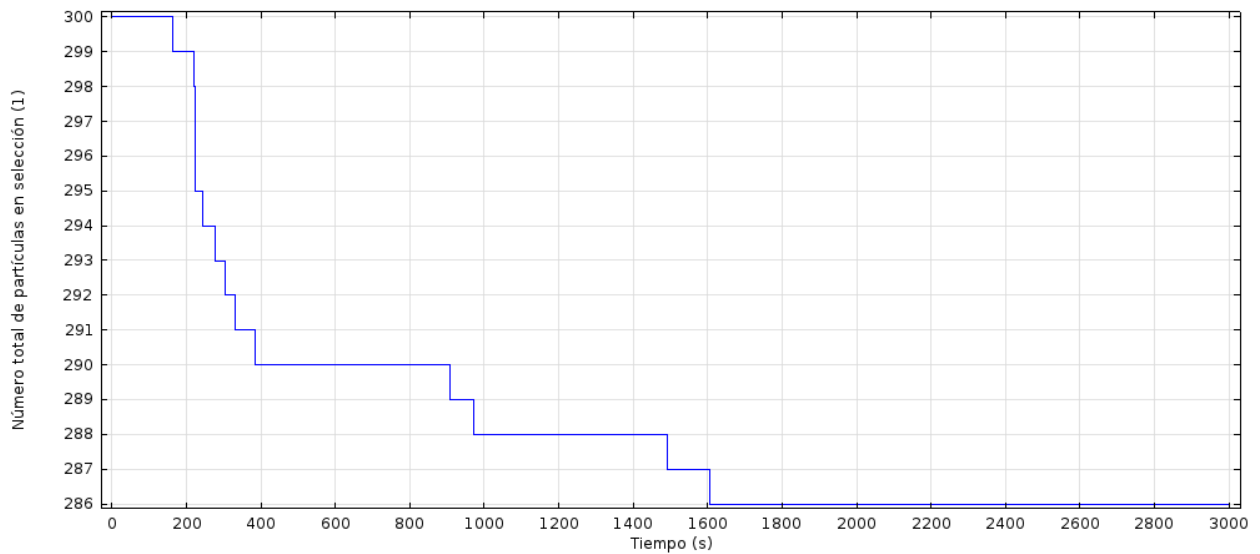


Figura 43. Número de partículas confinadas vs tiempo en el modelo B.

En la Figura 44 se muestra el comportamiento del confinamiento con respecto al tiempo. Se observa que durante los primeros 1600s existe una variación desde las 300 partículas inyectadas en el tiempo $t=0s$ para luego estabilizarse en los 1600s donde se quedan 286 partículas sin variación alguna del número total de partículas atrapadas en la microestructura.

En las Figuras 45 y 46 se presenta el diagrama de Poincaré en 3D y 2D respectivamente; en este caso se hizo un corte transversal en $Z=150\ \mu m$, y se observó la posición de las partículas en el instante de tiempo $t=3000s$. En las Figuras 54 y 55 se observa una aglomeración de las partículas justo en el centro de la cámara; como también se puede visualizar el momento en el cual las partículas entran al siguiente nivel, que es la quinta capa, como se muestra en la Figura 47.

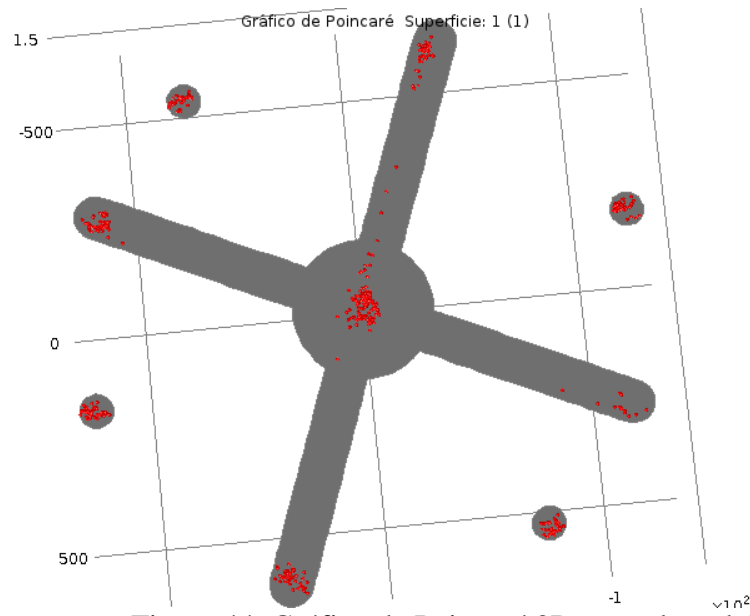


Figura 44. Gráfico de Poincaré 3D para el modelo B.

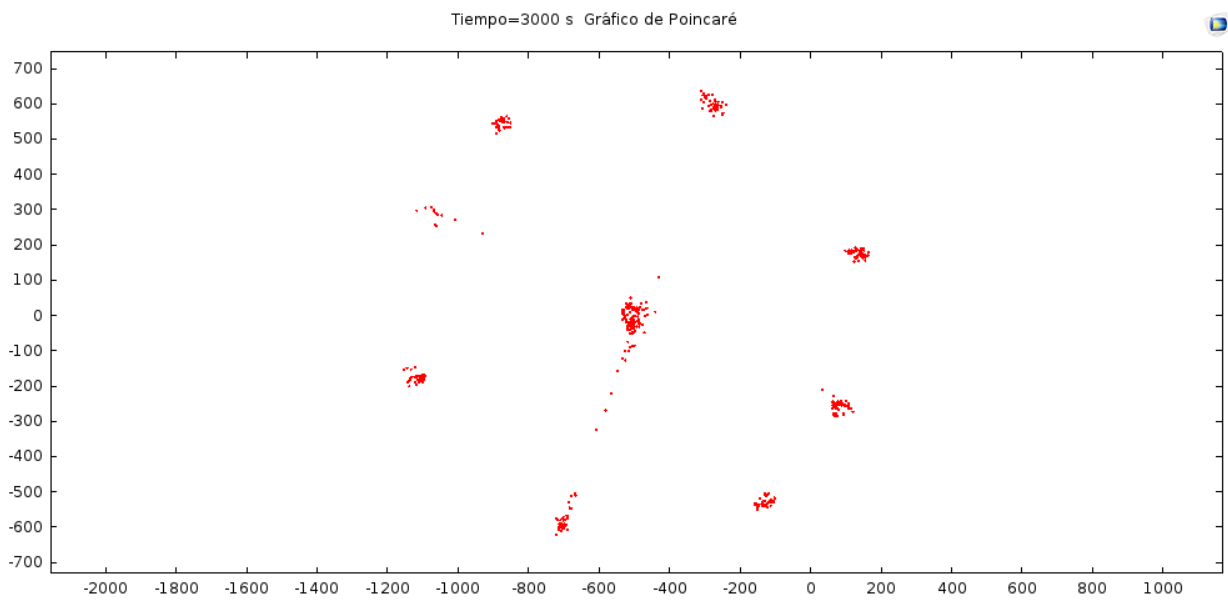


Figura 45. Mapa de Poincaré 2D Para el modelo B.

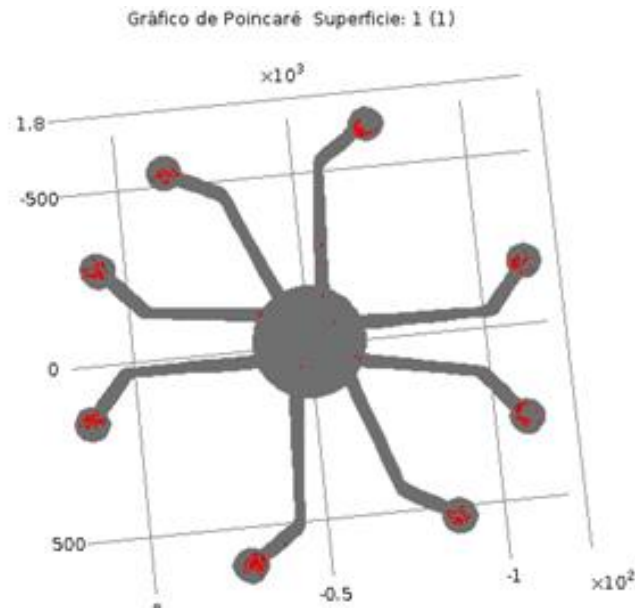


Figura 46. Diagrama de Poincaré en 3D para el modelo B.

El diseño con múltiples cámaras de confinamiento con el modelo B se muestra en la Figura 48, donde la idea principal es unir todas las entradas y las salidas mediante microcanales horizontales. Esta misma distribución se aplica para colocar más dispositivos en paralelo.

En la Figura 58 se muestra la magnitud de la velocidad en m/s, donde se visualizan los cortes de velocidad máxima y mínima con el color azul oscuro. En la Tabla 9 se resumen las condiciones de frontera utilizadas para este modelo con múltiples cámaras.

Tabla 9. Condiciones de frontera para el modelo B con múltiples cámaras.

Nombre	Valor	Unidad	Descripción
Vin	100	$\mu\text{m/s}$	Velocidad de Entrada
Pout	0	Pa	Presión de Salida

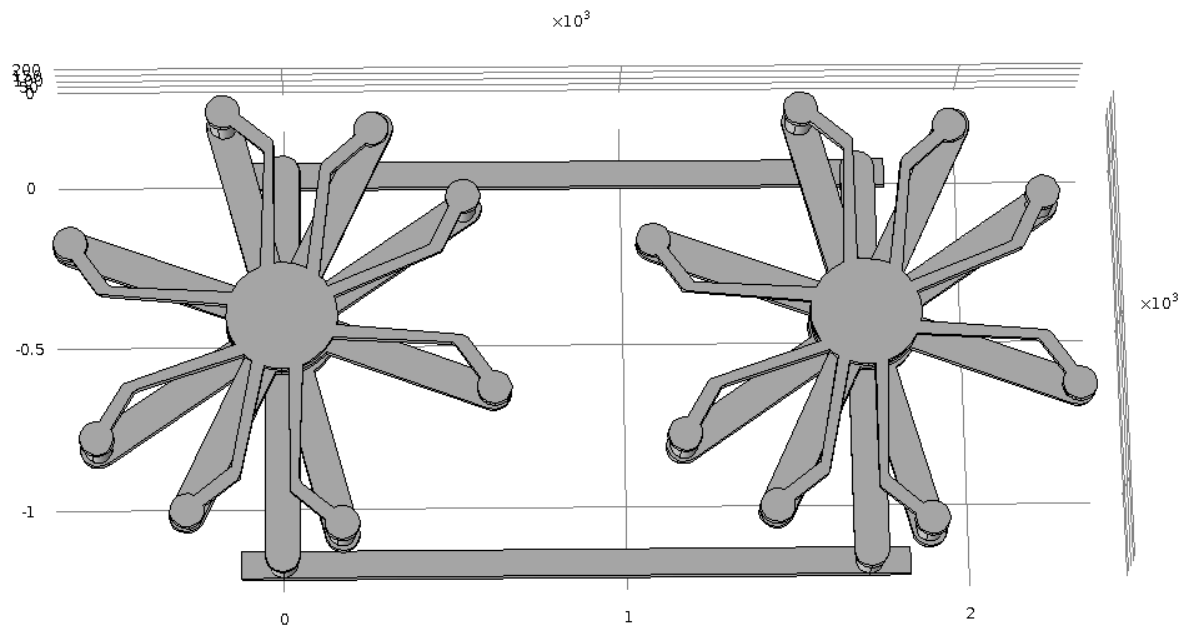


Figura 47. Conexión de dos dispositivos en paralelo del modelo B.

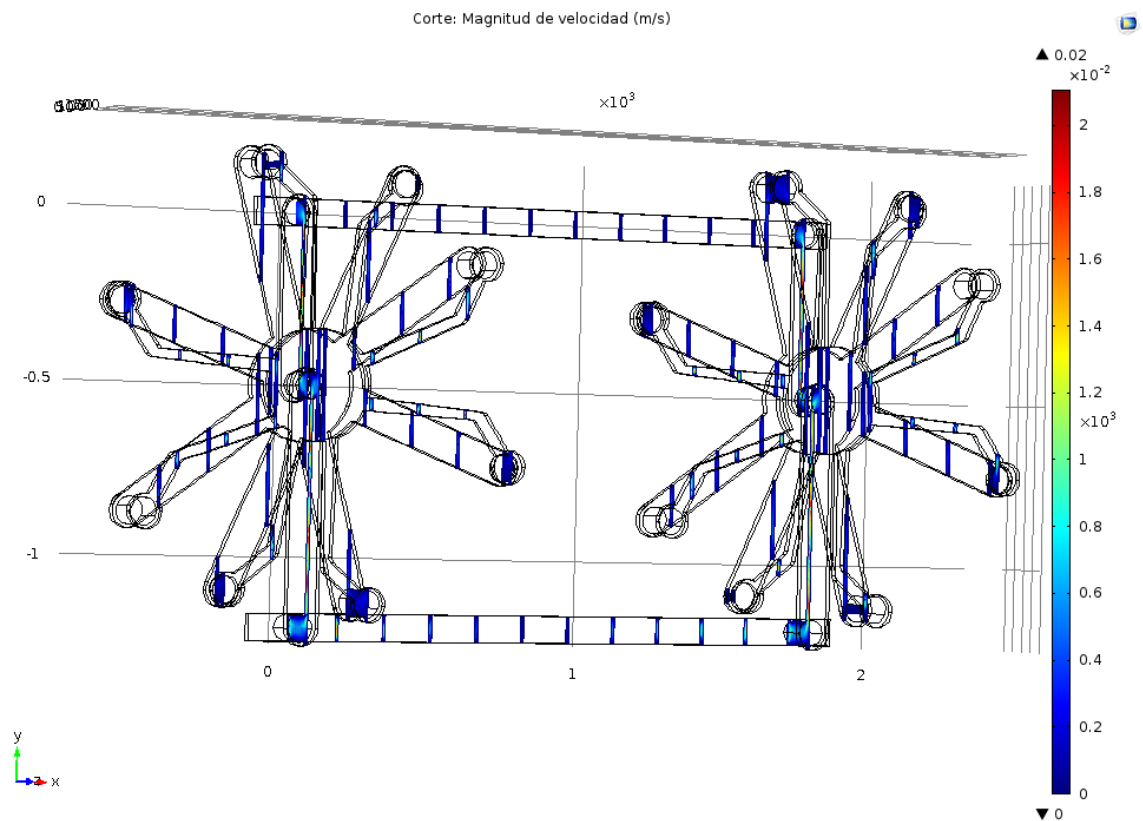


Figura 48. Cortes transversales representando la magnitud de la velocidad en m/s para el arreglo de dispositivos del modelo B.

En las Figuras 50 y 51 se muestran los diagramas de Poincaré, que muestran una buena distribución de las partículas en los microcanales. También se observa el momento en el que están subiendo a la última capa de la estructura siguiendo la trayectoria que define el fluido. En la Figura 52 se grafica el número total de partículas confinadas en función del tiempo. En $t=0s$ se introdujeron 2500 partículas; el número de partículas confinadas varía con el tiempo hasta estabilizarse alrededor de los 1800s con 2050 partículas confinadas.

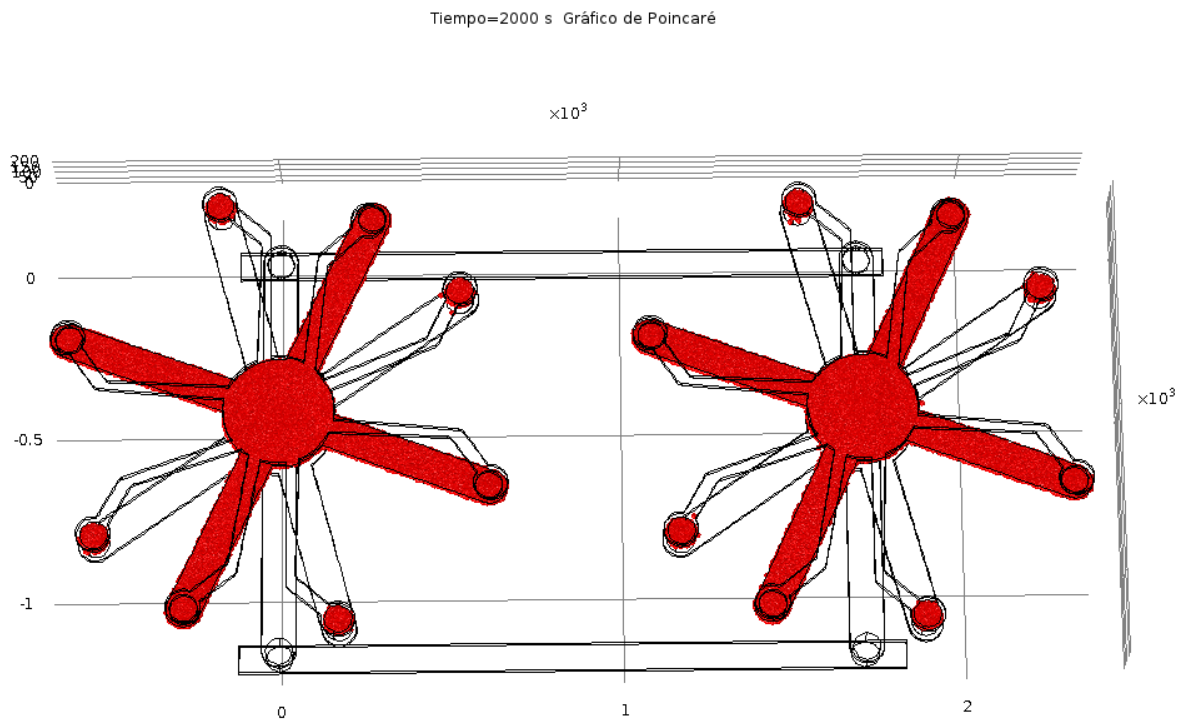


Figura 49. Mapa de Poincaré en 3D para un arreglo de dos dispositivos del modelo B.

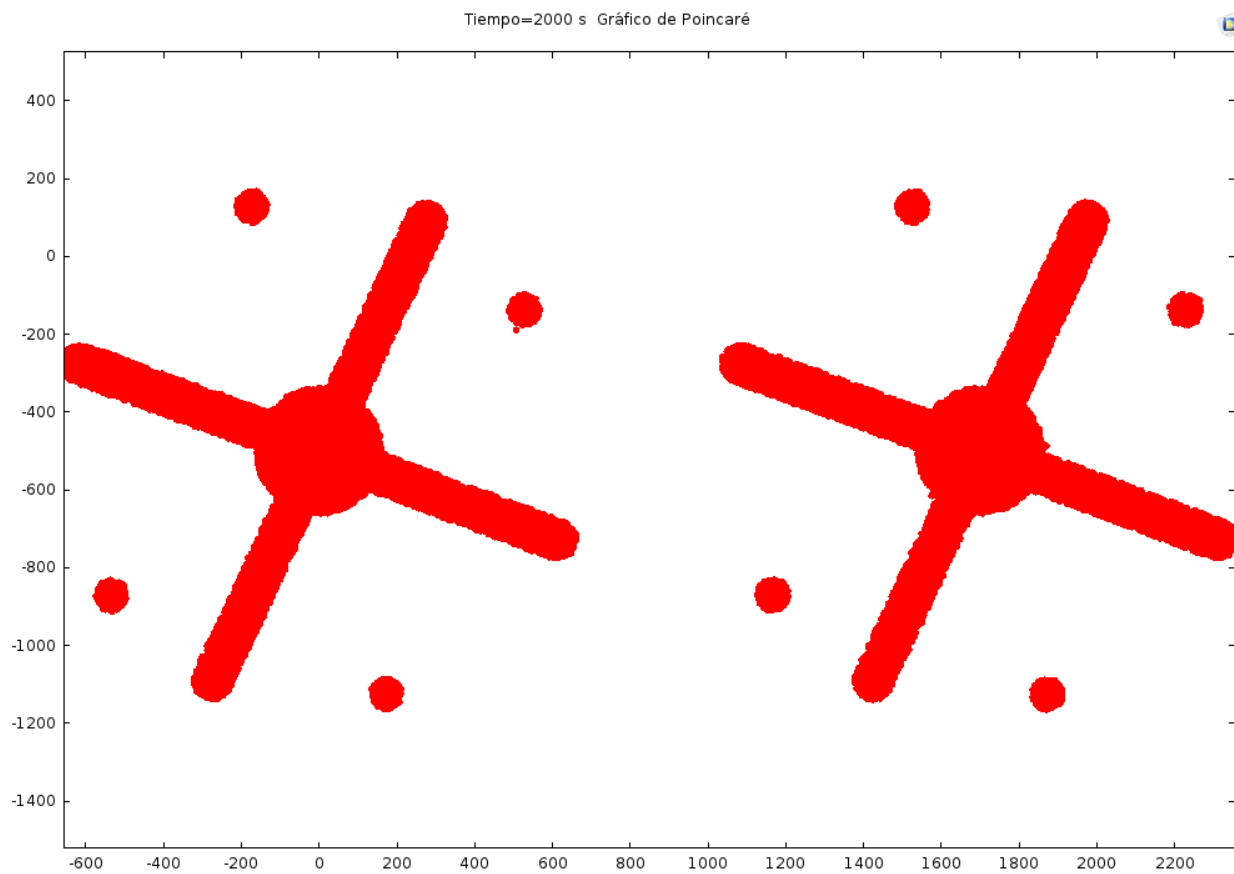


Figura 50. Mapa de Poincaré en 2D para el arreglo de dos dispositivos del modelo B.

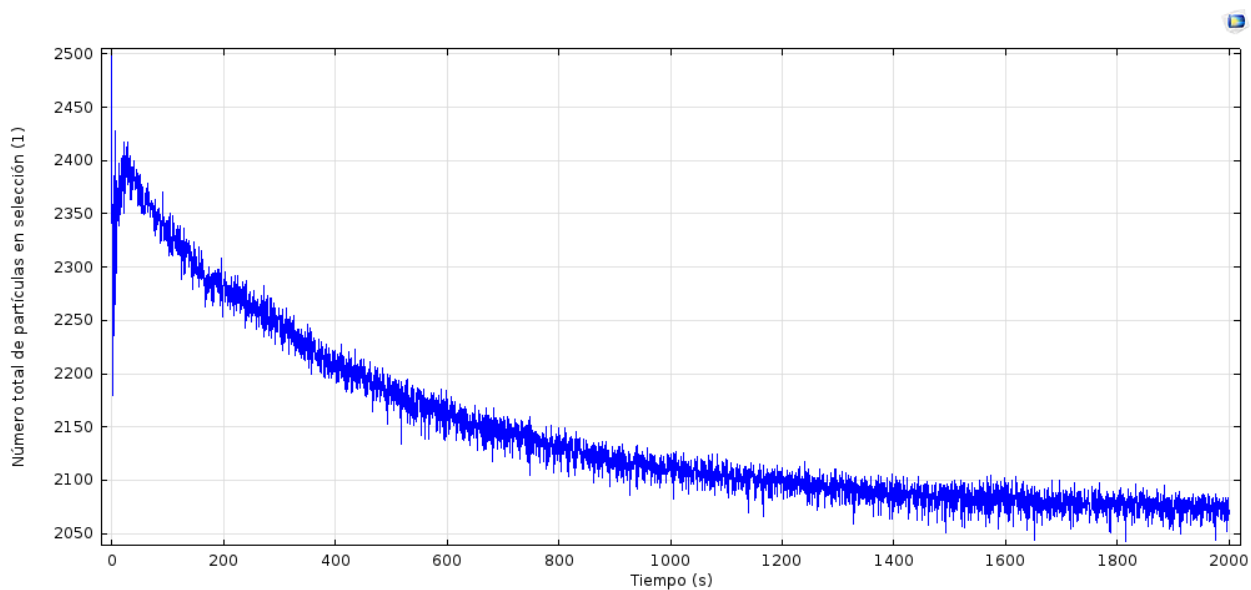


Figura 51. Número total de partículas en función del tiempo para el arreglo de dos dispositivos del modelo B.

MODELO C

Como tercer modelo (modelo C), se propone en esta tesis la geometría microfluídica utilizada en el confinamiento de células mostrada en la Figura 53, la cual dispone de 3 pozos conectados a la misma fuente de entrada de fluido y a la misma salida del fluido, teniendo así en todo el sistema microfluídico una única entrada y una única salida.

Como se observa, la disposición de la entrada con respecto a la salida está a diferentes niveles (Figura 54). La entrada está $14\ \mu\text{m}$ por debajo de la salida. Se llegó a esta conclusión de utilizar esta asimetría en el nivel de la entrada y salida, debido a que si ambas se colocan al mismo nivel, las partículas buscan inmediatamente el perfil de velocidad más cercano. Este perfil estaría justo al frente, por lo tanto las partículas no bajarían al fondo del pozo, donde la velocidad es casi nula. Con este arreglo, donde la entrada se coloca casi en el fondo del pozo, las partículas están obligadas a circular por toda el área. En consecuencia, en el interior del depósito el fluido presenta un comportamiento casi estacionario, por lo tanto las partículas quedan confinadas en su interior.

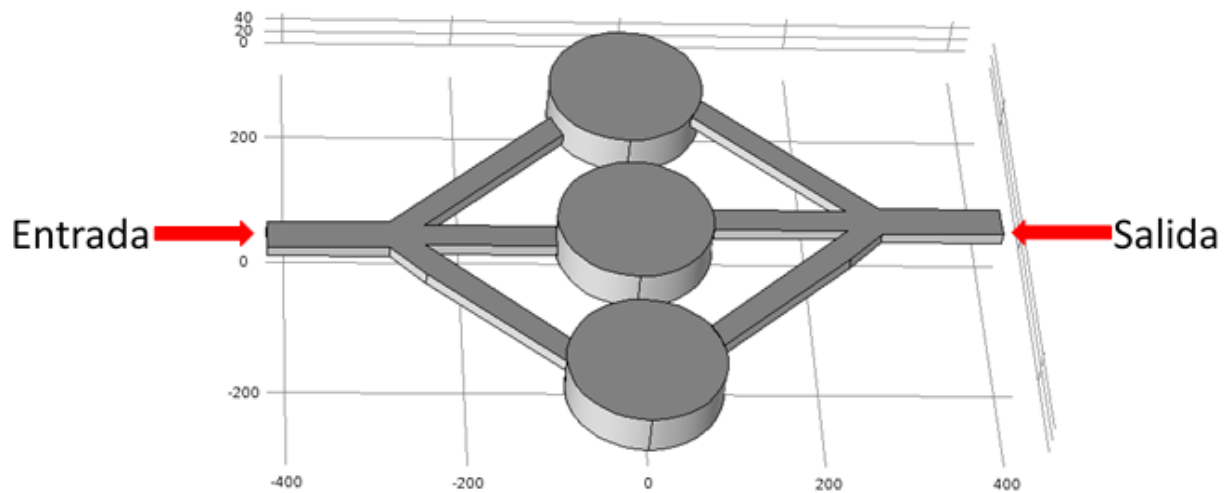


Figura 52. Geometría de la microestructura del modelo C para el confinamiento de células.

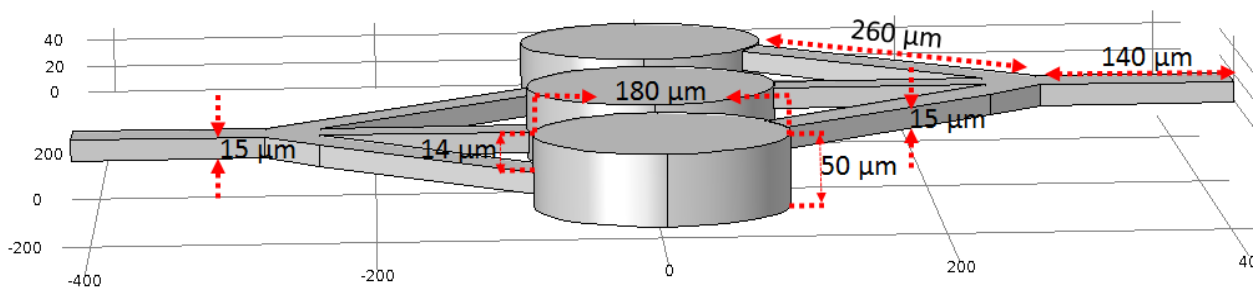


Figura 53. Dimensiones de la microestructura del modelo C.

Las condiciones de frontera utilizadas en este modelo se resumen en la Tabla 10. El fluido para este modelo es un fluido laminar, siendo el líquido utilizado en la simulación agua.

Tabla 10. Condiciones de frontera para el modelo C.

Nombre	Valor	Unidad	Descripción
V_{in}	50	μm/s	Velocidad de Entrada
P_{out}	0	Pa	Presión de Salida

En la Figura 55 se representa la magnitud de la velocidad mediante una isosuperficie y dentro de los pozos se representó la magnitud de la velocidad mediante cortes transversales. Los patrones de la magnitud de la velocidad tanto en la entrada como en la salida no tienen mucha diferencia entre sí, como se observa en la Figura 56. En los cortes transversales se puede visualizar que la magnitud de la velocidad es la misma tanto a la entrada como a la salida. Dentro del pozo, el color azul marino indica un comportamiento casi estático del fluido.

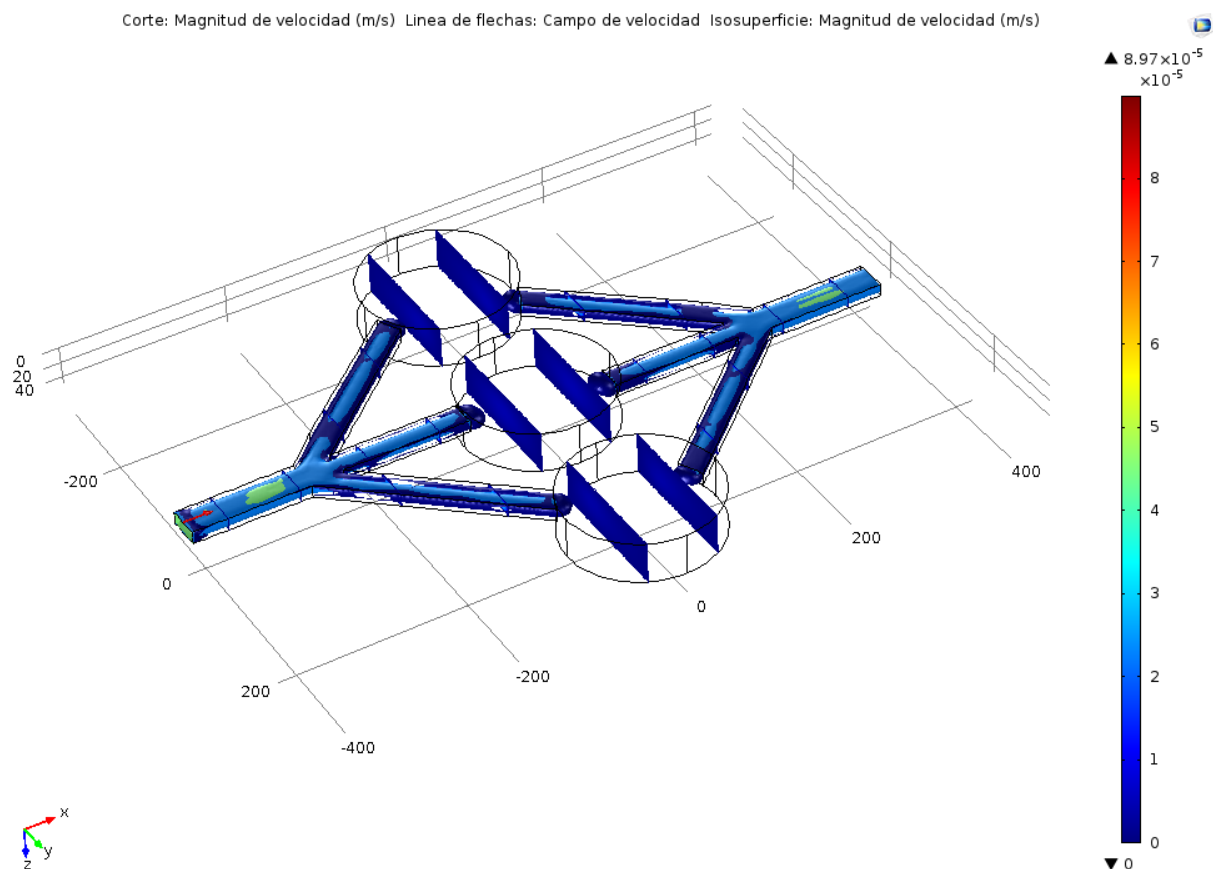


Figura 54. Magnitud de velocidad dentro del microcanal.

Como en el interior del reservorio la velocidad es cero, se produce un buen confinamiento de partículas. En las Figuras 57 y 58 se muestra de forma gráfica y cuantitativa

respectivamente, el comportamiento de las partículas al transcurrir el tiempo para una corrida de 6000s. Se introdujeron 400 partículas de las cuales se confinaron 375, en un tiempo de 2840s. En este tiempo se alcanza la estabilidad, manteniendo 375 partículas confinadas hasta el final de la corrida. En un tiempo igual a 1000s se encuentran 383 partículas confinadas, como se observa en la gráfica de la Figura 58. Este número permanece constante por un periodo de tiempo; esto se debe a que tardan un tiempo en encontrar la salida. Posteriormente algunas partículas empiezan a salir pero la mayoría se mantiene en el fondo del pozo por el efecto del fluido, que es estático en esa zona.

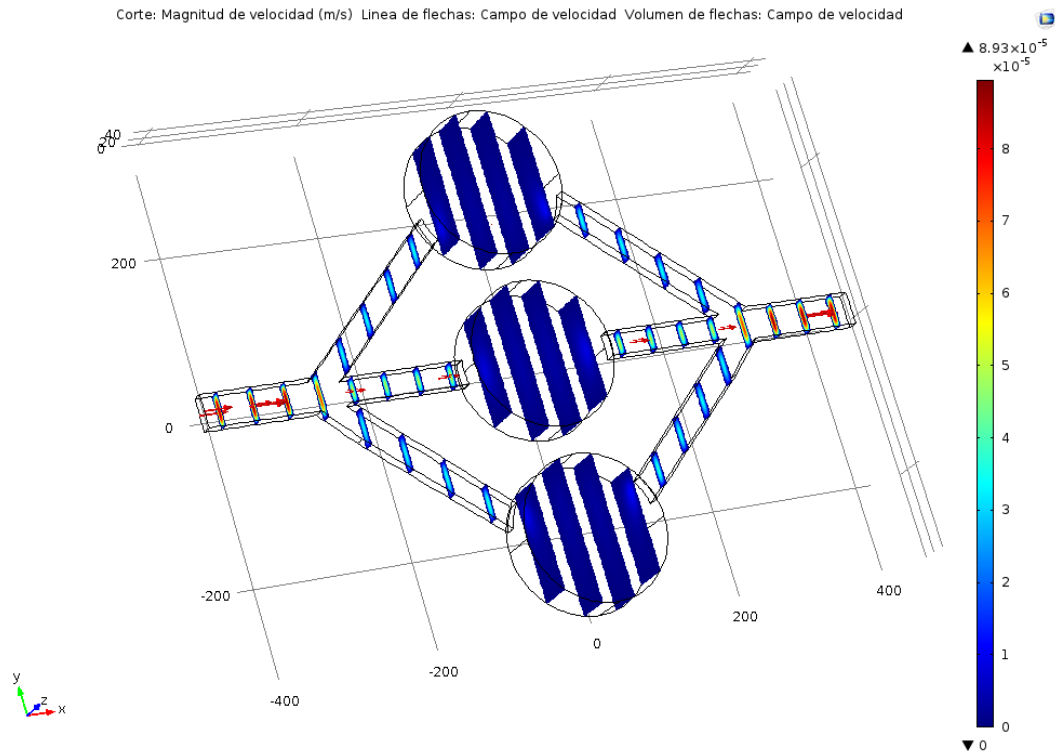


Figura 55. Cortes representativos de la magnitud de la velocidad para el modelo C.

Tiempo=500 s Trayectorias de partícula

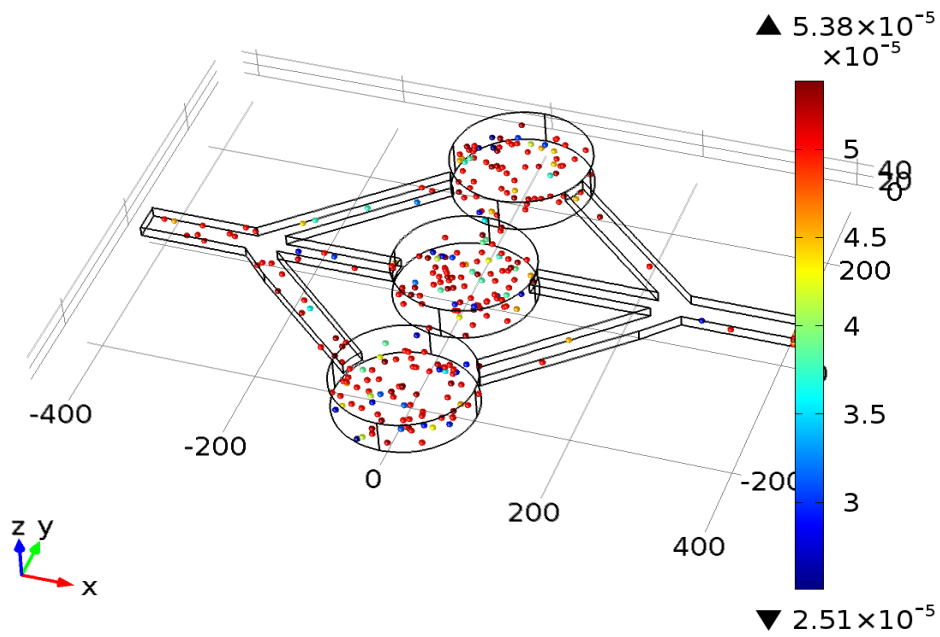


Figura 56. Distribución de las partículas en el modelo C.

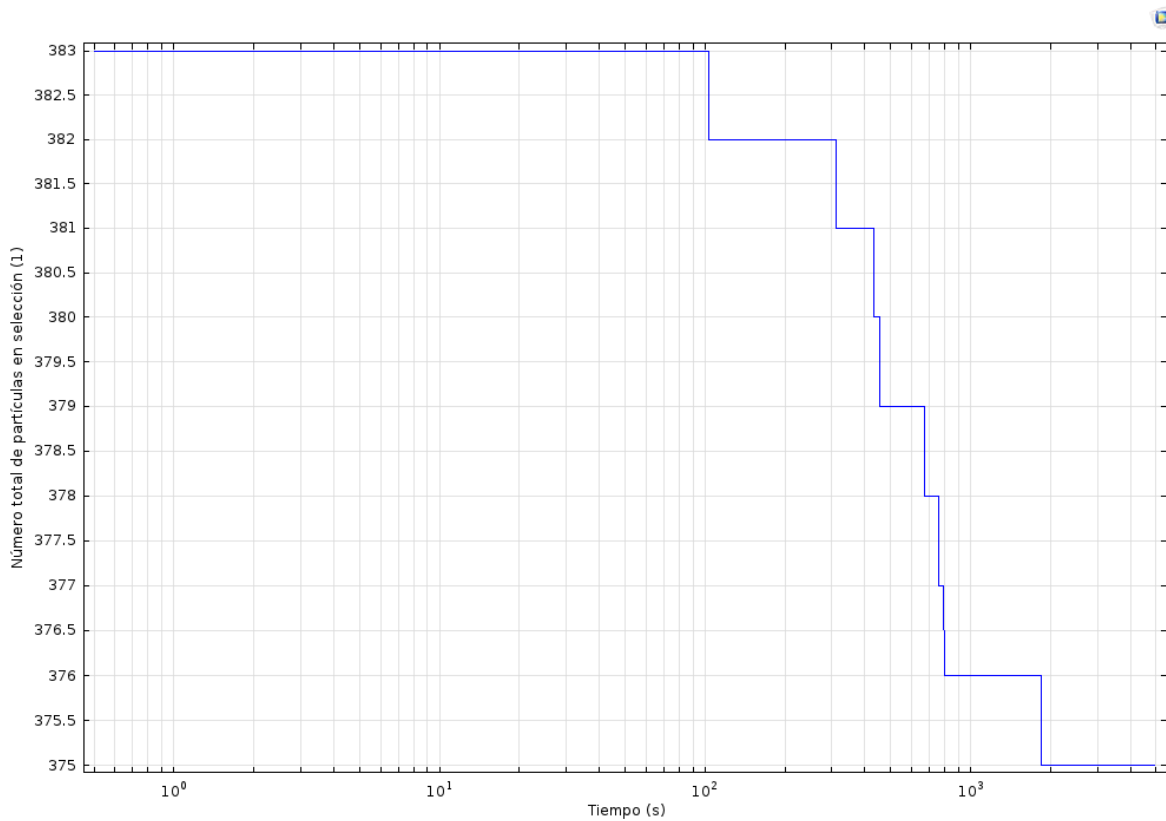


Figura 57. Número total de partículas en función del tiempo en el modelo C.

En la Figura 59 se definió un plano cortante a una altura de $5\mu\text{m}$ para observar la magnitud de la velocidad en los microcanales de entrada y en el fondo de pozo. En esta imagen se puede visualizar que en el fondo la magnitud de la velocidad es cero. Al mismo tiempo, para visualizar las partículas en este mismo plano acoplado con el fluido se introdujo un mapa de Poincaré para conocer la posición de las partículas en el fondo del canal.

En las Figuras 59 y 60 se trazaron los diagramas de Poincaré en 3D y el 2D respectivamente para $t=3600\text{s}$. Para obtener los mapas de Poincaré de las Figuras 68 y 69 se definió un plano cortante a una altura de $25\mu\text{m}$ para conocer la trayectoria de las partículas en este instante de tiempo y a este nivel del pozo. En ambas figuras se observa una buena distribución de partículas, sin aglomeraciones.

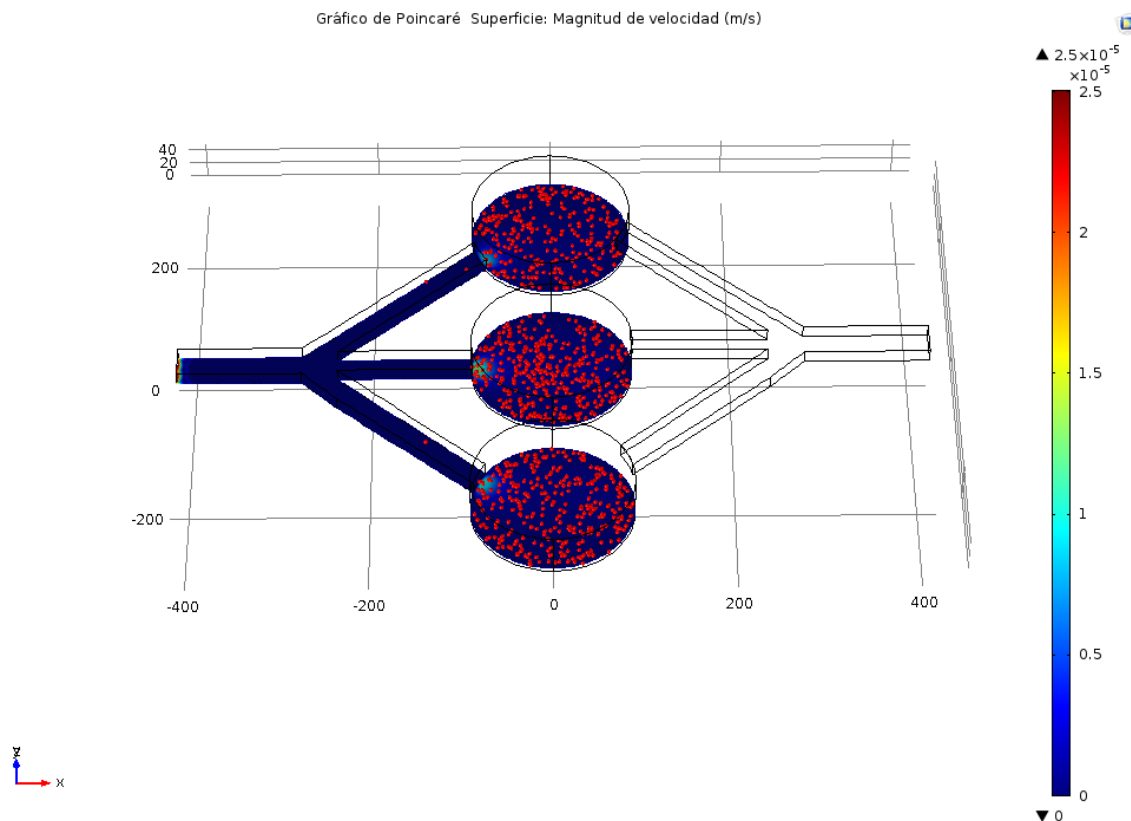


Figura 58. Magnitud de la velocidad y distribución de las partículas en $t=3600\text{s}$ para el modelo C.

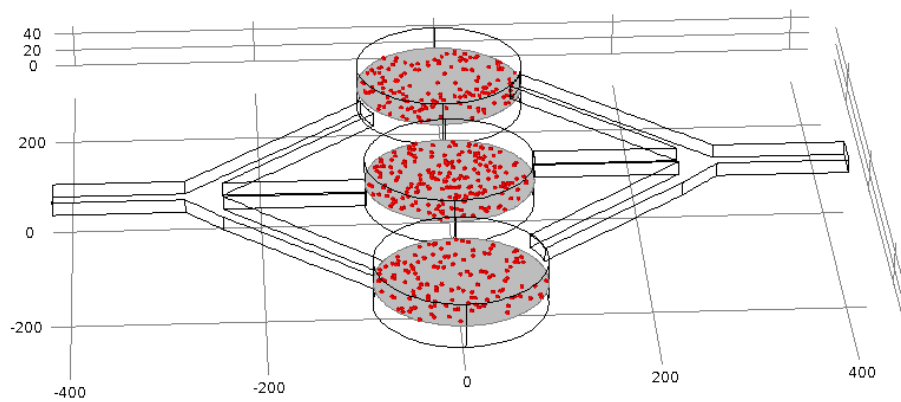


Figura 59. Mapa de Poincaré en 3D para el modelo C.

CAPITULO IV

ANALISIS DE RESULTADOS

Con el fin de analizar los tres modelos propuestos, se procede a compararlos con base en su eficiencia de confinamiento, las características de sus microcanales y las técnicas de microfabricación con el fin de establecer el modelo más idóneo para la experimentación y la aplicación de espectroscopía de impedancia.

Además, para la futura fabricación de los modelos de confinamiento se proponen distintos procedimientos de acuerdo con las geometrías y dimensiones de los canales.

El material sugerido para la fabricación de los tres diseños es el PDMS. Este es un polímero ampliamente usado en MEMS para la implementación de microsisemas fluídicos. Se trata de un polímero de baja densidad ($0,97 \text{ kg/m}^3$), y bajo módulo de Young (360 – 870 kPa). Presenta interesantes propiedades para la realización de dispositivos microfluídicos como son su hidrofobicidad y biocompatibilidad. Este material es ideal para las técnicas de fabricación propuesta ya que puede ser tratado de varias formas, mediante grabado húmedo y mediante grabado por plasma para obtener formas determinadas. También se usa para moldeado, mediante el cual se fabrica un molde en silicio u otro material como el vidrio para posteriormente rellenarlo con PDMS.

Para el modelo A y el modelo C la técnica de fabricación recomendada sería la litografía suave, debido a que ésta permite realizar diseños en 3D con perfiles redondeados y es compatible con los polímeros. La fabricación de estos dispositivos no sería muy costosa en el caso de usar un substrato de vidrio y tendrían una buena calidad debido a que las dimensiones de los dispositivos se prestan para este tipo de microfabricación ya que están en el rango de precisión de esta técnica. Para estos modelos se sugiere esta técnica debido a que el modelo A está en un solo plano y el modelo C tiene un cambio de plano, pero no tiene canales construidos sobre otros canales.

El modelo B presenta una geometría que reduce las posibilidades de fabricación por diversos métodos. Este diseño cuenta con diferentes geometrías en cada capa a lo largo del eje Z. Este tipo de perfiles se podrían lograr mediante métodos de fotolitografía multicapa pero podría resultar costoso, laborioso y es necesario la disponibilidad de equipos con una alta precisión debido a lo complejo de la microestructura, no solo por su forma en general sino porque cuenta con cortes transversales diferentes a lo largo del eje Z, puesto que no es una geometría simétrica.

Las técnicas de fabricación sugeridas se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Técnicas de microfabricación sugeridas para cada diseño.

Diseño en serie	Técnica de microfabricación	Material
Modelo A	litografía	PDMS
Modelo B	Litografía o cinta 3M	PDMS

Modelo C	Litografía	PDMS
-----------------	------------	------

En la Tabla 12 se muestra el porcentaje de eficiencia de confinamiento de cada modelo.

Tabla 12. Eficiencia de los arreglos de dispositivos de cada modelo.

Modelo para el arreglo	Tiempo de corrida de estado estable (s)	%Eficiencia	Número de células inyectadas	Número de cámaras
Modelo A	1500	≈ 60%	2000	6
Modelo B	2000	80%	2500	2
Modelo C	6000	96%	400	3

En el modelo A la cantidad de partículas confinadas se estabiliza a partir del tiempo $t=1200$ s quedando confinadas 1116 partículas de 2000 partículas que ingresan en $t=0$ s. El modelo B se estabiliza en un tiempo de 1600 s quedando confinadas 286 partículas de 300 partículas iniciales. La estabilidad del modelo C se alcanzó en un tiempo igual 2840s con un número de partículas de 375 de 400 partículas que fueron introducidas inicialmente. Los 3 modelos presentan una buena capacidad de captura siendo el más eficiente el modelo C, que presenta una eficiencia del 96%.

ANALISIS DEL ESFUERZO CORTANTE

Para continuar la comparación de los 3 modelos se procedió a colocar la misma cantidad de dispositivos en serie/paralelo, donde se analizaron con base en su capacidad de confinamiento, manteniendo la velocidad de perfusión. Se consideró además el esfuerzo cortante del fluido en cada dispositivo, para evitar causar daño a las células. Se realizó una revisión de fuentes bibliográficas para obtener los valores de esfuerzo cortante máximos para células comúnmente utilizadas en experimentos y se compararon estos valores con los esfuerzos cortantes que arrojaron los 3 diseños.

En la Figura 61 se observa un histograma reportado por Lipowsky, indicando el valor máximo del esfuerzo cortante para cada vaso sanguíneo así como la tasa de esfuerzo cortante (shear rate) correspondiente para cada vaso sanguíneo estudiado.

En la Tabla 13 se presentan los diferentes valores de esfuerzo cortante para cada canal de transporte de fluido y células.

Tabla 13. Rangos aproximados de esfuerzos cortantes en vasos sanguíneos humanos y órganos artificiales [32].

Vaso Sanguíneo	Rango de esfuerzo cortante (Pa)
Vena Humana	0.1-1
Arteria Humana	1-20
arteria humana en lesión estenótica	20-50

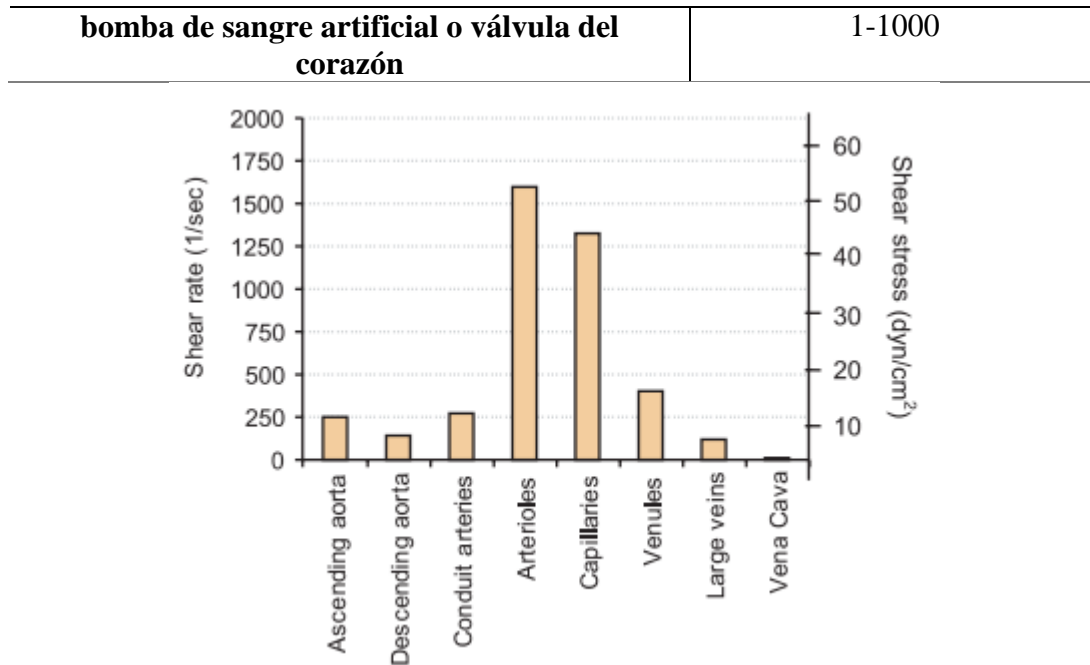


Figura 60. Valores de esfuerzos constante para diferentes vasos reportado por Lipowsky et al [33].

Los 3 modelos se simularon en igualdad de condiciones, se simuló un tiempo de 3600s para los modelos mantenido la misma velocidad de perfusión, la misma cantidad de dispositivos en serie/paralelo, así como la cantidad de partículas, el cual fue de 400 partículas para los 3 dispositivos, como se muestra en la Tabla 14, para así analizar la capacidad de confinamiento y los máximos valores de esfuerzos cortante de cada dispositivo.

Tabla 14. Condiciones de simulación para comparación de modelos.

Modelos	Tiempo de corrida	Cantidad de dispositivos serie/paralelo	Cantidad de partículas introducidas	Velocidad de entrada
A, B y C	3600 s	3	400	50μm/s

En la Figura 62 se muestra la conexión en serie del modelo A, ahora únicamente para 3 dispositivos en serie. Para este modelo se obtuvo un confinamiento final de 205 partículas como se muestra en la Figura 65, logrando una eficiencia de un 51.25%.

La Figura 63 muestra la magnitud de la velocidad representado por los cortes transversales, donde se puede observar perfiles de velocidad nulo en los pozos de la microestructura. La distribución de las partículas se observa en la figura 64 mediante el diagrama de Poincaré obtenido para el tiempo de estabilización de las partículas.

Para obtener los valores de esfuerzo cortante mostrados en la Figura 66 utilizó la herramienta de ecuaciones de Comsol Multiphysics para calcular el esfuerzo cortante como la tasa del esfuerzo cortante multiplicado por la viscosidad dinámica. En la Figura 66 se representó el esfuerzo cortante mediante una superficie en la cual el color azul representa

valores muy bajos las tonalidades rojas indican valores de esfuerzos cortantes superiores. Para este modelo en específico el rango de esfuerzo cortante va desde 1.4×10^{-6} Pa hasta 0.09 Pa, siendo el mínimo esfuerzo cortante en la microestructura de un valor de 1.42×10^{-6} Pa y el valor máximo de 0.0867118 Pa. Esto indica al utilizar este dispositivo para el confinamiento de células no se corre el riesgo de un daño inminente de las mismas aun manteniendo la velocidad de perfusión.

En comparación, el esfuerzo cortante máximo experimentado por una célula dentro de una vena humana es de 1 Pa en las regiones de circulación donde no hay daño celular. Por lo tanto el diseño propuesto presenta un esfuerzo cortante máximo muy por debajo del valor máximo de la vena humana.

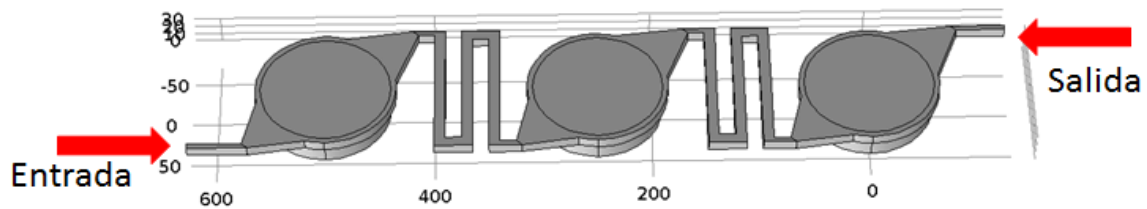


Figura 61. Disposición geométrica del modelo A conectado en serie.

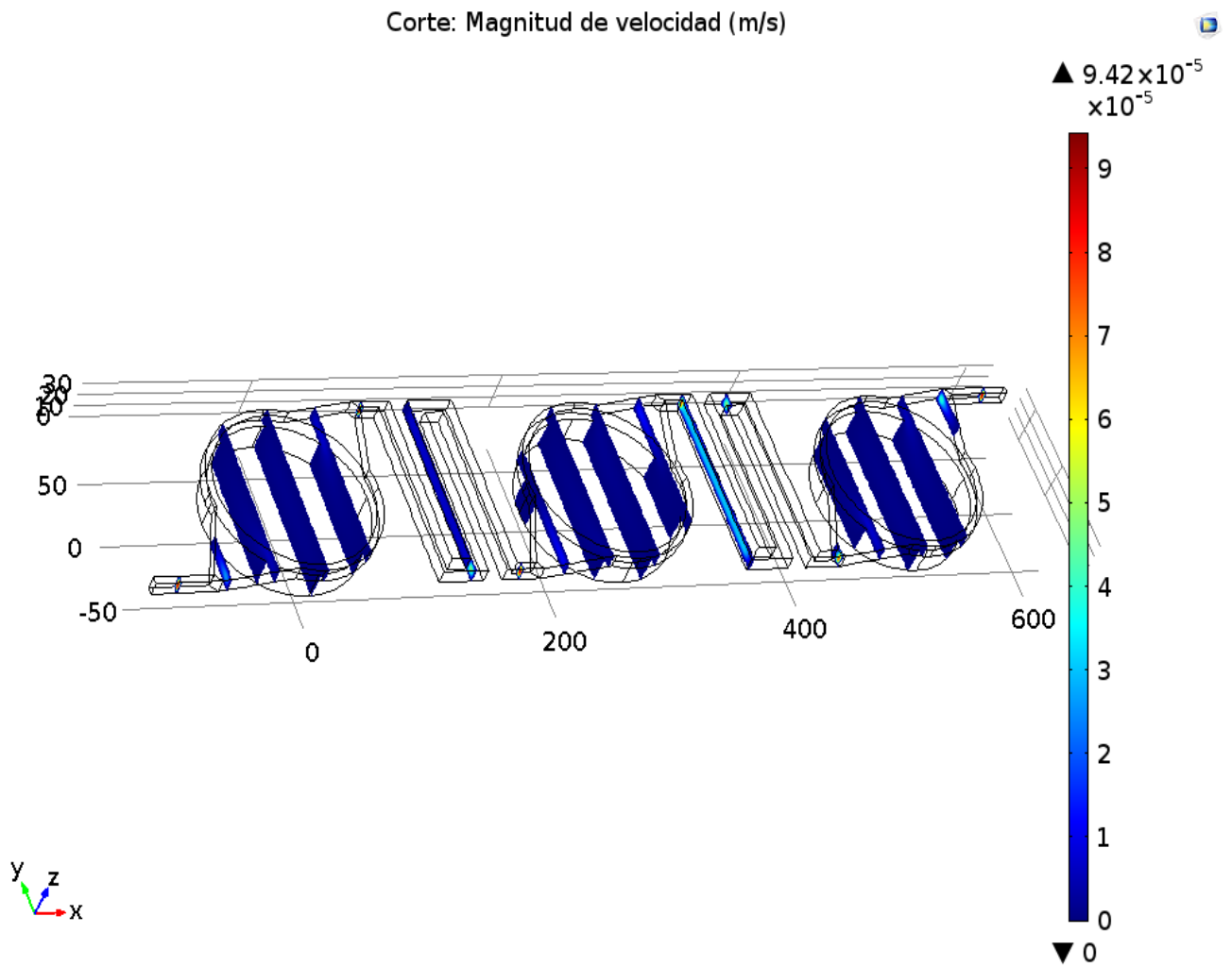


Figura 62. Magnitud de Velocidad para el modelo A con tres dispositivos en serie.

Gráfico de Poincaré Superficie: 1 (1)

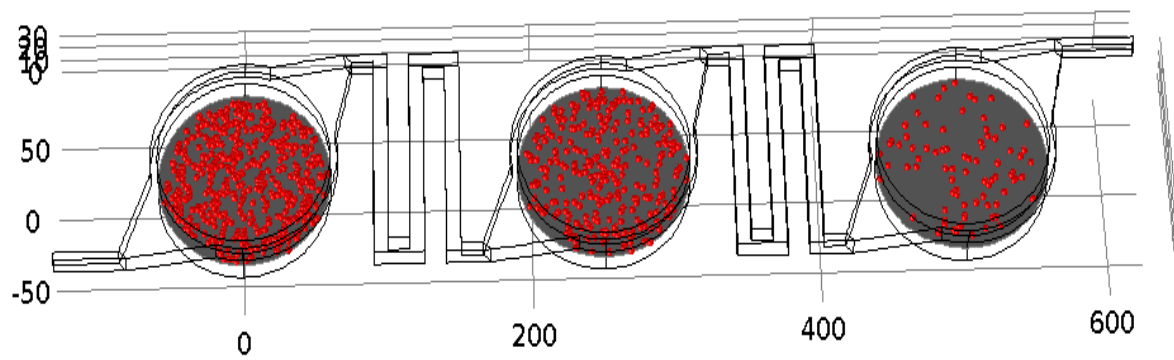


Figura 63. Gráfico de Poincaré para el modelo A con tres dispositivos en serie

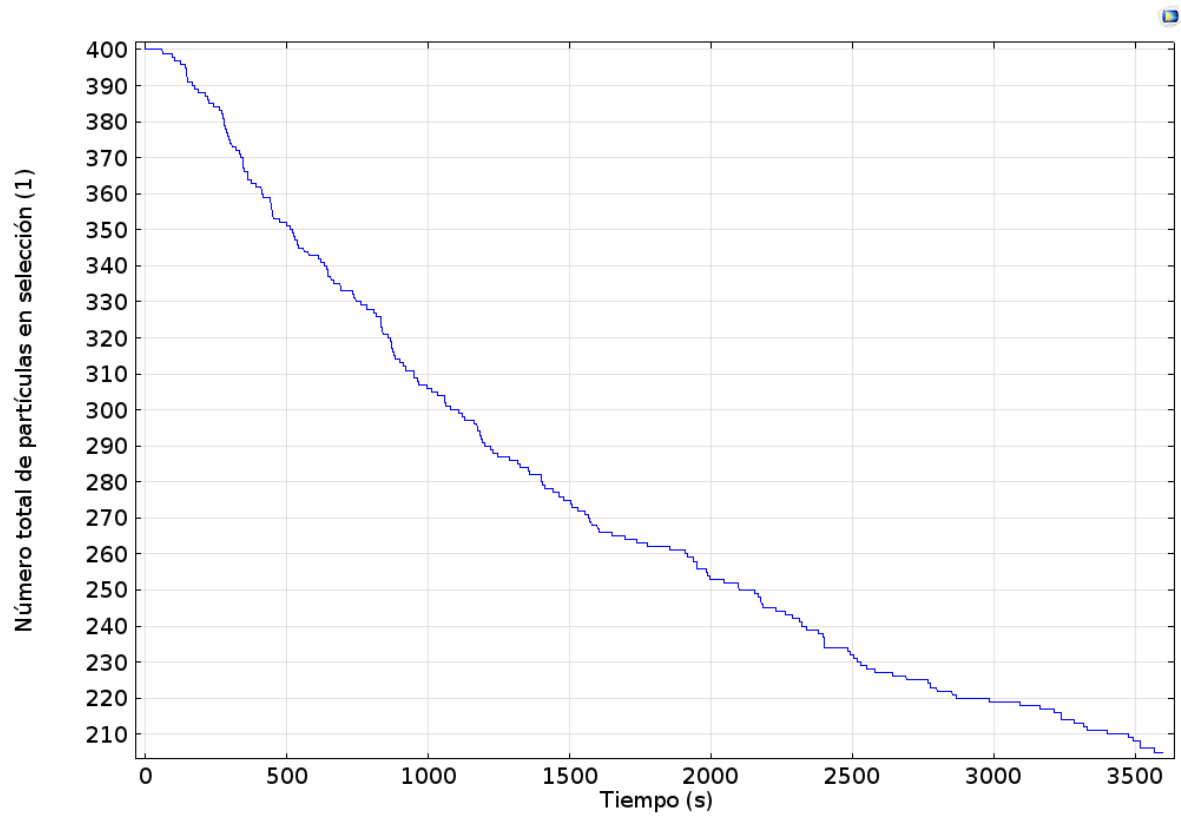


Figura 64. Número total de partículas en función del tiempo de para 3 dispositivos del modelo A conectados en serie.

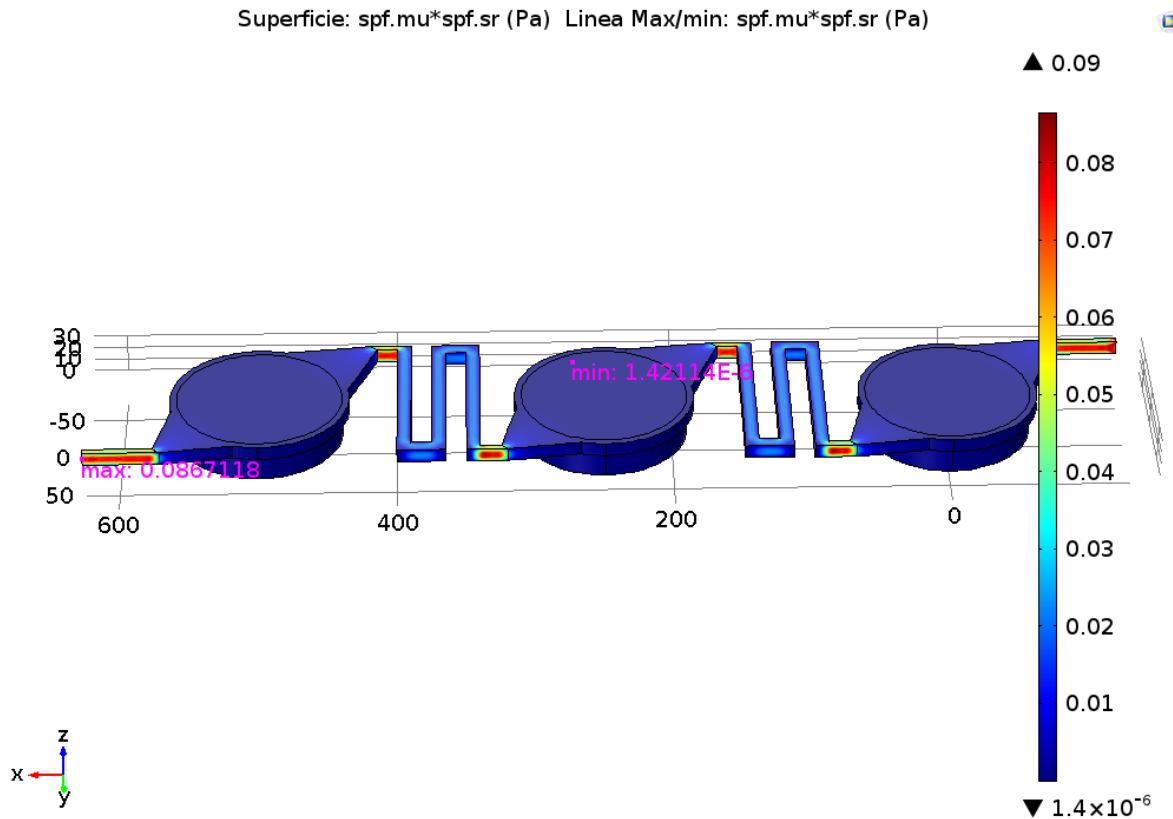


Figura 65. Esfuerzo cortante en toda la superficie del modelo y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante presentes en el arreglo de dispositivos del modelo A.

En la Figura 67 se representa la distribución de 3 dispositivos microfluídicos del modelo B en paralelo. Se obtuvo un confinamiento de 325 partículas de 400 partículas inicialmente inyectadas, como se muestra en la Figura 70. Alrededor de los 2500s se empieza a visualizar una estabilización de las células confinadas mientras se mantiene el paso del fluido a través del tiempo. Este modelo presenta una eficiencia de confinamiento del 81.25%.

La magnitud de la velocidad del modelo B se muestra en la figura 68 mediante cortes transversales, y la distribución de las partículas para el tiempo de estabilización se representó en la figura 69.

Para representar el esfuerzo cortante en este modelo se hizo uso de la misma ecuación para obtener el esfuerzo cortante en el modelo A, y se obtuvo como resultado la Figura 71. En dicha figura se muestra el esfuerzo cortante a través de toda la estructura microfluídica. El máximo valor de esfuerzo cortante es de 6.70996 Pa y el valor mínimo de 1.504×10^{-11} Pa. Si se compara el esfuerzo cortante presente en una vena (véase la Tabla 13), con el valor máximo de esfuerzo cortante presente en el diseño B, la célula sufriría daño en la membrana y en consecuencia moriría. Por otra parte, si se compara con el esfuerzo cortante de una arteria, la célula no sufriría daños. Sin embargo, esto significa que este modelo no podría utilizarse para realizar estudios de células tumorales circundantes viajando a través de todo el aparato circulatorio.

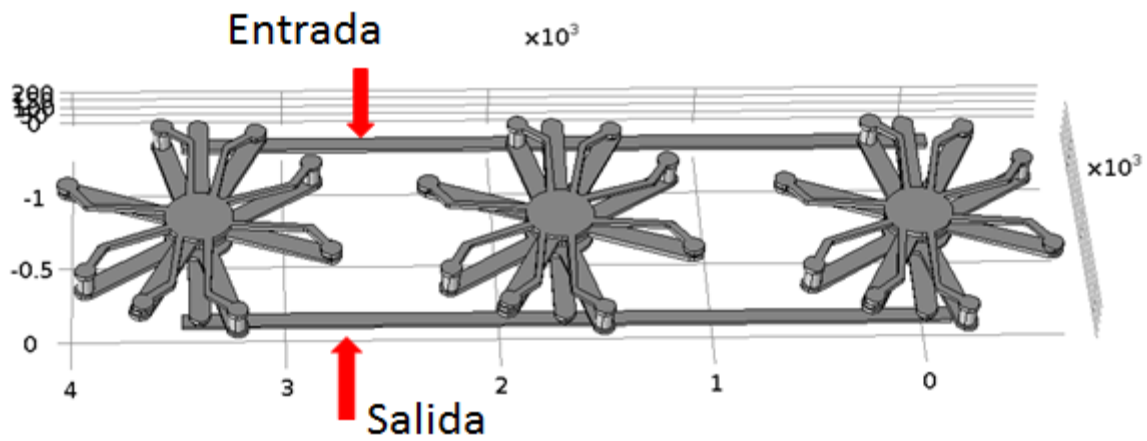


Figura 66. Arreglo de 3 dispositivos microfluídicos del modelo B en paralelo.

Corte: Magnitud de velocidad (m/s)

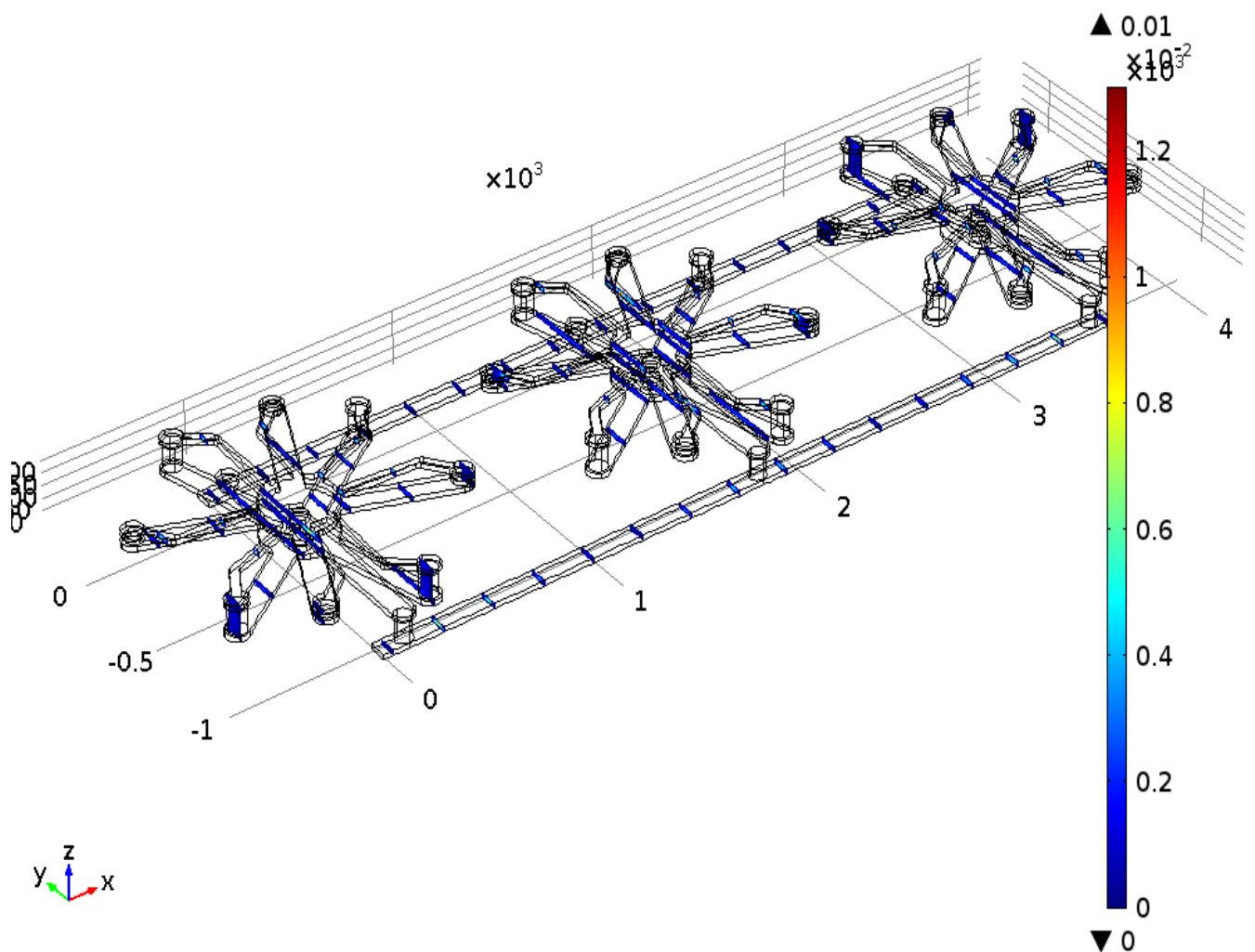


Figura 67. Magnitud de la velocidad para el modelo B.

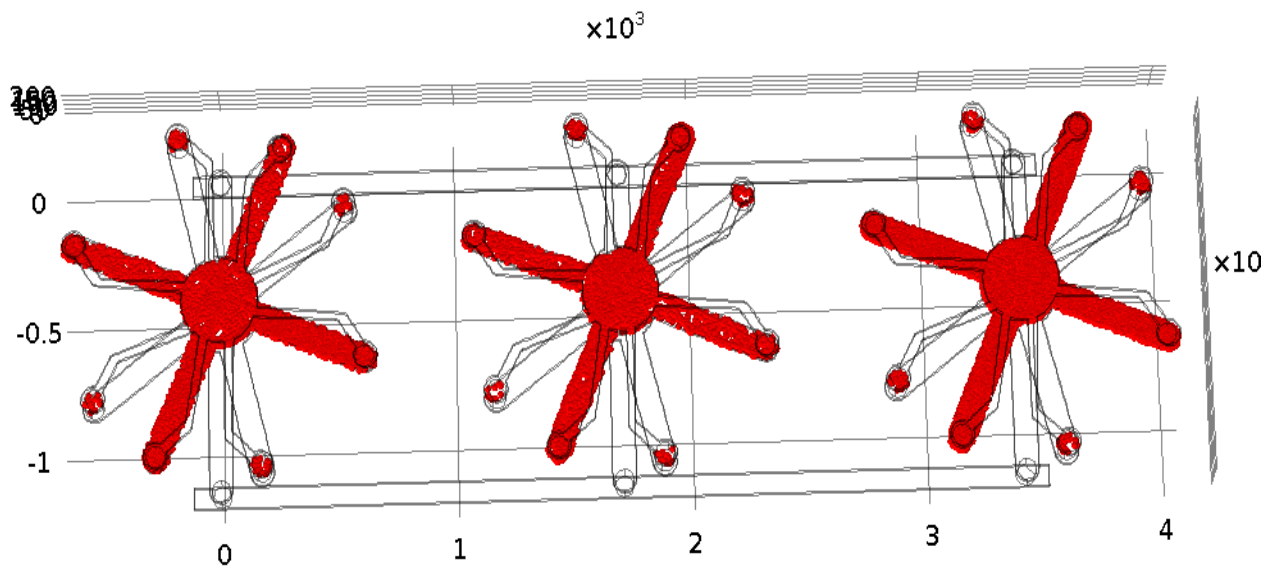


Figura 68. Gráfico de Poincaré para el modelo B.

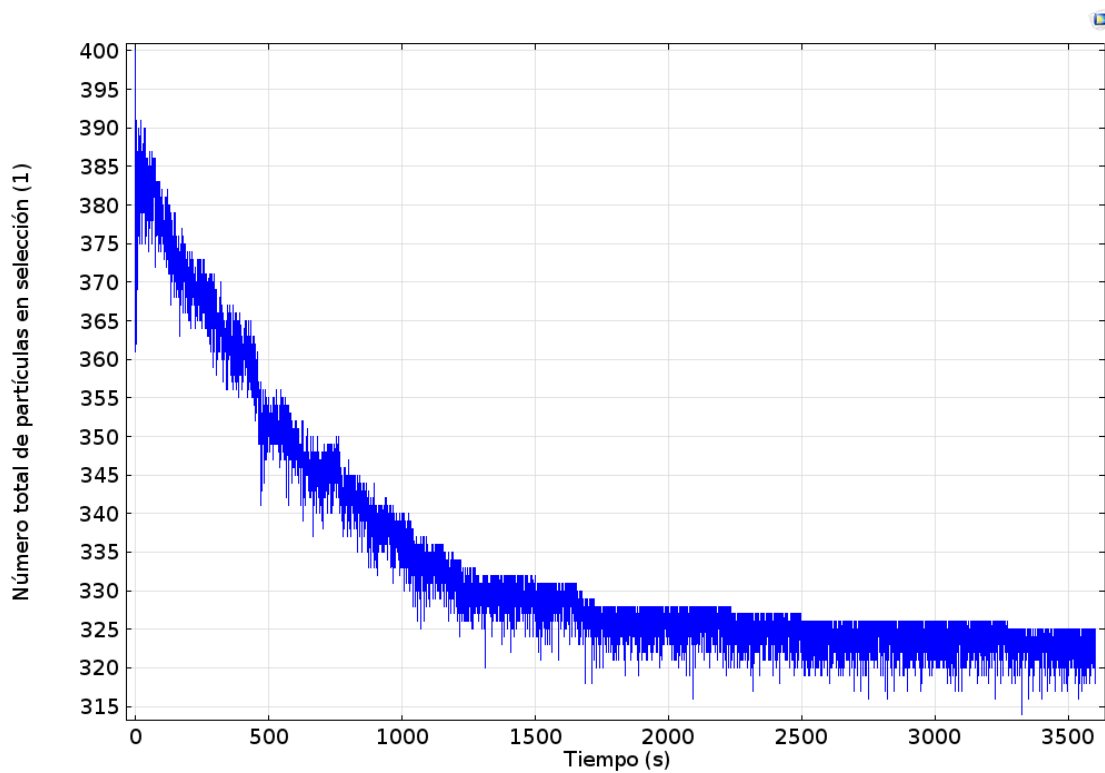


Figura 69. Número total de partículas en función del tiempo de para el arreglo de 3 dispositivos del modelo B.

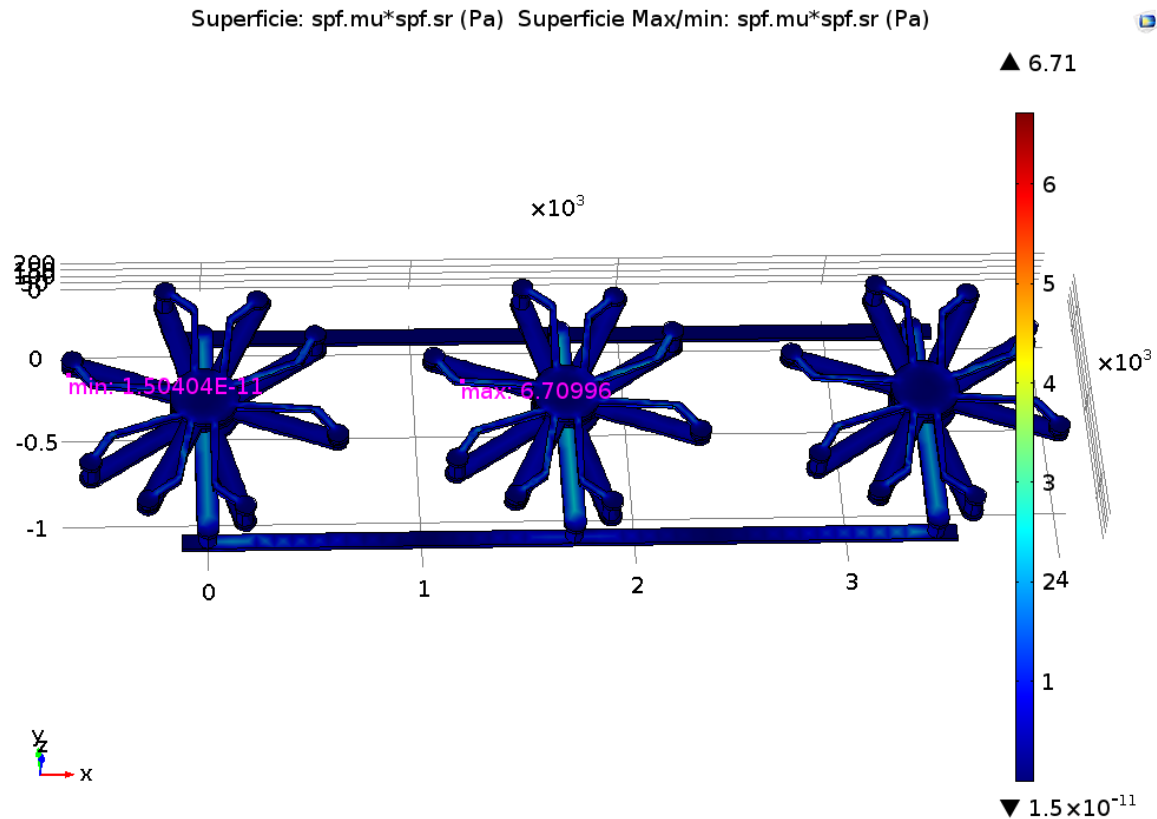


Figura 70. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de dispositivos del modelo B.

Para el modelo C se utilizó la configuración en paralelo de dispositivos representada en la Figura 72. Se mantuvo la velocidad del fluido durante toda la corrida a igual que en los dos modelos anteriores, este presentó una eficiencia de confinamiento del 94,25%, con un número total de partículas al final de la corrida de 377, como se muestra en la Figura 75.

En la figura 73 se representó la magnitud de la velocidad mediante cortes transversales y el posicionamiento de las partículas se muestra mediante el diagrama de Poincaré, este gráfico obtenido es para el tiempo de estabilización de las partículas.

El esfuerzo cortante máximo que se obtuvo con los 3 dispositivos del modelo C conectados fue de 0.0468 Pa y el mínimo valor es de 2.5368×10^{-6} Pa, como se observa en la Figura 76. Considerando estos valores y tomando como referencia el valor máximo del esfuerzo cortante de la vena humana, se llega a la conclusión de que la experimentación con este modelo es lo suficientemente segura para garantizar que la membrana celular no sufrirá daño durante el experimento, aun manteniendo la velocidad de entrada constante en 50 $\mu\text{m/s}$.

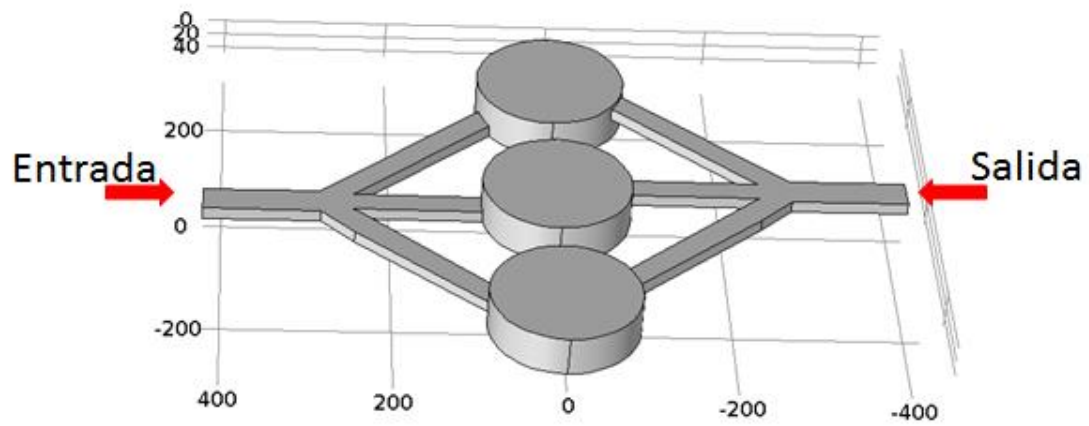


Figura 71. Arreglo de tres dispositivos microfluídicos del modelo C.

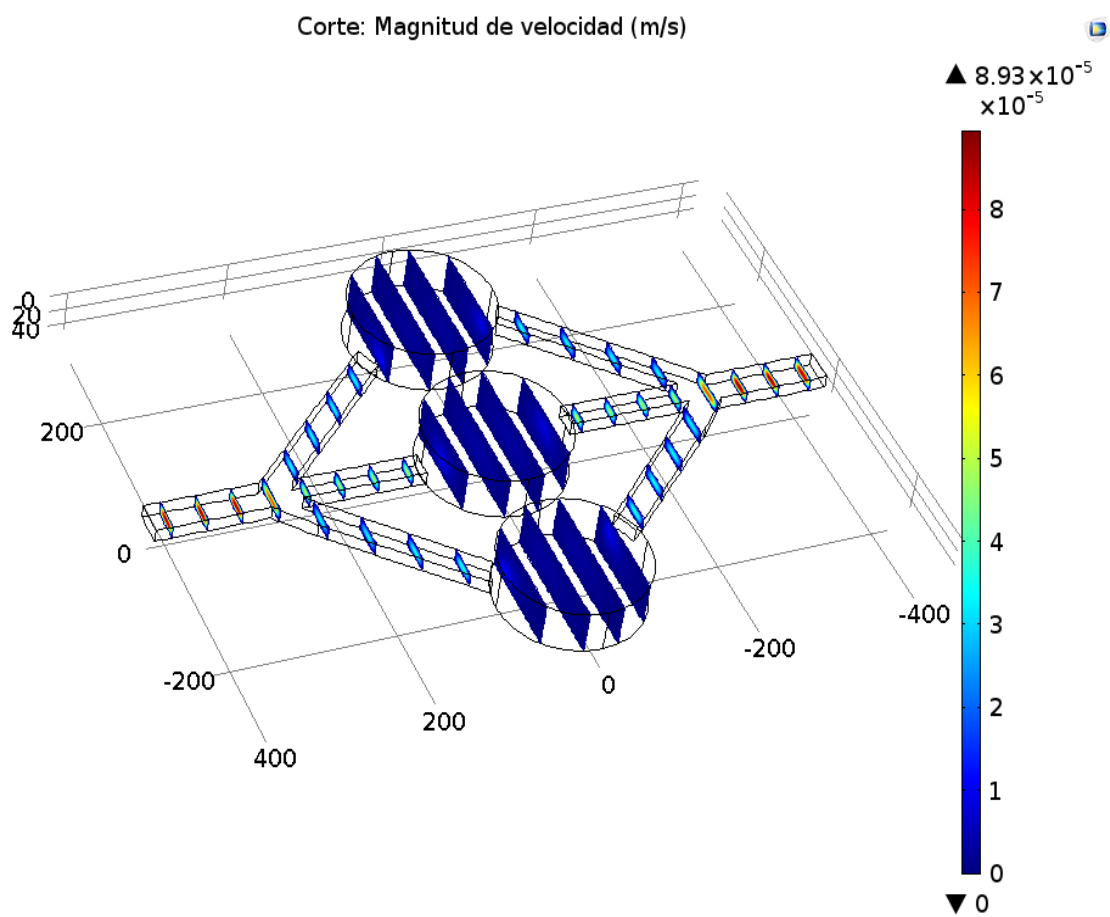


Figura 72. Magnitud de la Velocidad para el modelo C.

Gráfico de Poincaré Superficie: 1 (1)

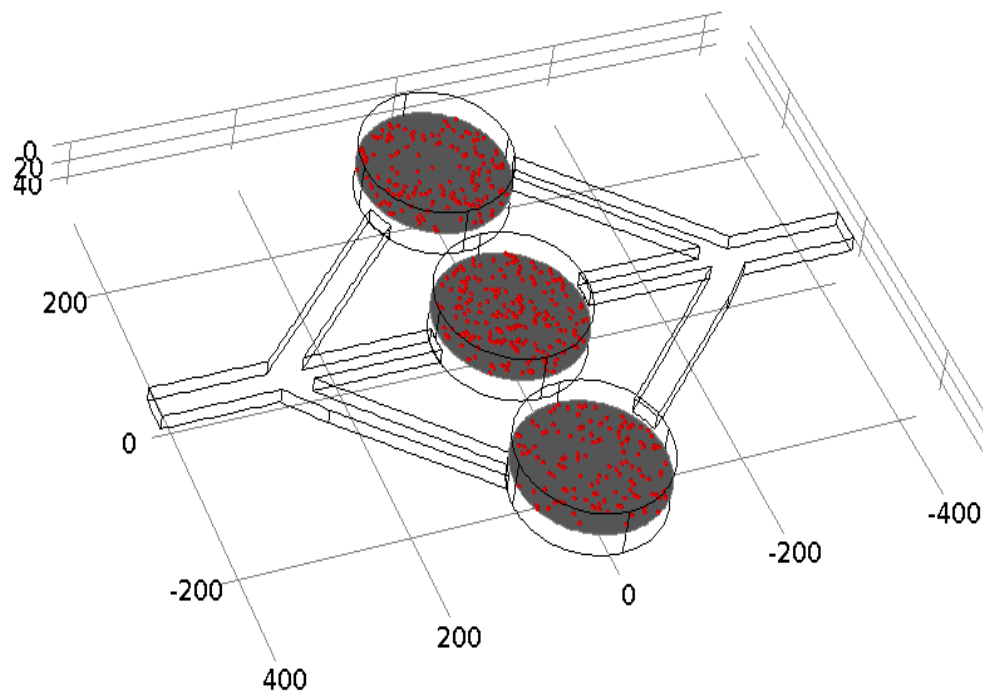


Figura 73. Gráfico de Poincaré para el modelo C.

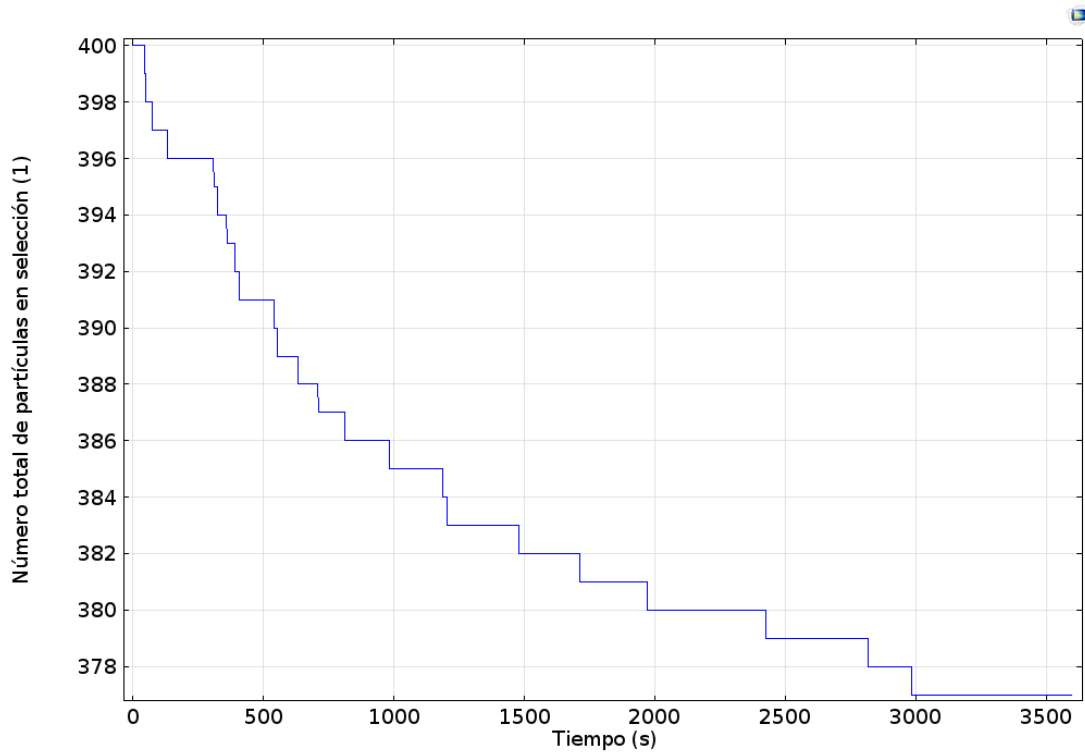


Figura 74. Total de partículas confinadas en función del tiempo del arreglo de tres dispositivos del modelo C.

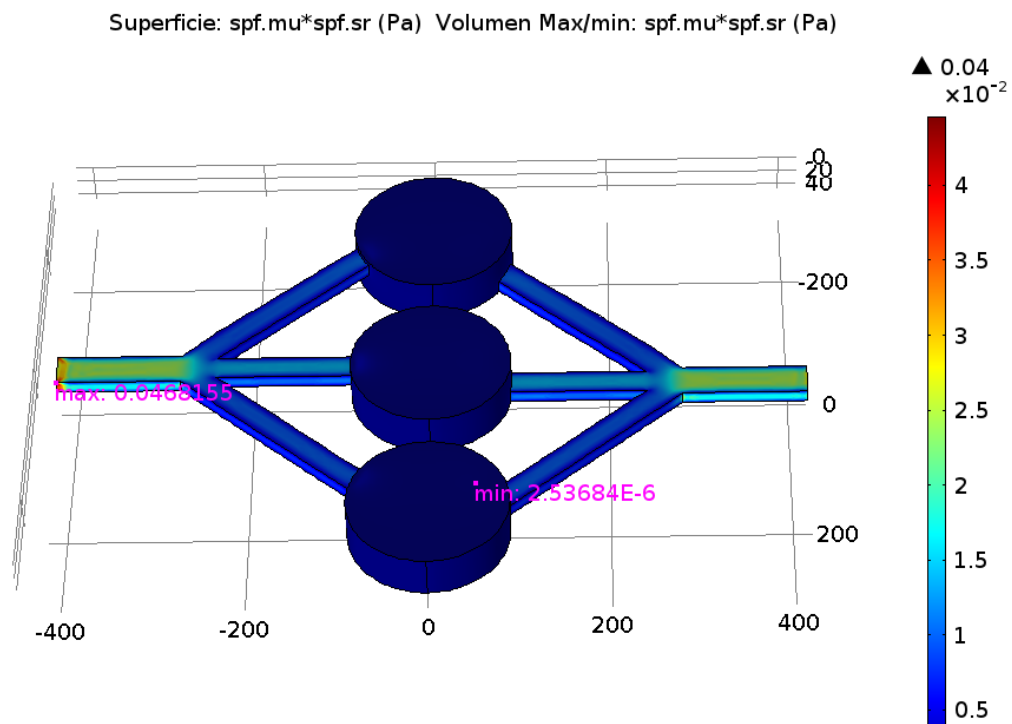


Figura 75. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de tres dispositivos del modelo C.

La comparación de los tres arreglos se resume en la Tabla 15.

Tabla 15. Comparación de los arreglos de tres dispositivos para un tiempo de corrida de 3600s

Modelo	Esfuerzo cortante máximo (Pa)	Esfuerzo cortante mínimo (Pa)	Eficiencia de confinamiento (%)
A	0.087	1.42×10^{-6}	51.25
B	6.7	1.5×10^{-11}	81.25
C	0.047	2.5×10^{-6}	94,25%

Dado que en el tiempo $t=3600s$, los dispositivos A, B, y C aún no han alcanzado el estado estable, se extiende el tiempo de simulación para determinar la eficiencia de confinamiento en estado estable. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Comparación de los arreglos de tres dispositivos en estado estable

Modelo	Esfuerzo cortante máximo (Pa)	Esfuerzo cortante mínimo (Pa)	Eficiencia de confinamiento (%)	Tiempo de estado estable (s)
A	0.087	1.42×10^{-6}	42.5	6648,5
B	6.7	1.5×10^{-11}	77.75	7000
C	0.047	2.5×10^{-6}	94.25	2949.5

Con el fin de realizar simulación con velocidades más reales a la velocidad de la sangre en el cuerpo humano, se procedió a simular los 3 dispositivos microfluídicos con una velocidad de $400\mu\text{m/s}$ esta velocidad es la velocidad de la sangre en los vasos capilares del cuerpo humano.

Tabla 17. Condiciones de simulación para los 3 modelos.

Modelos	Tiempo de corrida	Cantidad de dispositivos serie/paralelo	Cantidad de partículas introducidas	Diámetro de la Célula	Densidad de la célula	Velocidad de entrada
A, B y C	3600 s	3	400	$5 \mu\text{m}$	1080kg/m^3	$400\mu\text{m/s}$

MODELO A

La geometría utilizada fue la de Figura 76, donde se hizo una nueva corrida con las condiciones de la tabla 16, donde se obtuvo un perfil de velocidad representado en la Figura 77, en la Figura 78 se muestra la ubicación de las partículas confinadas en un plano cortante de $20 \mu\text{m}$ para el final de la corrida de la simulación mediante un diagrama de Poincaré.

En la Figura 79 muestra de una manera cuantitativa la cantidad de partículas confinadas a través del tiempo, en este se observa que el confinamiento se estabiliza a los 2326.5s con una cantidad de 395 partículas, esto representa una eficiencia del dispositivo de 98,75%. El primer reservorio confinó 187, el segundo 144 partículas y el reservorio tercer reservorio 64; esto indica que este dispositivo no presenta una distribución uniforme de las partículas, esta diferencia de distribución entre las microcámaras se debe a la hidrodinámica que presenta el sistema donde existe un fenómeno conocido como fenómeno de filtración donde las células no pueden existir en el espacio cercano a la pared del microcanal a causa de su propio tamaño, entonces se produce un efecto de Fahraeus el cual refiere que la concentración de las células se ve disminuida en los tubos pequeños con relación a los depósitos más grande que están conectados (Barbee and Cokelet, 1971; Faivre et al, 2006).

Para conocer el esfuerzo cortante presente en la microestructura en la figura 80, presenta los puntos máximos y mínimos del esfuerzo cortante teniendo este un valor máximo de 0.70128 Pa y un valor mínimo de 5.3613×10^{-6} , tomando en cuenta los valores de referencia de los esfuerzos cortantes de la tabla 14 donde el rango de esfuerzo cortante de la vena humana es de 0.1 a 1 Pa, nos indica que el máximo esfuerzo cortante del modelo A esta por debajo de 1 Pa, en consecuencia las partículas no estarían en riesgo de ser dañadas utilizando esta velocidad de fluido.

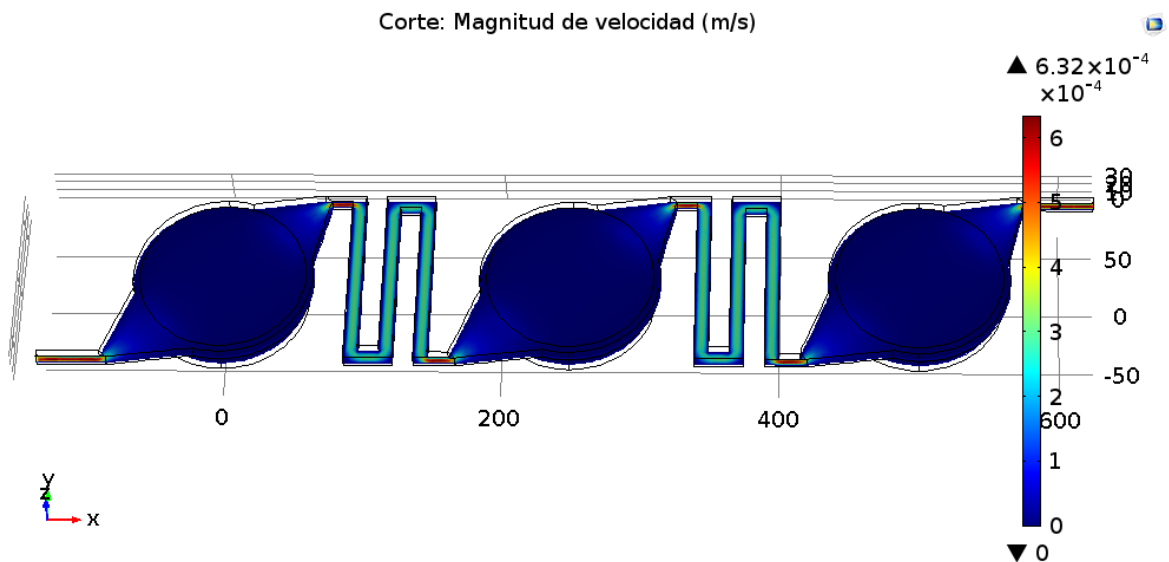


Figura 77. Magnitud de la velocidad para el modelo A a una velocidad de $400 \mu\text{m/s}$

Gráfico de Poincaré Superficie: 1 (1)

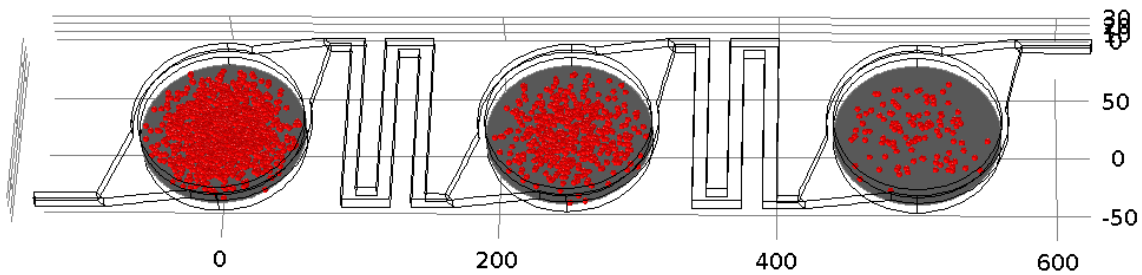


Figura 77. Mapa de Poincaré del modelo C a los 3600s

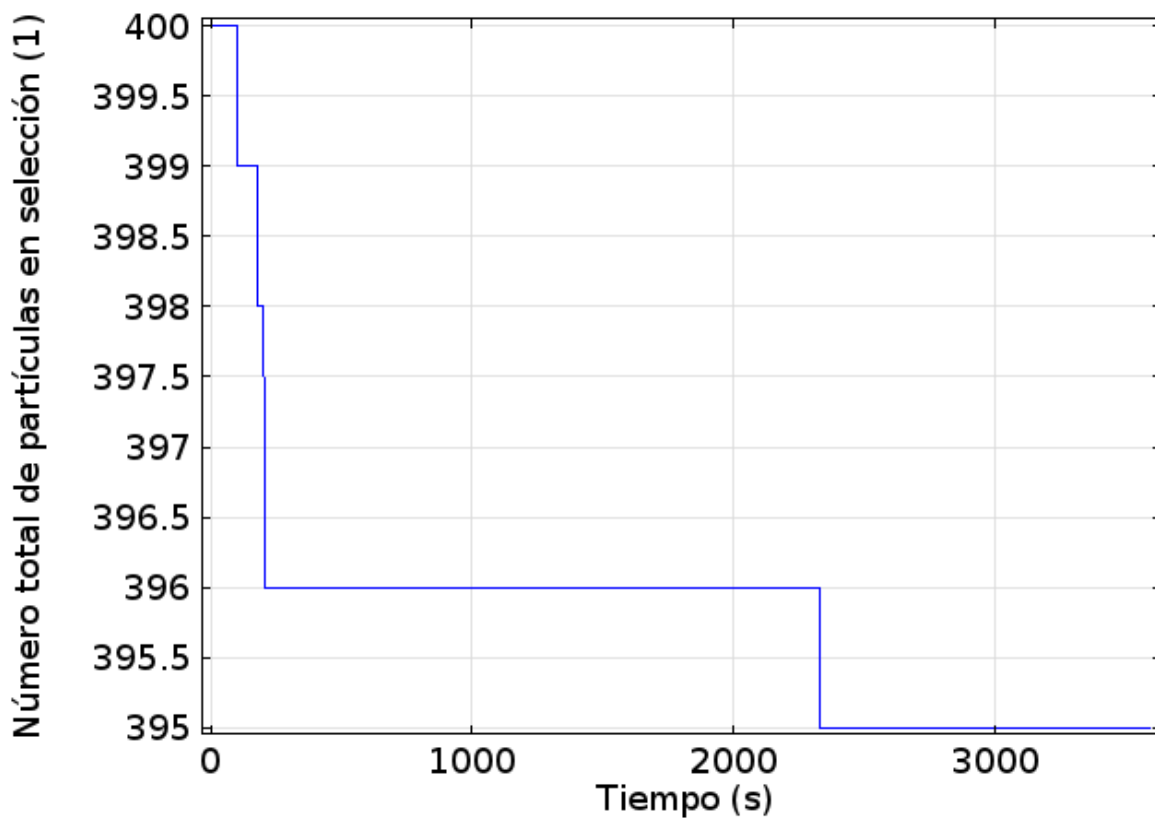


Figura 78. Numero de partículas confinadas en función del tiempo del modelo A.

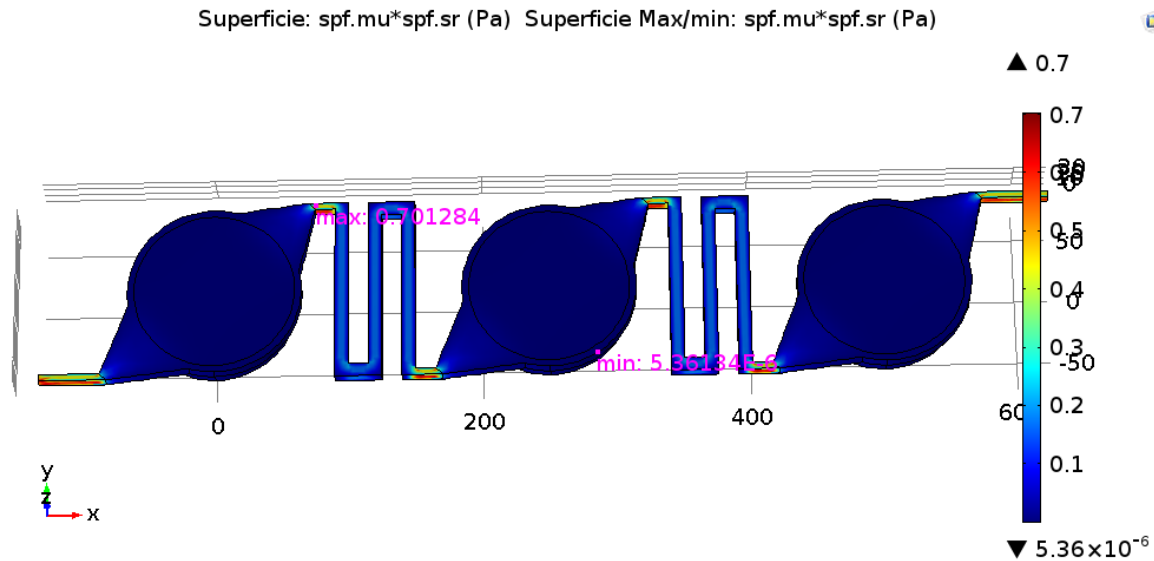


Figura 79. Esfuerzo cortante en toda la superficie del modelo y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante presentes en el arreglo de dispositivos del modelo A.

Modelo B

La geometría utilizada para modelar este modelo esta ilustrada en la Figura 71, donde la representación gráfica de la magnitud de la velocidad se visualiza en la Figura 81. Este modelo se empieza a estabilizarse alrededor de los 3401.5s con un número total de partículas confinadas de 377 manteniéndose este número de partículas hasta el final de la corrida como se observa en la figura 83 para una eficiencia de 94.25%. La ilustración de la posición de las partículas en un plano cortante a una altura $189\mu\text{m}$ se representa en el diagrama de Poincaré de la figura 82.

El esfuerzo cortante de la microestructura se representó mediante una superficie donde nos indica el máximo y el mínimo valor de esfuerzo cortante, a una velocidad de $400\mu\text{m/s}$ el máximo esfuerzo cortante tiene un valor de 53.6801 Pa, este valor es mucho mayor a los valores de referencia de la tabla 14 donde el máximo valor es el de la arteria humana que tiene un valor de 50 Pa, y en este caso tomamos la velocidad presente en los vasos capilares donde el esfuerzo cortante va desde los 0.1 a 1 Pa, por lo tanto este modelo a esta velocidad de perfusión destruiría la célula.

En este sistema el primer dispositivo de la Figura 82 confinó 132, el segundo reservorio cuenta con 120 partículas y el tercer reservorio con un total de 125, esto indica que el sistema presenta una buena distribución de las partículas en las microcámaras.

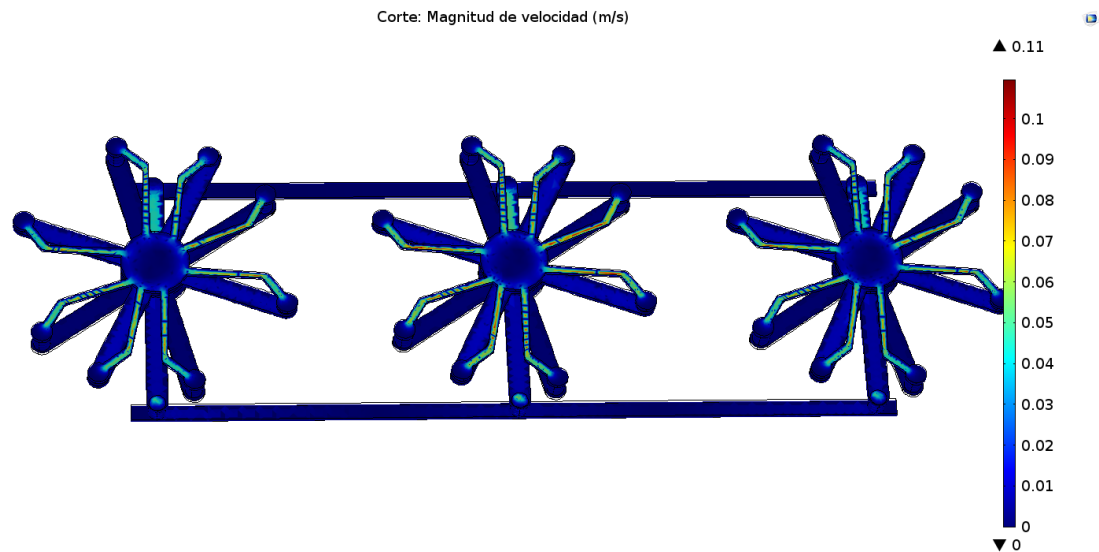


Figura 80. Magnitud de la Velocidad para el Modelo B.

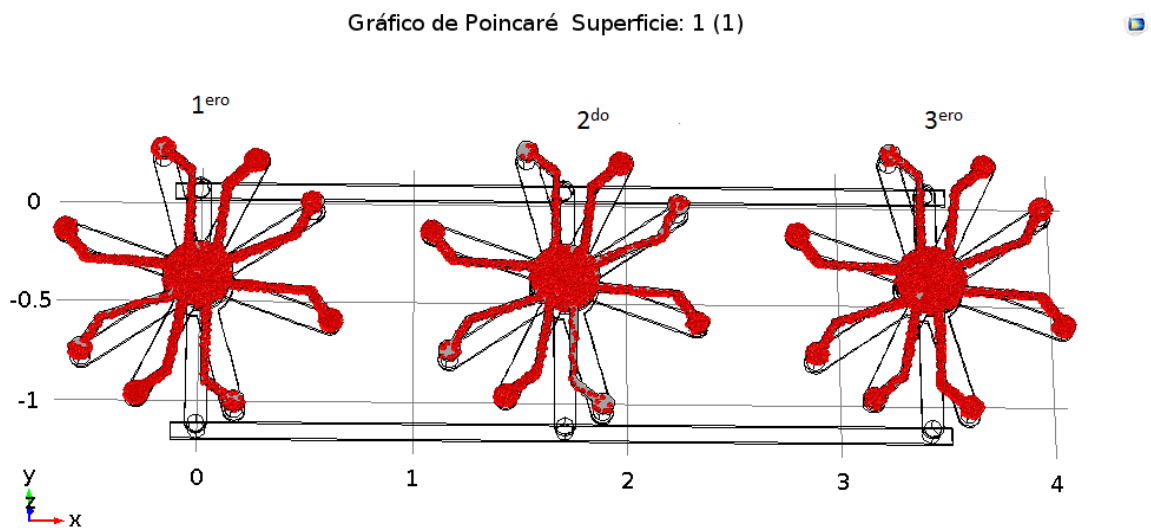


Figura 81. Diagrama de Poincaré para el modelo B.

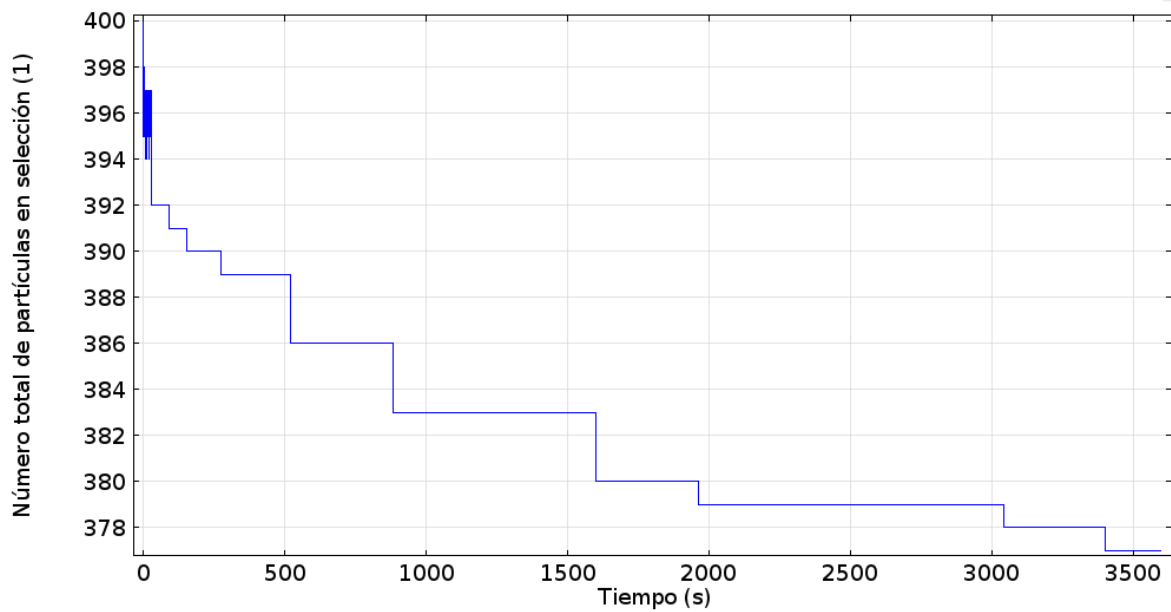


Figura 82. Número total de partículas en función del tiempo de para el arreglo de 3 dispositivos del modelo B.

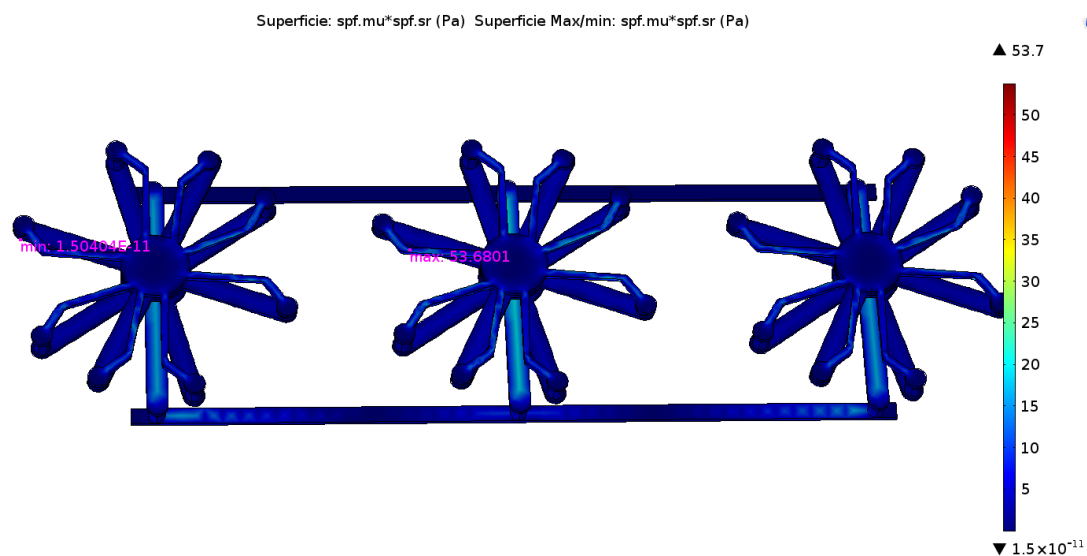


Figura 83. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de dispositivos del modelo B.

Modelo C

Para la simulación de este modelo se utilizó la geometría de la Figura 72, en este caso se obtuvo un perfil de la magnitud de la velocidad mediante un corte transversal en el eje xz como se muestra en la Figura 85, en la Figura 86, se representó la posición de las partículas para un tiempo de 3600s por medio del diagrama de Poincaré.

El gráfico de la figura 87, muestra al final de la corrida un confinamiento final de 399 partículas estabilizándose el sistema en un tiempo de 215,50s teniendo una eficiencia de 99.75%. El esfuerzo cortante máximo presente en la estructura tiene un valor de 0.374524Pa y un mínimo valor de 2.02947×10^{-5} Pa, esto nos indica que estos valores están dentro el rango de los valores de esfuerzo cortante de la tabla 14 para los vasos sanguíneos, siendo el valor máximo de este 1Pa, para este modelo garantizamos que las células no mueran por daños relacionados con el esfuerzo cortante.

Los reservorios de la Figura 86, presenta un confinamiento de partículas para la primera microcámara de 122, para la segunda de 158 y para la tercero de 119, en segundo presenta una mayor captura ya que se encuentra directamente conectado al microcanal de entrada de las células. Por lo tanto, esta confina más que las otras dos, pero se observa una buena distribución de las partículas.

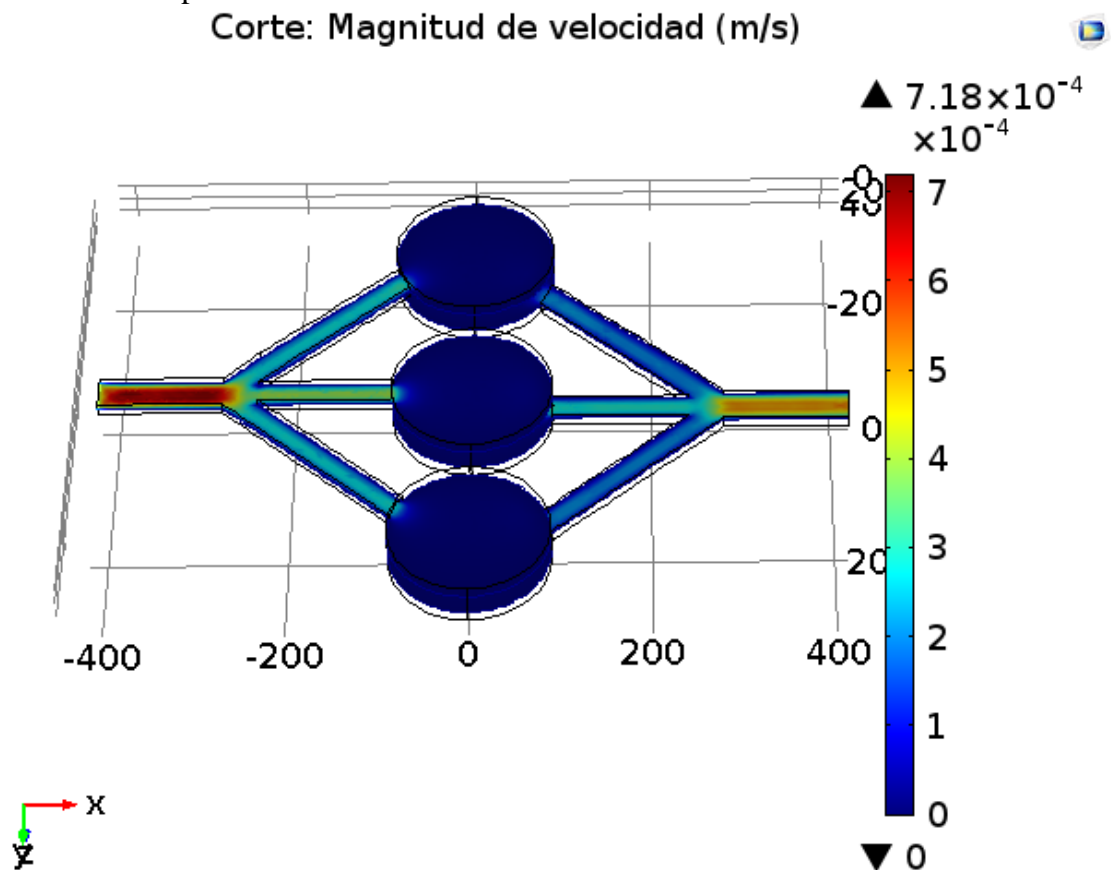


Figura 84. Magnitud de la Velocidad para el modelo C.

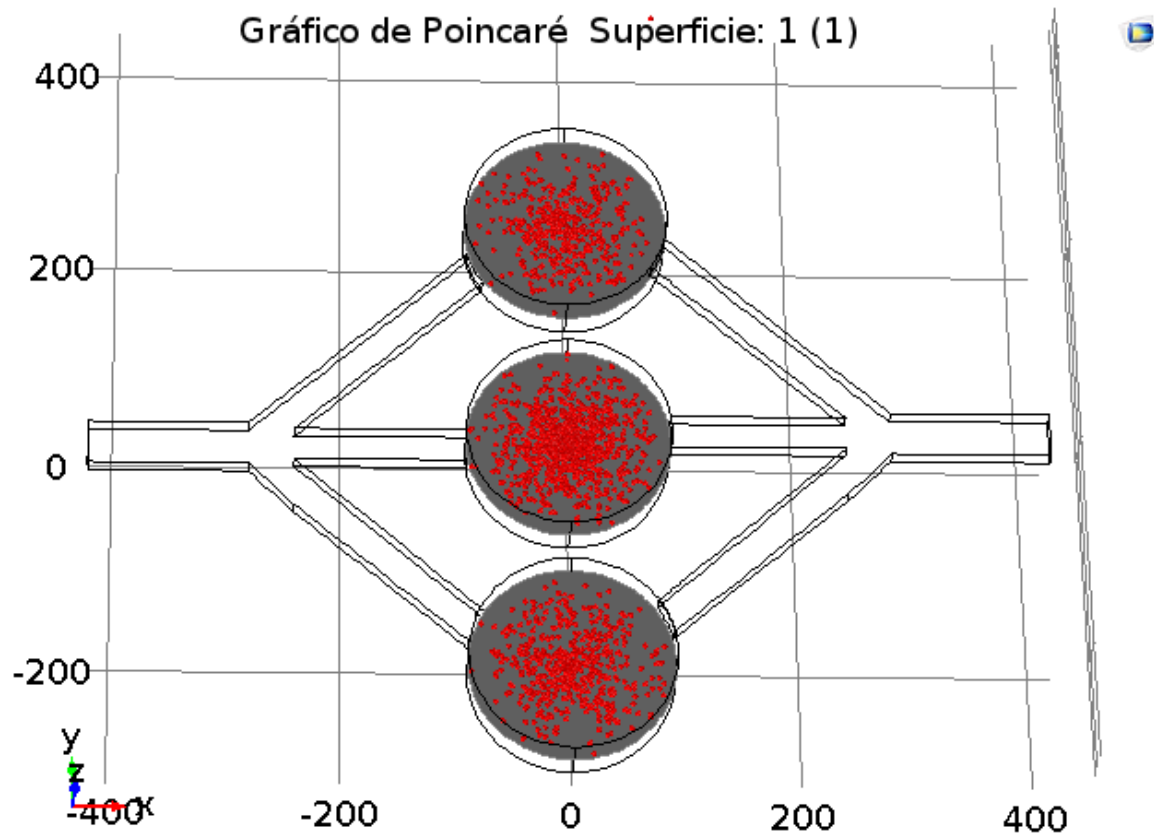


Figura 85. Mapa de Poincaré del modelo C para un tiempo de 3600s.

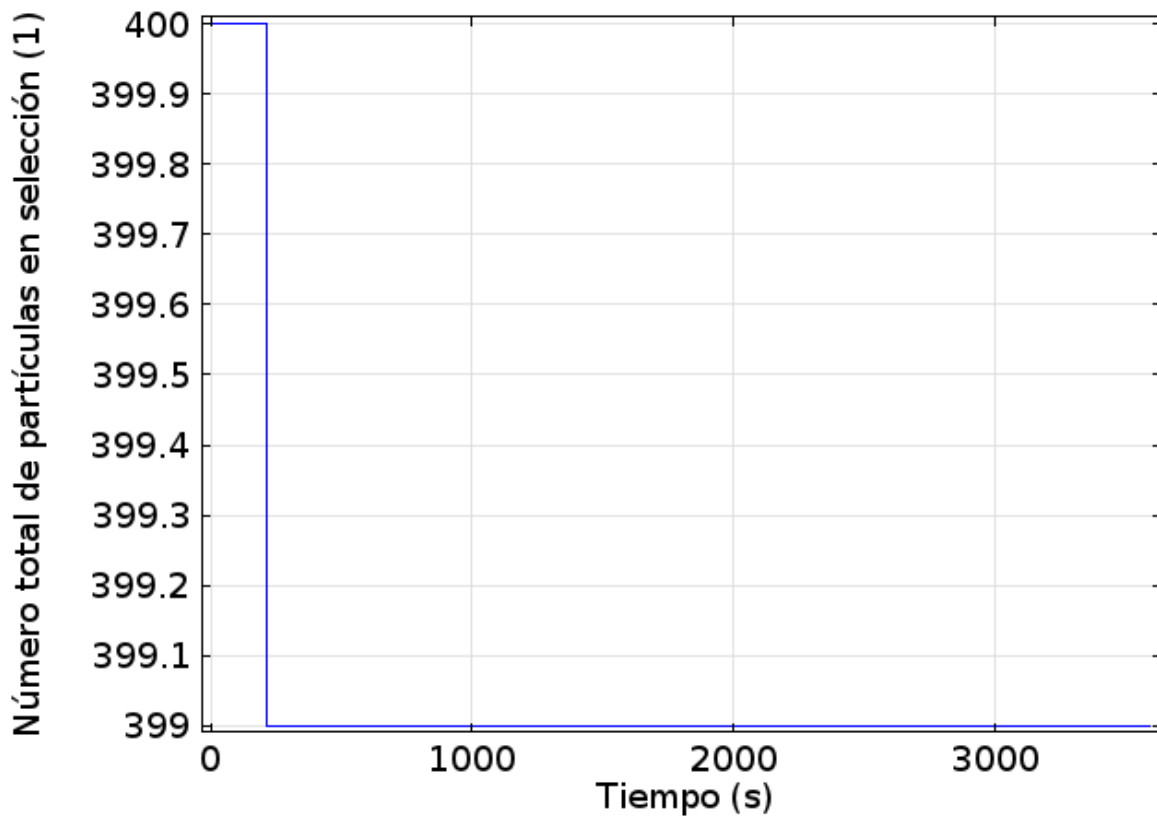


Figura 86. Cantidad de partículas confinadas al transcurrir el tiempo para el modelo C.

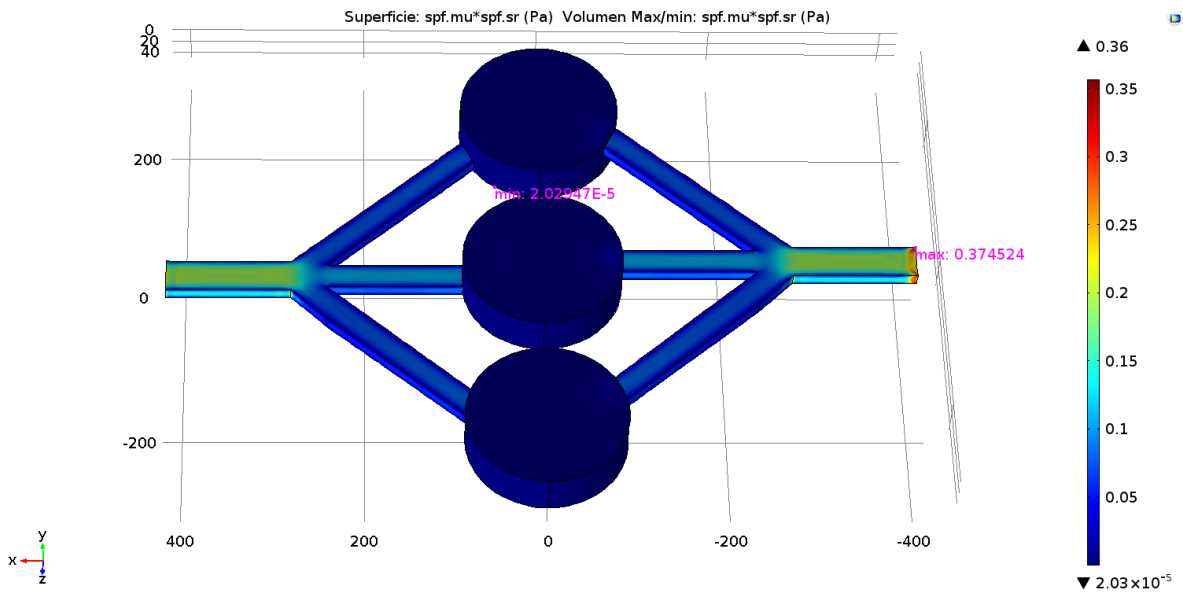


Figura 87. Esfuerzo cortante y puntos de máximo y mínimo valor de esfuerzo cortante en el arreglo de tres dispositivos del modelo C.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Los 3 modelos estudiados fueron diseñados con el fin de confinar células hidrodinámicamente sin la utilización de fluidos electroosmóticos o el confinamiento de células por dielectroforesis, sino mediante mecánica de fluidos, considerando no utilizar campos eléctricos para la manipulación de las células para no intervenir con la medición.

Para la simulación multifísica se usaron dos módulos particulares de COMSOL Multiphysics: flujo laminar y rastreo de partículas en el flujo de un fluido. Estas dos físicas fueron relacionadas para lograr una convergencia por medio del solucionador de la herramienta.

Al analizar el comportamiento de los dispositivos individuales adecuando las condiciones de operación para cada modelo, en los tres se obtuvo un buen porcentaje de confinamiento de células. De acuerdo con los resultados resumidos en la Tabla 15, en el modelo A se obtuvo una eficiencia de confinamiento alrededor del 42,5, en el modelo B un 77,5%, y en el modelo C la eficiencia del confinamiento fue alrededor del 94,25%, por lo cual el modelo óptimo en términos de eficiencia de captura es el modelo C.

Las geometrías de los modelos A y C tienen en común que confinan las células en reservorios circulares con una cierta profundidad; éstas varían entre sí por el método de dinámica de fluidos que se utilizó para el confinamiento.

El modelo A se basa en crear perfiles de velocidad que obligan a la célula a bajar al fondo del reservorio, donde la magnitud de la velocidad es casi nula, quedando así atrapadas. En el modelo B las partículas ingresan desde abajo. Una vez que el reservorio está lleno con la disolución, en el fondo se obtiene una magnitud de velocidad cero, y arriba, alrededor de la salida, es donde aumenta la velocidad, creando un vacío en el fondo del dispositivo. Para la experimentación con estos dos dispositivos y para utilizar un arreglo de éstos, la forma idónea es la conexión en paralelo, compartiendo la misma entrada y la misma salida.

El diseño B es más complejo de fabricar en comparación con los modelos A y C, siendo esta su principal desventaja, ya que experimentar con varios dispositivos en serie sería más complejo de fabricar y muy costoso. Esfuerzo cortante en este dispositivo B tiene su punto máximo en un valor de 6.7 Pa.

Tras realizar una comparación detallada de un arreglo de tres dispositivos para los tres modelos y bajo las mismas condiciones de operación, se logró concluir que el modelo más efectivo en términos de confinamiento de células, facilidad de microfabricación, esfuerzo cortante e ideal para la colocación de los electrodos para la medición de la impedancia es el modelo C.

Al analizar los 3 dispositivos bajo condiciones semejantes a las del cuerpo humano, obtuvimos una eficiencia para el modelo A de 98,75%, para el modelo B 94.25% y para el modelo C 99.75%, los 3 modelos presentaron buena eficiencia pero el esfuerzo cortante del modelo B fue de 53.68Pa el cual es un valor lo suficientemente alto como para destruir la célula, teniendo esto como referencia se llega a la misma conclusión anteriormente mencionada el modelo más idóneo para la aplicación requerida y fabricación es el modelo C.

RECOMENDACIONES

Para lograr una mayor eficiencia en la captura de células, se recomienda que en el proceso de microfabricación se exponga la superficie del sustrato a dos anticuerpos. Primeramente, el anticuerpo IgG disuelto en una solución salina de fosfato; luego de esta primera exposición se realiza una segunda exposición al segundo anticuerpo humado EpCAM igualmente disuelto en una solución salina de fosfato. Con este proceso de exposición se lograría una mejor adherencia de las células tumorales circundantes, manteniéndolas unidas al anticuerpo reduciendo el riesgo de que las células se escapen de las cámaras de confinamiento.

Se recomienda que la solución donde estén diluidas las células sea un compuesto de suero de bovino fetal y solución salina de fosfato; esto con el objetivo de mantener las células alimentadas y puedan cumplir su ciclo metabólico necesario para mantenerlas con vida durante el tiempo de la medición de impedancia.

REFERENCIAS

- [1] Spandana Gannavaram, “Modeling And Design Optimization Of A Microfluidic Chip For Isolation Of Rare Cells”, Purdue University, Indianapolis, Indiana, December 2013.
- [2] Maria J. Lopez M, “Micro/Nanoherramientas para aplicaciones de Células Vivas”, Barcelona, Espana 2008.
- [3] Whitesides GM, “The Origins and the Future of Microfluidics”, *Nature*, 442, 2006, 368-373.
- [4] Paloma A, Vilchis L. “Fabricación De Un Dispositivo Microfluido Para El Estudio De Fluidos Complejos”, Mexico, 2011.
- [5] Bashir R, “Biomems: State-of-the-Art in Detection, Opportunities and Prospects, *Advanced Drug Delivery Reviews*”, 56, 2004, 1565-1586.
- [6] Arcaceli Ortega L, Emma M. Sanchez M, Brenda Soto S. “Diseno y simulación del flujo de sangre en microcanales para la separación de los elementos formes, basándose en el proceso biológico de la filtración glomerular” Instituto Politecnico Nacional, Mexico DF, 5 de Diciembre del 2011.
- [7] Martin Robinson, Stefan Luding, Marco Ramaioli, “Fluid-particle flow and validation using two-away-coupled mesoscale SHP-DEM” *aMultiscale Mechanics*, University of Twente, Enschede, Netherlands, Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland. 14 de Junio 2013. <http://arxiv.org/abs/1301.0752v2>
- [8] Introducción a la medida de Impedancia Eléctrica de Tejidos Biológicos. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6187/01Ysm01de07.pdf?sequence=1>
- [9] Carlos Pérez L. “Equipo de espectroscopia de Bioimpedancia eléctrica en el margen de 1kHz-1MHz”. <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/7041/Equipo%20de%20espectroscopia%20de%20bioimpedancia%20el%C3%A9ctrica.pdf>
- [10] María E. Moncada María del P. Saldarriaga Andrés F. Bravo Carlos R. Pinedo, “Medición de Impedancia Eléctrica en Tejido Biológico”, *Rev. Tecno Lógicas* No. 25, ISSN 0123-7799, Diciembre de 2010, pp. 51-76
- [11] Min-Cheol Kim, Zhanhui Wang, Raymond H. W. Lam, y Todd Thorse, “Building a better cell trap: Applying Lagrangian modeling to the design of microfluidic devices for cell biology”, *Journal of Applied Physics*, *J. Appl. Phys.* 103, 044701 (2008); doi: 10.1063/1.2840059
- [12] Eric M. Johnson-Chavarria, Melikhan Tanyer, Charles M. Schroeder, “A Microfluidic-based HydrodynamicTrap for Single Particles”, *JoVE*. 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2517>, DOI: 10.3791/2517

[13] Ling-Sheng Jang y Min-How Wang, “Microfluidic device for cell capture and impedance measurement”, *Biomed Microdevices* (2007) 9:737-743 DOI:10.1007/s10544-007-9084-0

[14] Takashi Ohnaga & Yutaka Shimada & Makoto Moriyama & Hiroyuki Kishi & Tsutomu Obata & Koji Takata & Tomoyuki Okumura & Takuya Nagata & Atsushi Muraguchi & Kazuhiro Tsukada, “Polymeric microfluidic devices exhibiting sufficient capture of cancer cell line for isolation of circulating tumor cells”, *Biomed Microdevices* (2013) 15:611–616, DOI 10.1007/s10544-013-9775-7

[15] Ali Khademhosseini,^a Judy Yeh, Sangyong Jon, George Eng,^b Kahp Y. Suh, Jason A. Burdick^b and Robert Langer. “Molded polyethylene glycol microstructures for capturing cells within microfluidic channels”, *Miniaturisation For Chemistry, Biology & Bioengineering*, School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University, Seoul 151–742, Korea. Received 31st March 2004, Accepted 21st May 2004.

[16] Shinji Sugiura, Jun-ichi Edahiro, Kyoko Kikuchi, Kimio Sumaru, Toshiyuki Kanamori. “Pressure-Driven Perfusion Culture Microchamber Array for a Parallel Drug Cytotoxicity Assay”, *Biotechnology and Bioengineering*, Japan. Published online 19 February 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/bit.21836.

[17] Vega-Sánchez, Christopher. Comunicación personal del 02 de Diciembre de 2015.

[18] D. L. Vickers et al., “Lectin-mediated microfluidic capture and release of leukemic lymphocytes from whole blood,” *Biomedical Microdevices.*, vol. 13(3), pp. 565- 571, 2011.

[19] Y. Taamneh and K. M. Bataineh, “Drag and Separation Flow Past Solid Sphere with Porous Shell at Moderate Reynolds Number,” in *Transport in Porous Media.*, vol. 90(3), 2011, pp. 869-881.

[20] Andrea Santana, Gabriela Verdezoto “Estudio del estado del arte, modelamiento y simulación de MEMS (Micro-Electro-Mechanical-Systems) para el diseño de un prototipo orientado al área de automatización y control” Sangolquí - Ecuador 2011.

[21] Alejandro K. Jimenez Z. “Fabricación de microsistemas de alta resolución con tecnología laser” Mexico, DF, 201

[22] Kathryn Adele Maiellaro, *Microfabricated Silicon Microchannels For Cell Rheology Study*, Florida, Eeuu. 2003

[23] Dittrich PS and Manz A, “Lab-on-a-Chip: Microfluidics in Drug Discovery, *Nature Reviews Drug Discovery*”, 5, 2006, 210-218.

- [24] Janasek D, Franzke J, and Manz A, "Scaling and the Design of Miniaturized Chemical-Analysis Systems", *Nature*, 442, 2006, 374-380
- [25] Pérez-Castillejos R, "Study and Applications of Ferrofluids in Microfluidics", in *Departamento de Electronica*. 2003, Universidad Politecnica de Catalunya, Barcelona.
- [26] Verpoorte E, De Rooij NF, "Microfluidics Meets MEMS", in *Proceedings of the IEEE*, 2003.
http://www-mtl.mit.edu/researchgroups/mem-salon/Hongwei_microfluidicMEMS.pdf
- [27] Madou M, "Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization", Boca Raton (FL), USA: CRC Press 2012.
- [28] Paul O, Gaspar J, and Ruther P, "Advanced Silicon Microstructures, Sensors, and Systems", *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, 2, 2007, 199-215
- [29] *Biomedical Applications for Mems and Microfabrication*, Available from: http://www.memsinvestorjournal.com/2006/08/biomems_has_bee.html#more
- [30] Bhushan B, "Nanotribology and Nanomechanics of MEMS/NEMS and Biomems/Bionems Materials and Devices", *Microelectronic Engineering*, 84, 2007, 387-412.
- [31] Bhattacharya S, Jang J, Yang L, Akin D, and Bashir R, "Biomems and nJournal of Rapid Methods and Automation in Microbiology", 15, 2007, 1-32.
- [32] Bashir R, "Biomems to Bionanotechnology: Interfacing Life Sciences and Engineering at the Micro and Nanoscale", *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 225, 2003, U989-U989.
- [33] Nadim Morhell, "Microviscosimetro Capilar Para Fluidos Complejos", *Universidad Nacional de Cuyo*, Argentina, Agosto 2015.
- [34] Sung Sik Lee, Kyung Hyun Ahn and Seung Jong Lee, Kyung Sun, Petrus T. Goedhart and Max. R Harderman, "Shear Induced of red blood cells monitored by the decrease of their deformability". *Korea-Australia Rheology Journey*, 2004.
- [35] Yusuf Chisti, "Hydrodynamic Damage to Animal Cells", *Critical Reviews in Biotechnology*, 21(2):67-110 (2001). <http://www.massey.ac.nz/~ychisti/HydroD.pdf>