

Fabricación mediante láser de dispositivos preclínicos funcionales para el estudio de patologías in-vitro bajo condiciones de flujo



María Aymerich¹, Ezequiel Álvarez², Carmen Bao-Varela¹, Isabel Moscoso², José Ramón González-Juanatey² y M. Teresa Flores-Arias^{1,*}

¹Grupo de Investigación Photonics4LifeFacultad de Física, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, E15782 España

²Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago(IDIS); Fundación Ramón Domínguez, SERGAS; 15706 Santiago de Compostela, España y CIBERCV, Madrid, España

*maite.flores@usc.es



FONDO EUROPEO DE DESENVOLVEMENTO REGIONAL
"Unha maneira de facer Europ."



AGENCIA ESTADAL DE INVESTIGACIÓN



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA
Secretaría Xeral de Universidades



UNIÓN EUROPEA
FONDO SOCIAL EUROPEO
"O FSE inviste no teu futuro"

Resumen

En este trabajo se presenta un método para la fabricación de dispositivos preclínicos que mimeticen vasos sanguíneos en condiciones fisiopatológicas para estudios in vitro. El proceso de fabricación combina una técnica de escritura indirecta láser [1] sobre vidrio comercial con métodos de litografía blanda para obtener el dispositivo final en polidimetilsiloxano (PDMS) [2]. La rugosidad del dispositivo se modifica de manera controlada mediante un tratamiento térmico estático posterior. Los canales son validados biológicamente y se recubren totalmente con células endoteliales. Se realizará también un estudio de la adhesión celular con la rugosidad del dispositivo [3], buscando las características óptimas del canal para llevar a cabo experimentos de flujo.

Palabras clave: microestructurado láser, ablación láser, litografía blanda, PDMS, materiales biocompatibles, modelos preclínicos in-vitro complejos

Fabricación de los dispositivos

Fabricación con láser del canal sobre vidrio

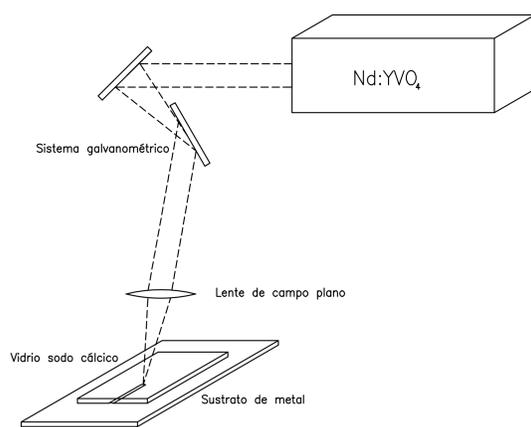
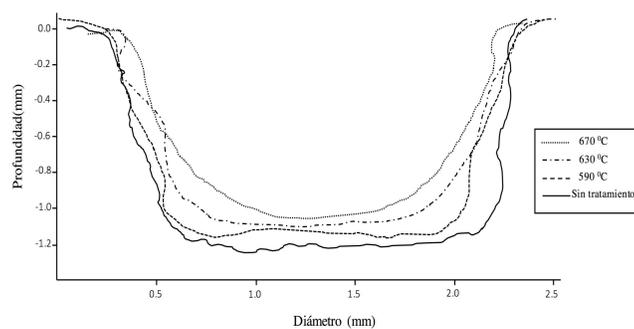


Fig. 1: Esquema del montaje láser empleado para fabricar el canal. Para ello se utilizó un láser Q-switch Rofin Nd:YVO4, trabajando en su longitud de onda fundamental de 1064 nm y duración de pulso de 20 ns. El haz focaliza sobre una lámina de metal colocada bajo el vidrio. Las partículas expelidas en la ablación impactan en la cara inferior del vidrio y generan la estructura deseada.

Tratamiento térmico para modificar la rugosidad



	Sin tratamiento	590 °C	630 °C	670 °C
Profundidad (mm)	1,215±0,010	1,107±0,010	1,069±0,010	1,030±0,010
Rugosidad (nm)	5285,01±304,56	1528,01±100,01	400,84±20,31	27,18±4,52

Fig. 2: Diferentes tratamientos térmicos estáticos se le aplican al molde de vidrio para modificar su rugosidad. En la figura se presenta la modificación del perfil del canal cuando se aplican diferentes tratamientos térmicos durante 2 horas. La tabla presenta la variación de la profundidad y rugosidad de los canales con los diferentes tratamientos.

Replicado en PDMS y sellado

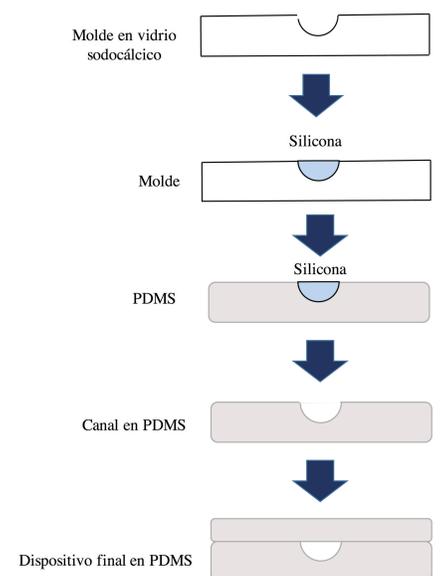


Fig. 3: Esquema del proceso de replicado del molde de vidrio en PDMS mediante litografía blanda. La técnica de sellado es la descrita por Unger et al. [4].

Recubrimiento endotelial y dependencia de la adhesión celular con la rugosidad

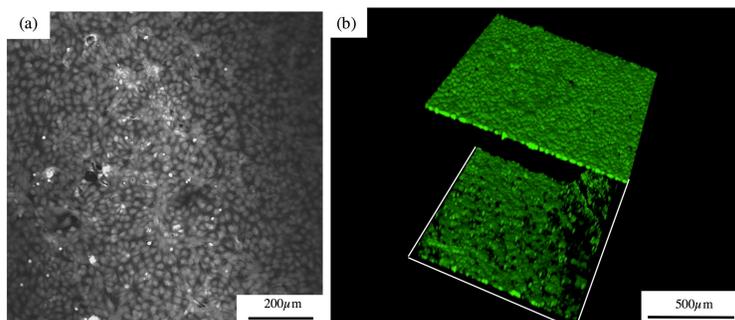


Fig. 4: a) Imagen de microscopía de fluorescencia de la base del canal con células endoteliales, donde puede apreciarse que el dispositivo es biocompatible. b) Imagen confocal del recubrimiento de la totalidad del canal, que se realiza en dos etapas debido a las dimensiones del canal.

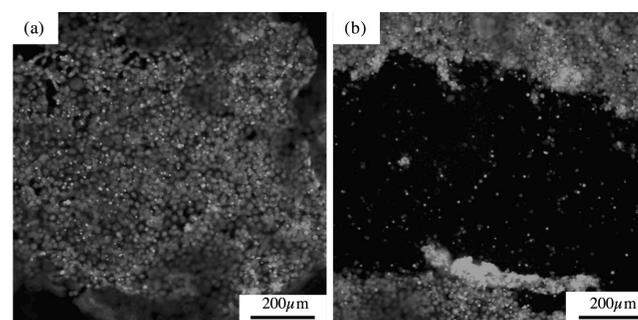


Fig. 5: Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células endoteliales tras haber perfundido flujo a 1ml/min durante 8 horas a través a) del canal sometido a un tratamiento térmico a 590°C, donde las células aguantan, y b) del dispositivo sometido a 630°C, donde la rugosidad es tan baja que las células se despegan.

Conclusiones

En este trabajo se ha mostrado la fabricación de un dispositivo preclínico totalmente funcional. Gracias a la versatilidad y precisión de la tecnología láser, el diseño se realizó fácilmente sobre vidrio mediante una técnica de escritura indirecta láser. El molde se replicó en PDMS y finalmente se obtuvo un dispositivo cerrado que mimetiza vasos sanguíneos de dimensiones intermedias. La rugosidad del dispositivo se modificó de manera controlada mediante un tratamiento térmico estático. Mediante un proceso en dos pasos, el dispositivo se recubrió totalmente de células endoteliales, validándolo biológicamente. Se estudió la adherencia celular según la rugosidad de las paredes, determinándose que una rugosidad de 1,53 μm , correspondiente a un tratamiento térmico de 590 °C, resulta óptima para evitar que las células se despeguen cuando se pasa flujo a través del dispositivo [5].

Referencias

- [1] Castelo, A., et al. "Laser backwriting process on glass via ablation of metal targets." *Optics communications* 273.1 (2007): 193-199.
- [2] Younan, X. and Whitesides, G. M. "Soft lithography." *Annual review of materials science* 28.1 (1998): 153-184.
- [3] Ross, A. M. et al. "Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity." *Small* 8, (2012):336-55.
- [4] Unger, M. A. et al. "Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography." *Science* 288.5463 (2000):113-116.
- [5] Aymerich, M. et al. "Laser technique for the fabrication of blood vessels-like models for preclinical studies of pathologies under flow conditions". *Biofabrication* 9.2 (2017): 025033.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto MAT2015-71119-R AEI/FEDER, UE, del Ministerio de Economía y Competitividad y ISCIII/PI14-01140/FEDER, Instituto de Salud Carlos III. M. Aymerich agradece una ayuda predoctoral a la Xunta de Galicia, cofinanciada por la Secretaría Xeral de Universidades y el Fondo Social Europeo.