



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD MONTERREY**

**DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO INTEGRADO Y BASADO EN  
POLÍMEROS PARA ENSAYOS DE PCR EN TIEMPO REAL**

**Tesis que presenta**

Oscar Jesús Benavides Morán

**para obtener el grado de Maestro en Ciencias en**

Ingeniería y Física Biomédicas

**Director de Tesis:**

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nuevo León

Diciembre, 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Al Dr. José Luis García Cordero,**

Por la confianza proporcionada para llevar a cabo este proyecto y, sobre todo, por las enseñanzas de vida.

### **A mis sinodales,**

Por su orientación y las recomendaciones siempre oportunas que me brindaron a lo largo de este trabajo.

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT),**

Por el financiamiento proporcionado durante el posgrado, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

### **Al CINVESTAV Unidad Monterrey,**

Por todas sus facilidades y apoyos durante mis estudios de maestría.

Agradezco particularmente:

Al personal administrativo, que amablemente estuvo siempre disponible para ayudarme en los trámites, solicitudes y dudas que requerí.

A Amelia Ríos y a Pablo Guevara, cuya guía y sugerencias están plasmadas en gran parte de este trabajo.

A los doctores Jesús Rodríguez y Bruno Escalante, por los invaluable momentos de charlas y regaños, pero sobre todo de risas.

A mis amigos de la generación 2016-2018, así como a mis amigos del laboratorio de BIO-ARTS. Su amistad, apoyo y enseñanzas permanecerán siempre conmigo.

**A mis papás, Oscar y Cuquis,**

Por su apoyo incondicional, por su amor en los momentos más difíciles, por siempre creer en mí y por hacerme sentir que soy capaz de lograr todo lo que me proponga.

**A mis hermanos, Lalo y María,**

Por su interés en mi quehacer del día a día. Por el reconocimiento que constantemente me hacen y que no siempre merezco. Por su alegría y compañía en la cercanía y en la lejanía.

**A mis abuelos, tíos y primos,**

Por estar siempre ahí, de una u otra forma, en cualquier lugar que me pueda imaginar. Por hacerme sentir muy afortunado de tenerlos.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. El DNA como molécula de identificación genética .....	2
1.2. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como técnica de replicación del DNA.....	3
1.3. La microfluídica como alternativa a las técnicas tradicionales de biología molecular .....	6
1.4. Planteamiento del problema.....	7
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
2.1. PCR en dispositivos microfluídicos.....	8
2.2. Antecedentes .....	16
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
4.1. Objetivo general .....	22
4.2. Objetivos específicos .....	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
5.1. Diseño de dispositivos microfluídicos .....	23
5.1.1. Dispositivo de pozos .....	24
5.1.2. Dispositivo con válvulas de acrílico.....	25
5.1.3. Dispositivo con válvulas de PDMS.....	27
5.2. Fabricación de dispositivos por micromaquinado .....	32
5.2.1. Dispositivo de pozos .....	33
5.2.2. Dispositivo con válvulas de acrílico.....	34
5.2.3. Dispositivos con válvulas de PDMS.....	35
5.2.4. Membranas de PDMS.....	36

5.2.5. Protocolo para sellado de dispositivos multicapas .....	37
5.2.6. Arreglos finales de dispositivos multicapas .....	40
5.3. Protocolo de aislamiento de RNA y síntesis de cDNA .....	40
5.3.1. Aislamiento de RNA de un tejido biológico .....	41
5.3.2. Síntesis de cDNA .....	42
5.4. qPCR en termociclador comercial .....	43
5.5. qPCR en termociclador portable.....	45
5.5.1. Ensayos en dispositivo de pozos .....	46
5.5.2. Ensayos en dispositivos con válvulas .....	47
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
6.1. Ensayos de qPCR en un termociclador comercial .....	51
6.2. Dispositivo microfluídico con válvulas integradas .....	59
6.3. Optimización del termociclador portable .....	72
6.3.1. Mejoras ópticas .....	72
6.3.2. El problema de la evaporación.....	85
6.4. Ensayos de qPCR en sistema integrado .....	96
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>109</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>111</b>

## RESUMEN

El ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) es una biomolécula utilizada para identificar las características genéticas de los seres humanos y, en general, de los organismos vivos. Su amplio estudio ha permitido el desarrollo de técnicas emergentes de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), cuyo propósito esencial radica en la detección y replicación de secuencias genéticas específicas mediante reacciones enzimáticas térmicas, lo que a su vez ha ampliado su uso al diagnóstico de enfermedades.

Sin embargo, la implementación de técnicas como la PCR no ha sido extendida a hospitales o centros de salud debido a que requieren de equipos sofisticados como los termocicladores, así como de infraestructura y técnicos especializados. En los últimos años, se ha hecho un esfuerzo importante por desarrollar plataformas integradas capaces de llevar a cabo esta técnica.

En este trabajo, se propone el desarrollo de un sistema integrado por un termociclador portable y dispositivos microfluídicos hechos a base de polímeros, estos últimos son comúnmente utilizados para aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad con reactivos y muestras biológicas. El sistema resulta sencillo de producir y manipular, dados los materiales que lo constituyen y las técnicas empleadas para su fabricación.

Una variante de esta técnica de amplificación, conocida como PCR en tiempo real (qPCR), fue implementada en el sistema integrado para monitorear y desplegar en tiempo real los cambios en la intensidad de fluorescencia del gen de control endógeno 18S rRNA, el cual estaba contenido en una muestra de cDNA colocada al interior de los pozos de un microdispositivo. Dicha muestra fue incorporada tanto de manera manual como semiautomatizada dependiendo del tipo de dispositivo utilizado.

Al introducir la muestra en un dispositivo integrado con válvulas, es posible aislarla de manera controlada. Sin embargo, las válvulas no evitaron la formación de burbujas dentro del dispositivo, por lo que los experimentos no pudieron llevarse a cabo de manera efectiva. Aun así, fue posible realizar ensayos de qPCR para diferentes concentraciones de cDNA en un microdispositivo de pozos, pudiéndose comparar los resultados obtenidos con los de experimentos realizados en un termociclador comercial.

## **ABSTRACT**

The deoxyribonucleic acid (DNA) is a biomolecule used to understand and identify the genetic characteristics of humans and, in general, of living organisms. Its broad study has spurred the development of emerging molecular biology techniques such as the Polymerase Chain Reaction (PCR), whose essential purpose lies in the detection and replication of specific genetic sequences by thermal enzymatic reactions, which has expanded its applications in diagnostics.

However, the implementation of techniques like PCR has not been extended to hospitals or medical centers because it requires sophisticated equipment such as thermocyclers as well as specialized infrastructure and trained technicians. In recent years, an important effort has been made to develop integrated platforms capable of carrying it out.

Here, we propose development of an integrated system composed of a portable thermocycler and microfluidic devices made of polymers. These polymers are commonly used for biomedical applications due to their biocompatibility with reagents and biological samples. The complete system is simple to produce and manipulate because of the materials that constitute it and the techniques used to manufacture it.

The implementation of a variant of this amplification technique, known as real-time PCR (qPCR), allows our integrated system to monitor in real time and display the changes in fluorescence intensity of the housekeeping gene 18S rRNA contained in a cDNA sample inside the microdevice, which can be incorporated either manually or semiautomated depending on the type of microfluidic device used.



By introducing the sample into an integrated device, the sample is isolated through a series of valves, which, nonetheless, do not prevent the formation of bubbles inside the device, so that the experiments could not be carried out effectively. Even so, it was possible to perform qPCR assays for different concentrations of cDNA in a microdevice with wells, with comparable results to those obtained in a commercial thermal cycler.

# 1. INTRODUCCIÓN

El diseño y la implementación de dispositivos capaces de llevar a cabo la detección oportuna de enfermedades es una de las grandes áreas de oportunidad en el desarrollo tecnológico en México, no sólo por la falta de estos, sino también porque los que llegan a ser desarrollados requieren de equipamiento costoso para su fabricación y operación.

En este trabajo se propone un sistema integrado capaz de llevar a cabo una técnica clásica de la biología molecular como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para la detección de DNA desde la perspectiva de la microfluídica; con lo cual se pretende dar una pequeña aproximación a la solución de las necesidades ya mencionadas.

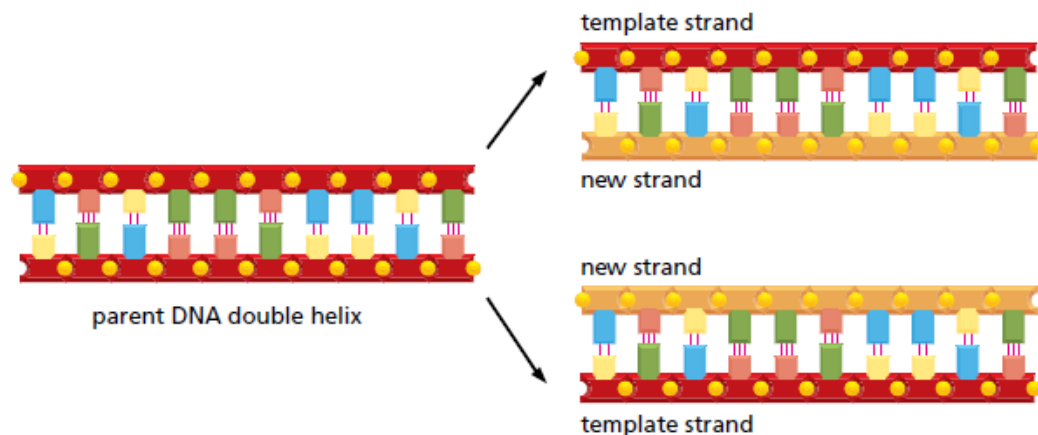
Tal labor no es sencilla, no sólo porque algunos de los materiales y reactivos necesarios para llevar a cabo estos ensayos son costosos e irremplazables, sino también porque la estandarización de protocolos tradicionales al mundo microscópico resulta, cuando menos, laboriosa, imperceptible y compleja.

Pese a las dificultades, se puede ser optimista al corroborar que los resultados de este trabajo permiten generar las perspectivas necesarias para continuar con el desarrollo del mismo, dado que es posible mejorar tanto el sistema propuesto como los ensayos llevados a cabo. A continuación, se explican las bases teóricas de la técnica de PCR y su implementación en dispositivos microfluídicos, así como los antecedentes directos a este trabajo; posteriormente, se detallarán la hipótesis y objetivos del proyecto; en otra sección se explicarán los materiales y métodos utilizados tanto para la fabricación del dispositivo microfluídico como para su integración en un sistema previamente desarrollado; finalmente, se mostrarán los resultados obtenidos, así como la discusión, conclusiones y perspectivas a partir de estos.

## 1.1. El DNA como molécula de identificación genética

El DNA o ácido desoxirribonucleico es la molécula encargada de, entre otras funciones, almacenar la información genética de los organismos vivos. Esta información se conoce como genoma, un conjunto de genes que bien pueden considerarse como las unidades de la herencia, puesto que representan las secuencias específicas de DNA que determinan las características particulares de los organismos y que pueden ser heredadas de generación en generación. En los seres humanos estos segmentos particulares de DNA determinan las condiciones tanto genotípicas (e.g. predisposición a enfermedades y tipo de sangre) como fenotípicas (e.g. color de piel, cabello y ojos) de cada individuo.

En la **Figura 1** se observa como el DNA, en su estructura secundaria, se presenta como una hélice de doble cadena, donde cada una de ellas puede servir a su vez como una plantilla para sintetizar una cadena complementaria en un proceso conocido como *replicación del DNA*, y siendo esta la manera en que la información genética se transmite a través de las generaciones [1].



**Figura 1.** En la replicación del DNA las cadenas individuales de la doble hélice son “separadas” y utilizadas como plantillas en la síntesis de nuevas dobles cadenas de DNA. Tomada de [1].

Por lo tanto, la importancia del DNA como molécula capaz de identificar las características genéticas de los individuos, así como su rol en el estudio de la herencia ha permitido el desarrollo de actividades como el análisis forense, las

pruebas de paternidad y, en general, los exámenes genéticos para detectar enfermedades o la predisposición a las mismas [2].

## **1.2. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como técnica de replicación del DNA**

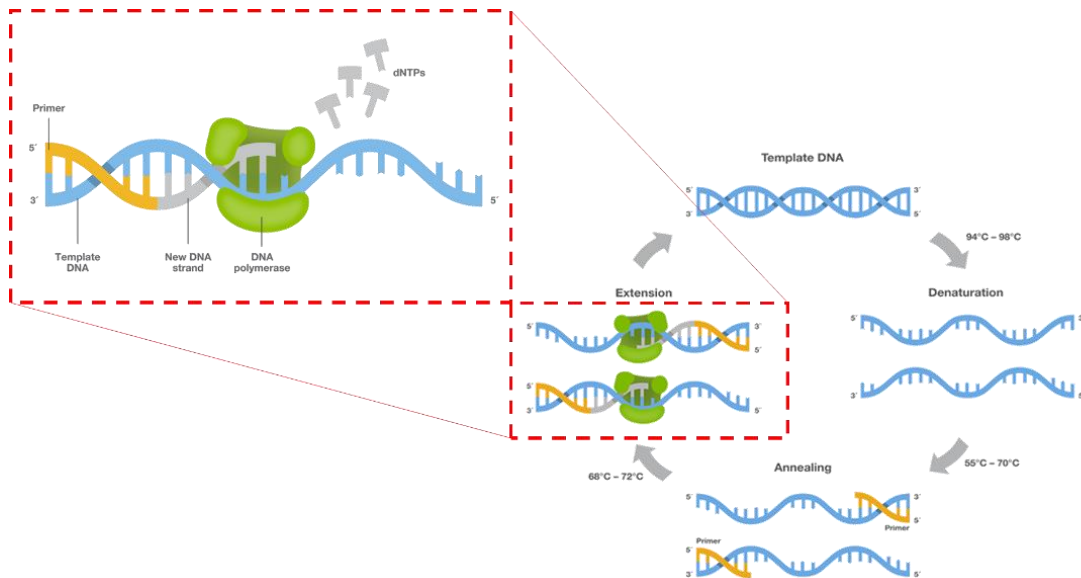
La PCR es una técnica utilizada para amplificar el DNA. El hecho de poder crear múltiples copias a partir de una pequeña muestra de este ácido nucleico tiene tanto propósitos forenses como de comparación de muestras entre pacientes sanos y enfermos, esto es, dado que no es posible observar el DNA y resulta difícil medir qué tan abundante es una determinada muestra con respecto a otra cuando sus concentraciones son bajas (i.e. una o pocas moléculas de DNA) [3]. De la misma manera, la PCR permite determinar qué tan concentrada se encuentra una secuencia de DNA particular dentro de la muestra analizada. En casos patológicos, podría no haber una manifestación de síntomas en la persona durante la etapa más temprana de la enfermedad debido al bajo número de moléculas de DNA patógeno, por lo que después del proceso de amplificación es posible identificar la presencia de virus o bacterias dentro de la muestra de interés aun en los primeros días del padecimiento.

Uno de los fundamentos de la PCR es la enzima polimerasa, la cual se encarga de sintetizar las secuencias complementarias de bases a las cadenas sencillas de DNA a partir de los dos extremos de un gen específico, lo que favorece la amplificación de dicho gen aun dentro de una muestra con secuencias que no sean de interés [3]. Estos extremos permiten el agregado de nucleótidos complementarios y se establecen a partir de un par de moléculas conocidas como cebadores o 'primers', las cuales son secuencias cortas de ácidos nucleicos (aproximadamente de 20 nucleótidos y en general de no más de 50) con un grupo 3' hidroxilo libre capaz de formar pares de bases complementarias a una cadena sencilla o molde de DNA. De tal forma que la polimerasa puede unirse al extremo 3' de los cebadores e iniciar la síntesis de la nueva cadena de DNA complementaria en su dirección 5'-3' [4].

Para llevar a cabo la PCR se llevan a cabo ciclos repetitivos de cambios en la temperatura, pues el aumento y disminución de esta permite controlar las uniones y acciones de los 'primers' y de la enzima polimerasa (**Figura 2**). En primer lugar, la temperatura se incrementa a 95 °C, permitiendo que las dobles cadenas de DNA sean separadas en cadenas sencillas [3,4] mediante la ruptura de los enlaces hidrógeno que unen los nucleótidos de cada cadena individual, proceso conocido como *desnaturalización* [4]. A continuación, se disminuye hasta aproximadamente 50 °C (variando según la temperatura de fundición o *T<sub>m</sub>* de los 'primers'), provocando la *hibridación* de los 'primers' en los extremos del gen de interés [3,4] mediante puentes de hidrógenos estables, proceso también conocido como *alineación* [4]. Finalmente, se aumenta hasta 72 °C, la cual es la temperatura óptima de operación de la polimerasa para sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria a la plantilla previamente desnaturalizada, lo hace a partir de los cebadores y mediante la incorporación de desoxinucleósidos trifosfatos libres (dNTPs, por sus siglas inglés), esta última fase se conoce como *elongación* o *extensión*. Por lo tanto, al término de cada ciclo hay el doble de moléculas de DNA con respecto al número de cadenas con las que se inició dicho ciclo [3,4]. Después de que este proceso se repite entre 40 y 50 veces es posible obtener varios millones de copias del gen amplificado, las cuales pueden visualizarse como una banda luminosa en un gel de poliacrilamida, donde la muestra es colocada al finalizar la PCR, proceso conocido como PCR convencional o de punto final.

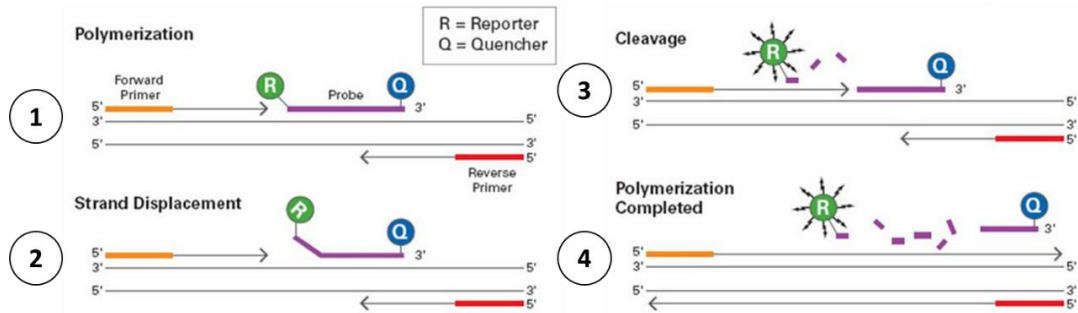
Además de la PCR convencional, una variación de la técnica conocida como PCR en Tiempo Real (qPCR) lleva a cabo todos los pasos anteriormente descritos con la ventaja de que el progreso de la reacción es monitoreado en tiempo real por medio de una cámara o un detector [3] de fluorescencia. Al colocar un marcador de fluorescencia en la muestra a amplificar (el cual es capaz de unirse tanto a la cadena original de DNA como a sus subsecuentes copias), es posible cuantificar el cambio en la fluorescencia de la muestra con respecto a la fluorescencia basal conforme la reacción se lleva a cabo, es

decir, se puede observar un aumento en la fluorescencia toda vez que la cantidad de DNA es mayor en cada ciclo de la PCR.



**Figura 2.** Procesos llevados a cabo durante la PCR a partir de una plantilla de DNA: Fases de desnaturalización, alineación y extensión; es en esta última donde se replica el DNA, como se muestra en la ampliación de la fase. Adaptada de [Thermo Fisher Scientific].

Los marcadores para qPCR pueden ser tanto colorantes fluorescentes (e.g. SYBR Green) como sondas fluorescentes (e.g. TaqMan). El segundo caso se trata de segmentos específicos de DNA complementario al gen de interés marcados con un reportero fluorescente en un extremo y con una molécula 'quencher' en el otro, esta última es la encargada de inhibir la emisión de fluorescencia del reportero mientras la sonda permanece unida al gen de interés. La fluorescencia incrementa cuando la enzima polimerasa rompe la unión física entre el reportero y el 'quencher' durante la fase de elongación de la PCR. En la **Figura 3** se esquematiza el mecanismo previamente descrito.



**Figura 3.** Mecanismo de una sonda TaqMan. 1. Al inicio de la replicación (i.e. 'polimerization') del DNA existe una unión física entre el reportero fluorescente y la molécula inactivadora o 'quencher'. 2. 3. La enzima polimerasa lleva a cabo su acción en la fase de extensión de la PCR y cuyo desplazamiento favorece la ruptura de la sonda. 4. Al término de la replicación, la fluorescencia emitida se debe a la liberación del reportero. Tomada de UPODMG 1516 irivbrro con licencia [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)], de Wikimedia Commons.

### 1.3. La microfluídica como alternativa a las técnicas tradicionales de biología molecular

Los dispositivos microfluídicos son, como su nombre lo indica, instrumentos capaces de hacer uso de cantidades muy pequeñas de líquido (e.g. microlitros) para llevar a cabo ensayos típicos de laboratorio. Algunas de sus principales características son las que se enlistan a continuación [5]:

- 1) Poseen microcanales donde el flujo suele ser laminar y, por lo tanto, determinista, lo que permite modelar matemáticamente su comportamiento.
- 2) Son capaces de integrar microválvulas y microbombas para controlar de manera automatizada los fluidos que se les incorporen, reduciendo los errores humanos por manipulación y el costo de operación.
- 3) Consumen una considerable menor cantidad de reactivos que los sistemas macroscópicos, y producen bajas cantidades de desechos.
- 4) Poseen dimensiones pequeñas, lo que los vuelve potencialmente portables y trasladables a lugares de bajos recursos.

Al plantear su uso como herramienta biológica alternativa, la portabilidad de sus ensayos al lugar específico donde se requiera un diagnóstico (i.e. 'point-

of-care'), así como la significativa reducción de reactivos, hacen de la biología molecular llevada a cabo en escalas microscópicas una opción más eficiente [5] y en ocasiones incluso más relevante dada la gran cantidad de información que se puede llegar a obtener de un único ensayo.

#### **1.4. Planteamiento del problema**

Este proyecto surge a partir de la problemática que representa el diagnóstico temprano de enfermedades en México, así como de la necesidad de contar con dispositivos capaces de proporcionar diagnósticos rápidos y certeros con base en las técnicas emergentes de biología molecular como la PCR. Un ejemplo de esta problemática se manifiesta en el método de diagnóstico que actualmente se usa en hospitales para identificar el DNA bacteriano en padecimientos como la sepsis neonatal: el hemocultivo. Estos cultivos de bacterias poseen una sensibilidad de apenas 5 a 10% de casos confirmados del total de sospechados [6], mientras que el tiempo necesario para obtener los resultados es de 5 hasta 14 días [7], el cual es suficiente para que las complicaciones de la infección se presenten en el neonato, incluida la probabilidad de deceso.

En respuesta a esta problemática, el uso de la microfluídica como alternativa para llevar a cabo la amplificación del DNA mediante técnicas como la PCR se remonta incluso a trabajos reportados hace 25 años [5]. Desde entonces se han desarrollado diferentes tipos de dispositivos integrados con elementos como calentadores y válvulas, los cuales pretenden simplificar cada vez más el proceso de detección y/o llevarlo a cabo en tiempos muy cortos.

Estos dispositivos, además, deben de ser fáciles de producir y manipular, dados los materiales con que estén constituidos. Por ejemplo, el polimetilmetacrilato (PMMA), también conocido como acrílico, es precisamente un material comúnmente utilizado en la industria manufacturera debido a su bajo costo, por lo que es posible emplearlo para la producción en



masa de dispositivos desechables. Además, sus aplicaciones pueden extenderse incluso para llevar a cabo ensayos de PCR, dada su compatibilidad con reactivos biológicos y químicos [5][8].

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

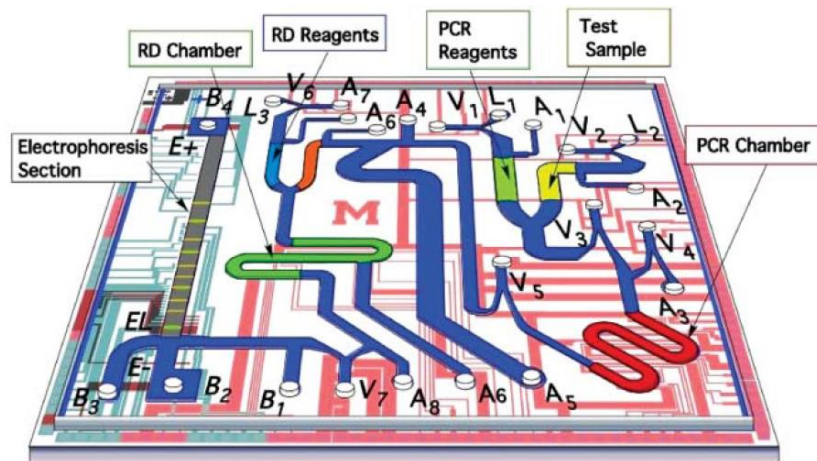
Técnicas como la PCR no han sido suficientemente extendidas a hospitales o centros de salud debido a que requieren infraestructura y equipos costosos y especializados (e.g. termocicladores, lectores ópticos, etc.), técnicos de laboratorio [9] y reactivos en refrigeración; es por ello que en los últimos años se ha buscado el desarrollo de plataformas y dispositivos integrados que permitan llevar a cabo la detección de patógenos de manera rápida y sencilla empleando las técnicas de biología molecular de un laboratorio tradicional.

### 2.1. PCR en dispositivos microfluídicos

En el año 2005, R. Pal, *et al.* desarrollaron un dispositivo microfluídico integrado para llevar a cabo un análisis de detección de las cepas virales de influenza A/LA/1/87 y A/Sydney/5/97 por medio de la técnica PCR-RFLP (i.e. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), una variante de la PCR tradicional donde se reconoce el polimorfismo en la región de codificación mediante endonucleasas de restricción, en este caso, de la proteína hemaglutinina, la cual está presente en el virus de la influenza. El dispositivo hace uso de válvulas direccionadas electrónicamente, cámaras de reacción aisladas térmicamente, calentadores y sensores de temperatura, así como del movimiento de gota pulsada por medio de presión, para llevar a cabo dos reacciones independientes en serie (i.e. amplificación por PCR y digestión restrictiva) seguidas de una separación por electroforesis del fragmento de ADN de 690 bp de la región codificante del gen HA1 ARN clonado y transcrito en una bacteria *E. coli* y usado como muestra [10].

En la **Figura 4** se presenta un esquema del dispositivo donde se destacan las cámaras de PCR y de digestión restrictiva, las entradas para los

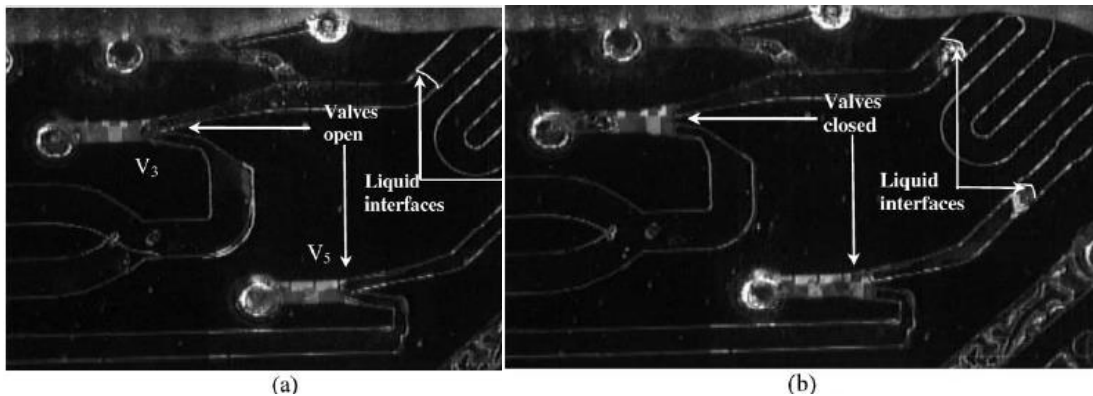
correspondientes reactivos y de la muestra a analizarse, así como de la sección de electroforesis. Las dimensiones totales del dispositivo son de 1.5 cm x 1.6 cm, con canales de entre 200 y 600  $\mu\text{m}$  de ancho y 50  $\mu\text{m}$  de profundidad; está fabricado en un sustrato de vidrio sobre otro de silicio con conexiones eléctricas a una tarjeta electrónica impresa (PCB, por sus siglas en inglés), desde donde se activan componentes como las válvulas y los calentadores. Si bien la fabricación del PCB se puede llevar a cabo en masa, el resto de los sustratos requiere del uso de la técnica de fotolitografía, lo que aumenta el costo y tiempo de producción del dispositivo completo.



**Figura 4.** Representación esquemática de dispositivo microfluídico integrado para análisis genéticos. Tomada de [10].

En la **Figura 5** se muestra uno de los tipos de válvulas implementadas en este dispositivo. El sellado hermético activo de los canales, requerido durante la PCR, utiliza microválvulas de cambio de fase electrónicamente direccionables hechas de una mezcla de ceras industriales, las cuales funcionan como un pistón que es móvil en la fase fundida pero que forma un sello fuerte en el estado sólido. El cambio de fase reversible se consigue mediante calentadores resistivos subyacentes y el movimiento del pistón fundido se logra mediante presión neumática o vacío [10], de modo que es posible abrir o cerrar las válvulas una vez cargada la cera en los compartimientos de las válvulas correspondientes (i.e.  $V_3$  y  $V_5$ ) y ya que la

mezcla de reacción (muestra de prueba y reactivos para PCR) se ubique dentro de la cámara de PCR. Si bien estas válvulas son capaces de soportar presiones de hasta 250 psi sin fugas, su utilización es poco práctica y requiere del uso de ceras hechas de materiales que son poco comunes. Dado que elementos como las válvulas son componentes esenciales en muchos sistemas microfluídicos porque permiten controlar y/o regular el flujo a través de los microcanales, las complejidades que puedan surgir en su proceso de fabricación debido al uso de dos o más materiales para construirlas [11] disminuyen la automatización de los ensayos biológicos que se lleven a cabo.

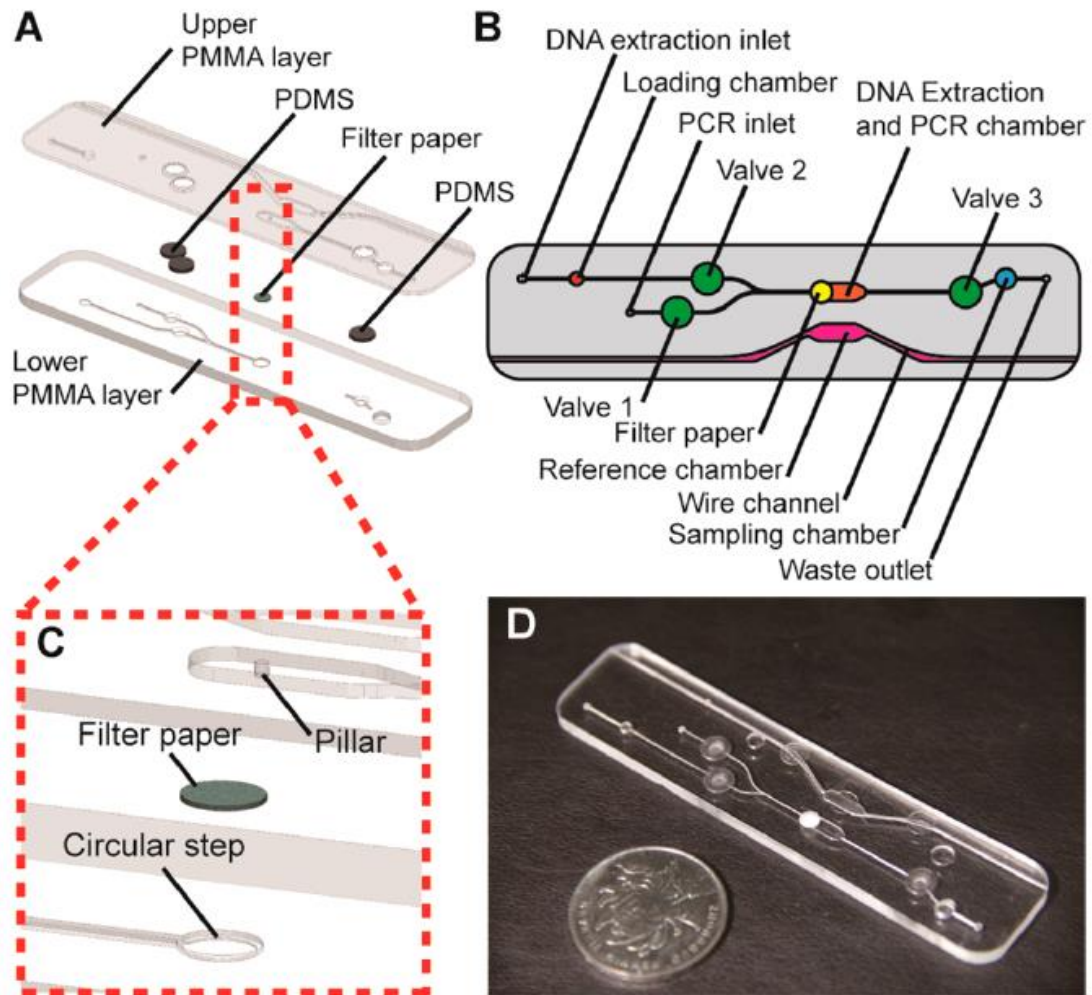


**Figura 5.** Sellado hermético con válvulas en la cámara de PCR. a) Válvulas abiertas. b) Válvulas cerradas. Se puede apreciar el desplazamiento del líquido en el canal debido a la presión ejercida por las válvulas. Tomada de [10].

Continuando con la tendencia a desarrollar microsistemas para análisis genéticos totalmente automatizados y con materiales económicos, en el año 2014 B. Zhuang, *et al.* fabricaron un microdispositivo de acrílico desechable para extracción y amplificación de ADN de muestras de sangre humana para ensayos genéticos de sordera hereditaria mediante la técnica de ASPCR (i.e. Reacción en cadena de la polimerasa con alelos específicos), la cual es otra variante de la PCR, comúnmente utilizada para detectar mutaciones [12] en los alelos de un gen. En este estudio se deseaba detectar las mutaciones más comunes del gen de la conexina 26 (GJB2) para sordera no sindrómica.

Una de las dificultades de este trabajo provenía del proceso de preparación de la muestra, puesto que para ello se requería llevar a cabo un lisado celular, seguido de la extracción de ácidos nucleicos, la purificación de las muestras y la elución del ADN/ARN, así como la carga de los reactivos para PCR (e.g. 'primers', PCR Master Mix, etc.) y su consiguiente amplificación. Para resolverla, basaron el funcionamiento de su dispositivo en microválvulas externamente accionadas y en un flujo de una sola dirección. Además, usando un filtro de papel localizado en un cámara de extracción fueron capaces de aislar el ADN de una muestra de sangre y llevar a cabo la amplificación por PCR en el mismo lugar sin necesidad de eluir la muestra [12].

En la **Figura 6** se muestra el esquema del dispositivo microfluídico desechable para preparación de la muestra biológica y amplificación por PCR. En A y C se esquematizan las dos placas que componen el microdispositivo, así como el filtro de papel y las membranas que conforman las válvulas. En B se observa una vista inferior de las entradas del dispositivo, tanto para los reactivos necesarios para extraer y preparar la muestra de ADN (i.e. NaOH para el lisado celular, HCl para la neutralización de los ácidos nucleicos, y agua DI para lavar), como para los reactivos para PCR. También se muestran las 3 cámaras que lo conforman: 1) carga de la muestra de sangre, 2) reacción de PCR (una vez la muestra aislada mediante la activación de las válvulas 2 y 3) para un volumen de 15  $\mu\text{L}$ , y 3) 'sampling' de la muestra una vez que ha sido amplificada para su posterior análisis. Finalmente, en D se muestran las dimensiones reales del dispositivo, las cuales son de 88 mm x 20 mm.



**Figura 6.** Dispositivo microfluídico de plástico para preparación y amplificación de ADN. A) C) Vista interna del dispositivo y sus estructuras. B) Vista inferior esquematizada de las entradas y cámaras del dispositivo. D) Fotografía del dispositivo. Tomada de [12].

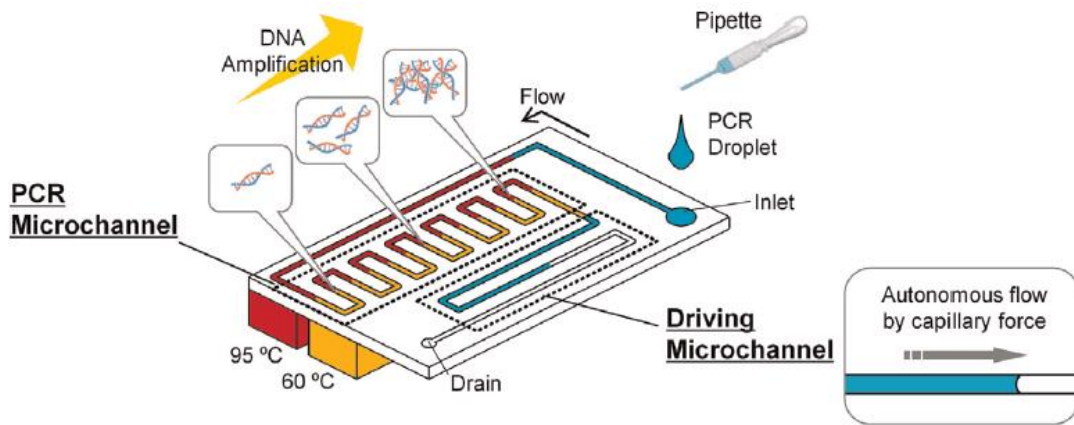
Si bien el dispositivo microfluídico anterior es capaz de operar de manera automatizada únicamente por medio de un programa de LabView que realiza el total de las operaciones de carga de reactivos para la preparación de la muestra y su amplificación por PCR [12], el sistema en su totalidad se vuelve más voluminoso al incluir varios calentadores, abanicos y bombas de jeringa para introducir los diferentes reactivos (no mostrado). Además, la muestra de sangre a analizarse debe ser colocada manualmente con una micropipeta a través de la cámara de carga y, posteriormente, debe retirarse de la misma manera por la cámara de 'sampling' una vez amplificada, por lo que la

automatización del sistema se limita únicamente al empleo de la técnica y no incluye el análisis de los resultados generados. El hecho de que la muestra sea analizada externamente mediante electroforesis implica que el sistema no sea capaz de cuantificar en tiempo real la eficiencia de la reacción.

En el año 2015 H. Tachibana, *et al.* implementaron un dispositivo microfluídico de dos capas fabricado totalmente en un polímero de ciclo-olefina (COP) para detectar patógenos, el cual era, además, autónomo y desechable. Los autores hicieron uso de otra técnica variante de la reacción en cadena de la polimerasa conocida como CF-SP-PCR (i.e. PCR de flujo continuo autopropulsado), en la cual sólo hay un microcanal en forma de serpentín cuya superficie es oxidada para formar una capa hidrofílica, de modo que una gota de solución colocada en su entrada se transporta a través este sólo por capilaridad y sin necesidad de bombas que la desplacen [13]. Para este estudio se colocó una gota de 50  $\mu$ l de una muestra preparada externamente con los reactivos necesarios para PCR, así como con ADN genómico de humano, *E. coli* y *E. coli* patogénica O157, por separado (**Figura 7**).

La técnica PCR de flujo continuo permite llevar a cabo una amplificación de secuencias de ADN a alta velocidad dado que la gota de solución de PCR, al desplazarse autopropulsadamente, cambia rápidamente de temperatura en comparación con los termocicladores comerciales. Lo anterior, debido a que hay un par de bloques de aluminio con temperaturas fijas de 99 °C y 60 °C, cada uno, por debajo del dispositivo (**Figura 7**), los cuales determinan dos zonas de temperaturas en el mismo plano, siendo éstas las de desnaturalización y alineación/elongación, respectivamente. Con el método anterior, los autores redujeron a 18 minutos el tiempo que tarda en llevarse a cabo la PCR [13].

Finalmente, la integración del dispositivo con un sistema de detección por fluorescencia compuesto por un láser y un tubo fotomultiplicador permitió analizar el producto amplificado dentro del chip (no mostrado).



**Figura 7.** Diseño esquematizado del dispositivo microfluídico para SP-CF-PCR. Se describe el funcionamiento del mismo a partir de la incorporación de una gota y su desplazamiento por capilaridad a través de regiones que se encuentran a las temperaturas propias de las diferentes fases de la técnica de PCR. Tomada de [13].

Resulta realmente ventajoso en cuanto a equipo e infraestructura el hacer uso de un dispositivo que no requiera bombas ni válvulas de ningún tipo para desplazar la muestra interés y que, a su vez, sólo requiera colocar la muestra de la gota a analizar para que lleve a cabo su función. Sin embargo, esta condición implica necesariamente que la mezcla para PCR tenga que ser preparada de manera externa al dispositivo, por lo que el factor de error humano estará siempre presente en los ensayos realizados y los resultados obtenidos. Por otro lado, si bien el dispositivo está hecho de un solo polímero, su fabricación fue mediante moldeo por inyección [13], de modo que requirió igualmente de la fabricación de moldes por fotolitografía con el equipo tecnológico correspondiente, aumentando los costos y tiempo de fabricación.

Cabe recordar que la importancia de estos trabajos, al igual que el realizado por K. S. Park, *et al.* en el año 2016, radica en la necesidad de desarrollar plataformas capaces de llevar a cabo ensayos de detección de ácidos

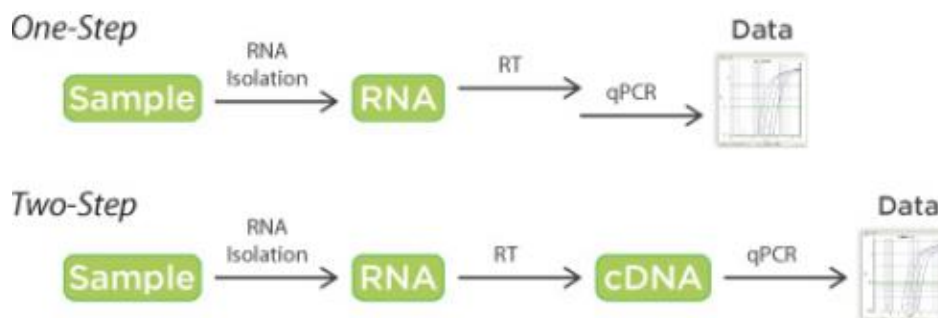
nucleicos (e.g. PCR) al nivel del paciente, ya sea en consultorios médicos o en clínicas hospitalarias, para un control efectivo de las enfermedades asociadas al cuidado de la salud (HAIs, por sus siglas en inglés) [9]. En este último trabajo, los autores desarrollaron un sistema de diagnóstico de anisotropía de polarización (PAD, por sus siglas en inglés), capaz de medir los cambios en la anisotropía de fluorescencia de un DNA bacteriano diana por detección radiométrica (i.e. la medición no se ve afectada por la intensidad de fluorescencia y su ruido intrínseco) cuando la muestra es reconocida por las sondas de detección y amplificada por medio de PCR asimétrica de transcriptasa reversa (RT-PCR). Dicho sistema fue capaz de demostrar una sensibilidad de detección de hasta una bacteria única, con una precisión comparable a la del cultivo bacteriano y con un tiempo de respuesta de apenas 2 horas [9]. Este sistema estaba conformado por dos componentes independientes: 1) un dispositivo de acrílico desechable para la extracción del RNA de las bacterias, y 2) el lector para detección de anisotropía de fluorescencia. Sin embargo, todos los procesos térmicos, incluyendo la retrotranscripción del RNA extraído y la amplificación por PCR de las moléculas de cDNA resultantes, se llevaron a cabo de manera externa en termocicladores comerciales, de modo que la autonomía y versatilidad del sistema PAD resultó claramente limitada.

La revisión de los trabajos anteriores permite concluir que existe una amplia variedad en cuanto a las técnicas de PCR utilizadas, así como de las plataformas empleadas. Sin embargo, la tendencia parece marcar una necesidad de integración de sistemas de detección más [9][12][13][14] o menos [15][16][17] sofisticados con dispositivos capaces de llevar a cabo la preparación y/o análisis de las muestras de interés [10][12][15][18][19][20], siendo tanto muestras de control como muestras problema.



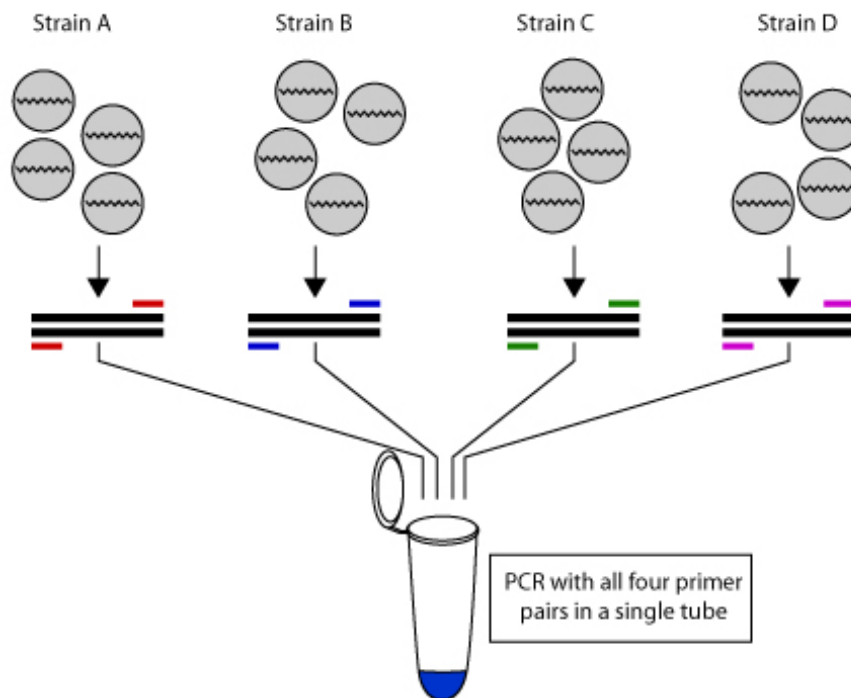
## 2.2. Antecedentes

Más adelante se detallará el protocolo con que las muestras utilizadas a lo largo de este trabajo fueron preparadas, sin embargo, es necesario mencionar que la técnica de PCR puede iniciarse a partir de diferentes moléculas de ácidos nucleicos, en particular, a partir de RNA o DNA. El primer caso conlleva cierta variabilidad intrínseca debido a que la información contenida en el RNA depende de la fisiología o patología del contexto; lo contrario sucede para el segundo caso, puesto que el DNA generalmente contiene las mismas mutaciones o polimorfismos en cada célula normal [21]. Si a la variabilidad propia del RNA se le suman las limitaciones de sensibilidad [22], técnicas e inherentes de los ensayos de PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) de un solo paso (e.g. alta inestabilidad del RNA debido la presencia de enzimas que catalizan su hidrólisis, i.e. RNasas, en la naturaleza), entonces los resultados pueden ser poco precisos y sin relevancia biológica [21]. Al llevar a cabo ensayos de RT-PCR de dos pasos y, por tanto, hacer uso del cDNA como molécula precursora para llevar a cabo las reacciones de PCR se garantiza una alta sensibilidad, una eficiencia potencialmente mayor y la oportunidad de almacenar las muestras de cDNA a manera de 'stock' [22] para llevar a cabo futuros experimentos. En la **Figura 8** se esquematizan los dos procesos anteriores, así como los ácidos nucleicos generados y/o utilizados en cada uno de ellos; en el caso de un solo paso, el RNA se convierte a cDNA, pero este es utilizado inmediatamente para la cuantificación por PCR en tiempo real [23], por lo que no hay manera de almacenar cDNA para ensayos posteriores.



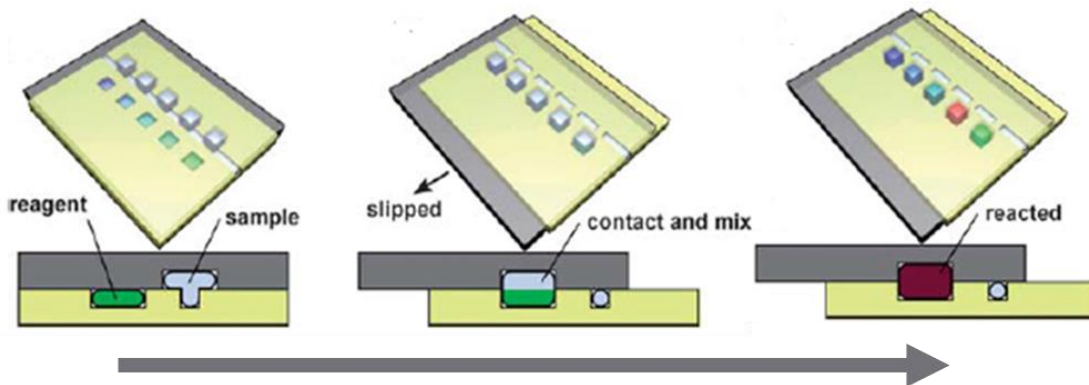
**Figura 8.** Comparativa de los flujos de trabajo en cuanto a la preparación de las muestras a utilizarse en los protocolos de RT-qPCR de uno o dos pasos. Tomada de [23].

Por otro lado, también es necesario mencionar que existen más técnicas para llevar a cabo la detección de DNA, algunas de ellas basadas en la amplificación a una misma temperatura de la muestra de interés [16][24][25], proceso contrario a los ciclos térmicos característicos de la PCR. N. M. Rodriguez, *et al.* desarrollaron un dispositivo de diagnóstico molecular fabricado en papel para llevar a cabo la extracción del virus subtipo 16 de papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés), una amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés), y la detección por flujo lateral directamente de muestras cervicales de pacientes [24]; el dispositivo era capaz de solventar algunas necesidades técnicas de la PCR (e.g. uso de termocicladores) y dar resultados en apenas una hora. Sin embargo, pese a su rapidez y efectividad, el principal inconveniente de la técnica LAMP radica en la dificultad para diseñar sus ‘primers’, dado que son necesarios de cuatro a seis por ensayo. Con lo que se requiere un estudio más detallado y minucioso de la secuencia del gen de interés [26] para que dichos cebadores sean altamente específicos.



**Figura 9.** Un tipo de PCR múltiple consiste en colocar de manera conjunta múltiples templados de DNA, así como los ‘sets’ de ‘primers’ necesarios para detectar los diferentes genes de interés. Tomada de [27].

Una variante de la técnica de PCR usada en este trabajo es la PCR múltiple, en la cual diferentes secuencias de DNA son amplificadas de manera simultánea. De manera convencional (e.g. mediante el uso de termocicladores comerciales) una manera de llevarla a cabo consiste en colocar múltiples cebadores y secuencias de DNA en un mismo compartimiento (**Figura 9**), lo cual resulta limitado debido a las desiguales tasas de amplificación de las secuencias de DNA objetivo, así como la interferencia mutua entre ‘primers’ [27] y el número limitado de fluoróforos para realizar la detección. Sin embargo, la capacidad de reducción de muestras y reactivos que caracteriza a la microfluídica [5] permite, a su vez, llevar a cabo una miniaturización de los comportamientos para realizar ensayos, de modo que es posible colocar un par de cebadores por plantilla de DNA por compartimiento con un volumen de muestra pequeño [15], lo cual se esquematiza en la **Figura 10**.

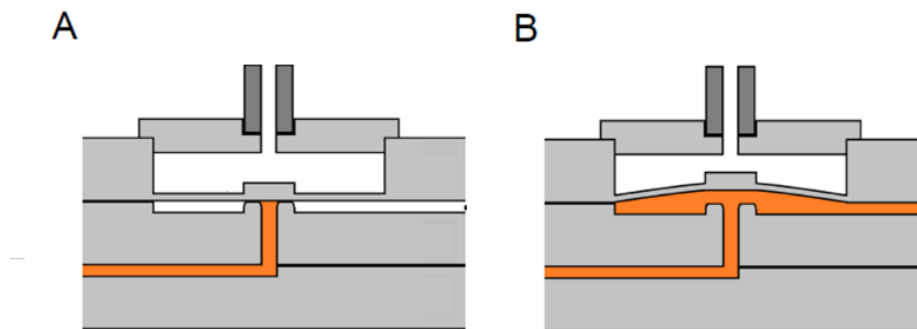


**Figura 10.** Esquema de PCR múltiple llevado a cabo por un dispositivo microfluídico conocido como SlipChip, en el cual se colocan los reactivos necesarios para llevar a cabo ensayos de PCR de manera independiente (e.g. ‘primers’ para diferentes secuencias de interés), y posteriormente es posible mezclar cada ‘set’ de reactivos con una misma muestra de interés en apenas un paso. Adaptada de [15].

La validez de esta técnica quedó demostrada, entre otros, por F. Shen, *et al.* en el año 2010, quienes diseñaron una plataforma conocida como SlipChip, en la cual fueron capaces de llevar a cabo la PCR múltiple en hasta 348 pozos con 20 diferentes pares de ‘primers’ para identificar 16 especies de bacterias y hongos comúnmente presentes en infecciones de la sangre, lo anterior, con una muestra de apenas 10  $\mu$ L [15].

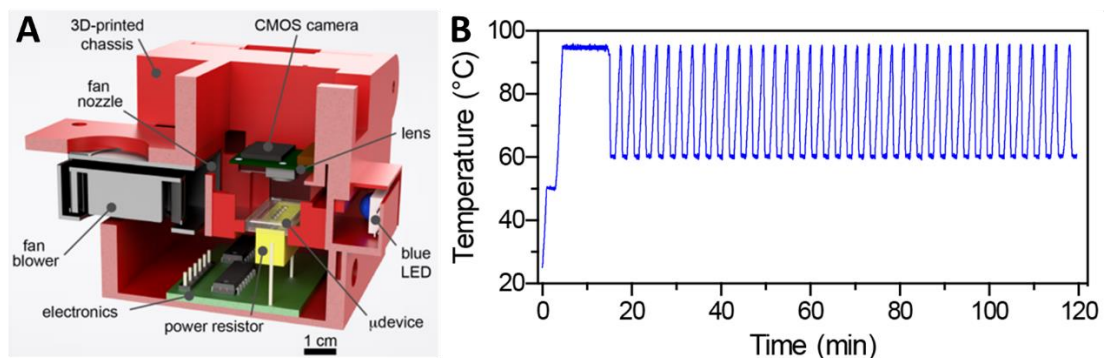
Ahora bien, en cuanto a las características de los dispositivos microfluídicos capaces de llevar a cabo este tipo de ensayos bioquímicos, anteriormente se mencionó la importancia que tienen algunos elementos estructurales como las válvulas para controlar el flujo de una muestra de interés biológico hacia una dirección deseada. También se destacó el uso del PMMA como material base para la fabricación de microdispositivos debido a su buena biocompatibilidad, lo que le permite ser una opción viable para llevar a cabo ensayos de PCR [8]. Por otro lado, se explicó que el uso de dos o más materiales en la integración de elementos de control (e.g. válvulas) representa una desventaja en cuanto a la cantidad de pasos necesarios para incorporarlos y, por tanto, al aumento del tiempo total de fabricación del dispositivo; esto último es, sin embargo, una práctica común [10][12][19][20].

La problemática anterior sirvió como motivación para que Guevara-Pantoja, *et al.* fabricaran un dispositivo monolítico de acrílico para aplicaciones de válvulas y bombas. El principio de funcionamiento del microdispositivo se basó en el uso de membranas delgadas ( $\approx 100 \mu\text{m}$ ), las cuales, pese a estar hechas de acrílico (un polímero tradicionalmente rígido), eran igualmente flexibles debido al tamaño de su diámetro (3 mm) y podían ser actuadas mediante presión neumática o vacío [28]. La **Figura 11** muestra un corte transversal de una de las válvulas de dicho dispositivo, se aprecia la flexión principalmente central que la válvula presenta al aplicarse vacío desde el canal superior.



**Figura 11.** Esquema de un corte transversal de una válvula de acrílico abierta y cerrada en un dispositivo microfluídico de tres capas. A) Válvula cerrada al aplicar presión. B) Válvula abierta al aplicar vacío. Tomada de [28].

Finalmente, la ya mencionada importancia de desarrollar sistemas de detección integrados con dispositivos microfluídicos incentivó a Mendoza-Gallegos, *et al.*, a iniciar el desarrollo un microlaboratorio para la detección de DNA mediante la técnica de qPCR. Su trabajo consistió en la fabricación de un termociclador portable hecho con impresión 3D y electrónica de bajo costo, en el cual fue posible programar los ciclos térmicos de una reacción de PCR mediante una computadora integrada (i.e. Raspberry Pi) y ejecutarlos mediante el uso de una resistencia de potencia recubierta con cobre y de un ventilador de computadora [17]. Al excitar una muestra de cDNA con un 23.5lm LED azul durante cada ciclo de la PCR se lograron detectar, por medio de una cámara CMOS incorporada, los cambios en tiempo real de la fluorescencia emitida debido al aumento de la concentración del gen de control endógeno 18S rRNA presente en dicha muestra. En la **Figura 12A** se muestra un corte transversal y esquemático de los componentes físicos y electrónicos del termociclador, mientras que en la **Figura 12B** se muestra el perfil de temperatura ejecutado por el termociclador para un protocolo de 40 ciclos de PCR y desplegado en una interfaz gráfica igualmente incluida en el sistema.



**Figura 12.** A) El termociclador está hecho con componentes básicos de electrónica, un ventilador de computadora, un LED Azul, una cámara CMOS y una estructura fabricada con impresión 3D en ácido poliláctico (PLA, por sus siglas en inglés). B) El protocolo de temperatura inicia con una fase de desnaturalización inicial compuesta de 2 minutos a 50 °C seguida de 10 minutos a 95 °C, posteriormente se realizan 40 ciclos típicos de PCR con una fase de desnaturalización de 15 segundos a 95 °C y otra de hibridación/extensión de 1 minuto a 60 segundos. Tomada de [17].

Con base en los trabajos previamente descritos, y tratando de resolver los aspectos limitantes en cada uno de ellos, en este proyecto se propone diseñar y fabricar un dispositivo microfluídico integrado, semiautomatizado y hecho con base en polímeros para detectar la presencia del gen de control endógeno 18S rRNA contenido en una muestra de cDNA; lo anterior, mediante una serie de válvulas de paso basada en el trabajo de Guevara-Pantoja, *et al.* y llevando a cabo la técnica de PCR múltiple en el termociclador desarrollado por Mendoza-Gallegos, *et al.*, con el cual será posible monitorear en tiempo real los cambios en fluorescencia de las muestras de interés gracias al sistema óptico que posee integrado.

### **3. HIPÓTESIS**

El desarrollo de un sistema integrado y semiautomatizado capaz de realizar la técnica de PCR en tiempo real permitirá detectar la presencia del gen de control endógeno 18S rRNA en una muestra de cDNA.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Diseñar y fabricar un dispositivo microfluídico integrado con válvulas para la detección de DNA por medio de la técnica de qPCR y haciendo uso de un termociclador acoplado capaz de medir los cambios en fluorescencia de las muestras amplificadas.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Fabricar y caracterizar un dispositivo microfluídico con válvulas para llevar a cabo la técnica de qPCR en múltiples pozos de manera simultánea.
- Detectar la presencia del gen de control 18S rRNA en una muestra biológica como prueba de concepto.
- Desarrollar un sistema integrado por el dispositivo microfluídico y un termociclador portable.
- Comparar el límite de detección y eficiencia del ensayo de qPCR en el sistema integrado con experimentos similares realizados en un termociclador comercial.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se detalla la metodología necesaria para llevar a cabo los objetivos previamente mencionados y corroborar la hipótesis propuesta, incluyendo la descripción de los experimentos realizados.

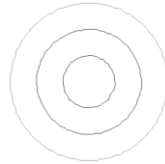
En primer lugar, se explica el diseño de dos diferentes dispositivos microfluídicos, uno con válvulas de acrílico y otro con válvulas de PDMS; posteriormente, se detalla su correspondiente proceso de fabricación, incluyendo el de membranas de PDMS usadas en el segundo dispositivo. También se describe el diseño y fabricación de un dispositivo únicamente de pozos, con el cual finalmente se llevaron a cabo los ensayos de qPCR, como se explicará más adelante. Por otro lado, se menciona el protocolo utilizado para la extracción de RNA y síntesis de cDNA a partir de una muestra eucariota, la cual contiene el gen de control endógeno 18S ribosomal. Finalmente, se describen los experimentos de qPCR llevados a cabo tanto en un termociclador comercial como en el sistema integrado por el termociclador portable y el microdispositivo (protocolo térmico y total de reactivos utilizados). Adicionalmente, pruebas de caracterización de intensidad de fluorescencia del sistema integrado fueron realizadas previo a los ensayos de qPCR.

### 5.1. Diseño de dispositivos microfluídicos

En general, se diseñaron tres diferentes dispositivos microfluídicos, dos de ellos con válvulas y uno únicamente con pozos, similar al reportado por Mendoza-Gallegos, *et al.* [17]. Todos los diseños se realizaron mediante el software Dr. Engrave (Roland DG, Versión 2.70.0), el cual es comúnmente utilizado para grabados en placas de diferentes materiales, es decir, es posible fabricar una estructura a partir de un patrón de grabado que delimite su forma. Como ejemplo, en la **Figura 13** se muestra un círculo dibujado en el software con diámetro igual a 1.5 mm y relleno de 0.25 mm, este último representa la distancia entre las circunferencias concéntricas de su interior. Una broca milimétrica con punta de diámetro igual al doble del parámetro de relleno



será capaz de maquinar el círculo del mismo tamaño con que fue diseñado, mientras que su profundidad máxima dependerá del grosor de la placa sobre la que se desee maquinar, así como de las características de la broca.

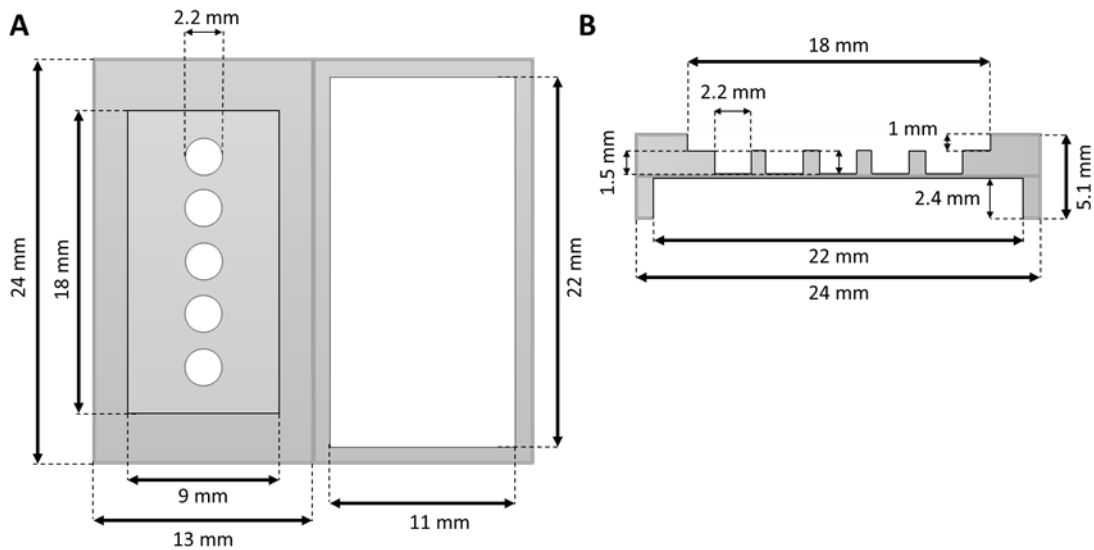


**Figura 13.** Círculo representativo dibujado en el software Dr. Engrave.

En general, cada microdispositivo con válvulas cuenta con capas de control, de válvulas y de flujo. Mientras que el dispositivo de pozos posee únicamente una capa maquinada por ambos lados. A continuación, se presentan los esquemas de las capas de cada dispositivo y sus correspondientes dimensiones; se enfatizan, particularmente, los diseños de las válvulas implementadas en este trabajo.

#### **5.1.1. Dispositivo de pozos**

Se diseñó un chip de pozos en el software Dr. Engrave con dimensiones totales de 13 mm (ancho) x 24 mm (largo), compuesto de una capa maquinada tanto por su lado superior como inferior. En el lado superior se encuentran cinco pozos de 2.2 mm de diámetro dentro de una piscina en el centro del dispositivo de 9 mm (ancho) x 18 mm (largo). En el lado inferior hay un rectángulo para ajustar el dispositivo al calentador con dimensiones de 11 mm (ancho) por 22 mm (largo), las cuales corresponden a las medidas de la resistencia de potencia (calentador) del termociclador portable.

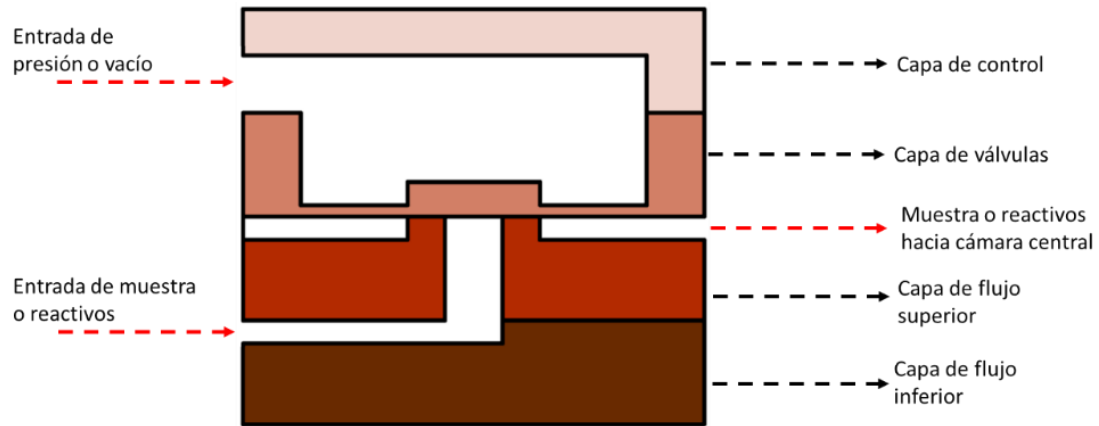


**Figura 14.** Esquema de dispositivo de pozos. A) Vista superior e inferior. B) Vista transversal.

### 5.1.2. Dispositivo con válvulas de acrílico

El microdispositivo de válvulas de acrílico se compone de cuatro capas: 1) capa de control por presión y vacío, 2) capa de membranas de válvulas, 3) capa de flujo superior, y 4) capa de flujo inferior. Sus dimensiones totales son de 14.5 mm (ancho) x 29 mm (largo).

Para facilitar el entendimiento de la estructura tridimensional de este dispositivo, así como la del funcionamiento de este diseño de válvulas, en la **Figura 15** se muestra un corte transversal de la sección de válvulas, el cual es similar al reportado por Guevara-Pantoja, *et al.* [28]. La activación de las válvulas se produce al aplicar presión por la entrada correspondiente, cerrándolas y evitando el flujo de muestras y/o reactivos hacia el pozo central correspondiente. Por otro lado, al aplicar vacío la membrana de acrílico se desplaza hacia arriba, abriendo la válvula y permitiendo el flujo de muestra o reactivos hacia la cámara de reacción.



**Figura 15.** Corte transversal de válvula de acrílico. Se esquematiza la superposición de las capas individuales, así como la dirección seguida por el flujo de muestra o reactivos (línea roja).

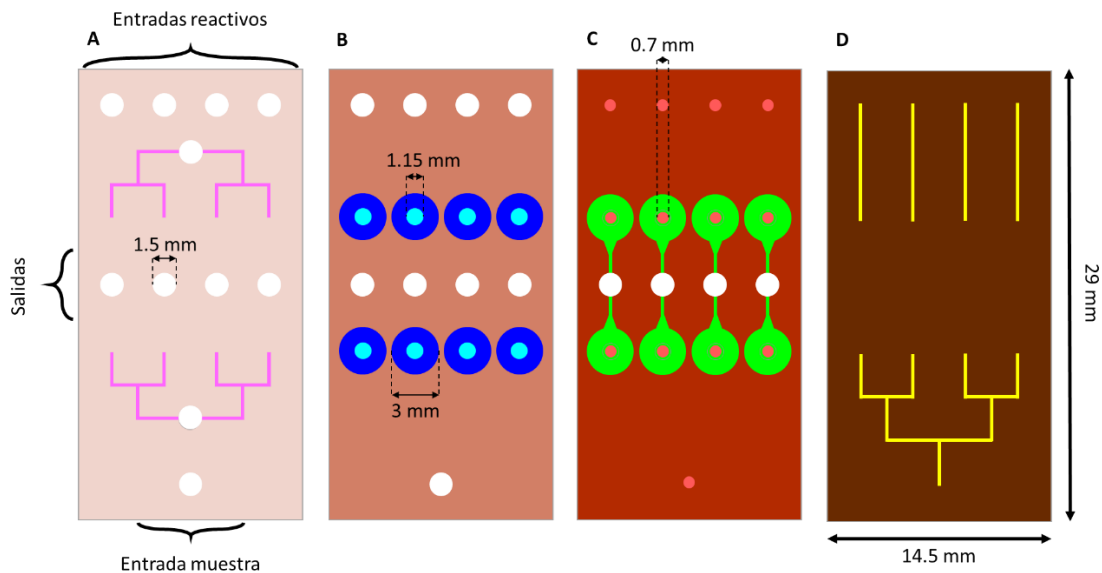
El diseño cuenta con una entrada única para la muestra biológica a analizar (lado inferior, **Figura 16**), así como con cuatro entradas independientes para reactivos de PCR (lado superior, **Figura 16**), lo que genera la posibilidad de llevar a cabo un ensayo PCR múltiple si se utilizan los reactivos para detectar hasta cuatro secuencias de DNA de interés diferentes. La salida común del dispositivo se encuentra en los cuatro pozos centrales paralelos, los cuales se encuentran abiertos y funcionan, además, como cámaras para llevar a cabo la reacción de PCR una vez ahí mezclada la muestra con los reactivos. Tanto las entradas como los pozos centrales tienen un diámetro de 1.5 mm.

En la capa de control (**Figura 16A**) se encuentran dos árboles de canales idénticos en espejo (rosa), los cuales comunican cada una de las series de válvulas de paso con una única entrada de presión/vacío independiente; también está la parte superior de los pozos (salida común) y las entradas para muestra y reactivos (blanco) en cada respectivo lado de la capa.

En la capa de membranas (**Figura 16B**) están los diafragmas de las válvulas de paso (azul), cuyo diámetro es de 3 mm; también se encuentra un refuerzo central (cyan) de 1.15 mm de diámetro, el cual ayuda a evitar la deformación de la membrana justo donde se producirá la apertura y el cierre de la válvula.

En la capa de flujo superior (**Figura 16C**) está el fondo de los pozos centrales (blanco) y los canales (verde) que tienen tanto la función de incorporar los reactivos y la muestra de interés desde la capa de flujo inferior hasta las cámaras de reacción, como la de actuar como base para el cierre de las válvulas de paso; finalmente, se encuentran las entradas hacia y desde la capa de flujo inferior (rojo), las cuales poseen un diámetro de 0.7 mm.

Por último, en la capa de flujo inferior (**Figura 16D**) únicamente se encuentran los canales que conducen la muestra y reactivos de PCR por un único árbol de canales y por canales individuales, respectivamente (amarillo). Cabe aclarar que todas las entradas provienen desde la capa de control y, con excepción de las de presión/vacío, se extienden hasta esta capa de flujo.



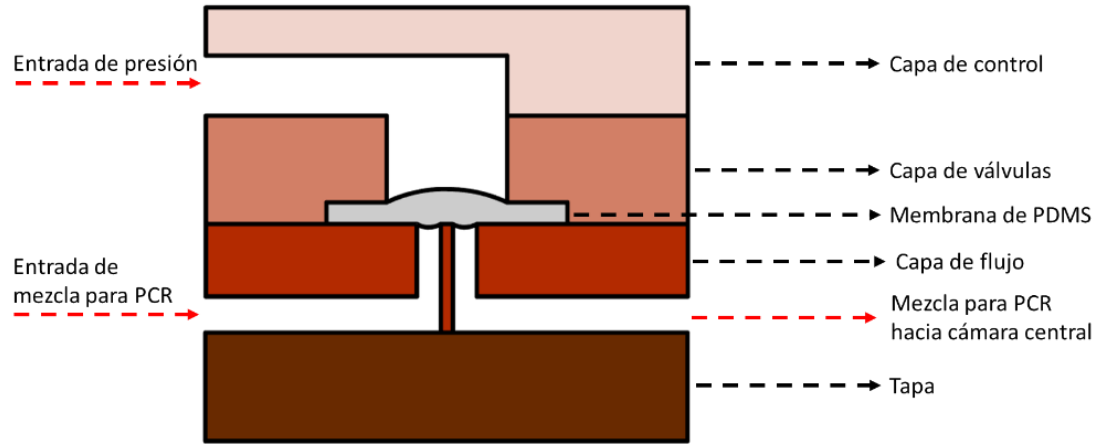
**Figura 16.** Esquemas de capas individuales de dispositivo con válvulas de acrílico. A) Capa de control. B) Capa de membranas de válvulas. C) Capa de flujo superior. D) Capa de flujo inferior.

### 5.1.3. Dispositivo con válvulas de PDMS

Se diseñaron dos versiones del dispositivo con válvulas de PDMS, una versión completa y basada en el mismo principio de funcionamiento que el dispositivo con válvulas de acrílico, y una versión simplificada en la que se

redefinió la entrada y salida del dispositivo, además de que se redujo el número de cámaras/pozos centrales y de válvulas. Ambos casos se componen de tres capas: 1) capa de control por presión, 2) capa de válvulas, y 3) capa de flujo; además, se incluye una tapa inferior que permite conducir el flujo a través de los canales de la capa inmediatamente superior. Las dimensiones totales también son iguales: 14 mm (ancho) x 28 mm (largo). La válvula diseñada fue exactamente la misma para las dos versiones.

La estructura tridimensional de las válvulas de PDMS para ambas versiones de este dispositivo se esquematiza en la vista transversal de la **Figura 17**. La activación de las válvulas nuevamente se produce al aplicar presión por la entrada correspondiente, cerrándolas y evitando el flujo de la mezcla para PCR (i.e. muestra de interés y reactivos) a la cámara central correspondiente. Sin embargo, si se introduce la mezcla para PCR a una presión constante al dispositivo, esta desplazará a la membrana de PDMS cuando dicha presión sea mayor a la de activación de las válvulas, o en su defecto, cuando ninguna presión de control sea aplicada. Cabe mencionar que las capas de control, de válvulas y de flujo se esquematizan de manera invertida a los diseños mostrados en las **Figuras 18 y 19**, ya que así llevan a cabo su correcta función. La membrana de PDMS se muestra deformada debido a que la profundidad de su asiento es menor al grosor de la primera, favoreciendo su adhesión al dispositivo, lo que se explicará con mayor detalle en la siguiente sección.



**Figura 17.** Corte transversal de válvula de PDMS. Se esquematiza la superposición de las capas individuales previamente descritas, así como la dirección seguida por el flujo de muestra o reactivos (línea roja).

La versión completa consta nuevamente de una entrada única para la muestra de interés (lado inferior, **Figura 18**), y de cuatro entradas independientes para reactivos de PCR (lado superior, **Figura 18**). La salida común del dispositivo sigue siendo en los cuatro pozos centrales paralelos. Se aumentó ligeramente el diámetro de las entradas tanto de control como de muestra y reactivos a un diámetro de 1.52 mm, lo que facilita la futura colocación de mangueras.

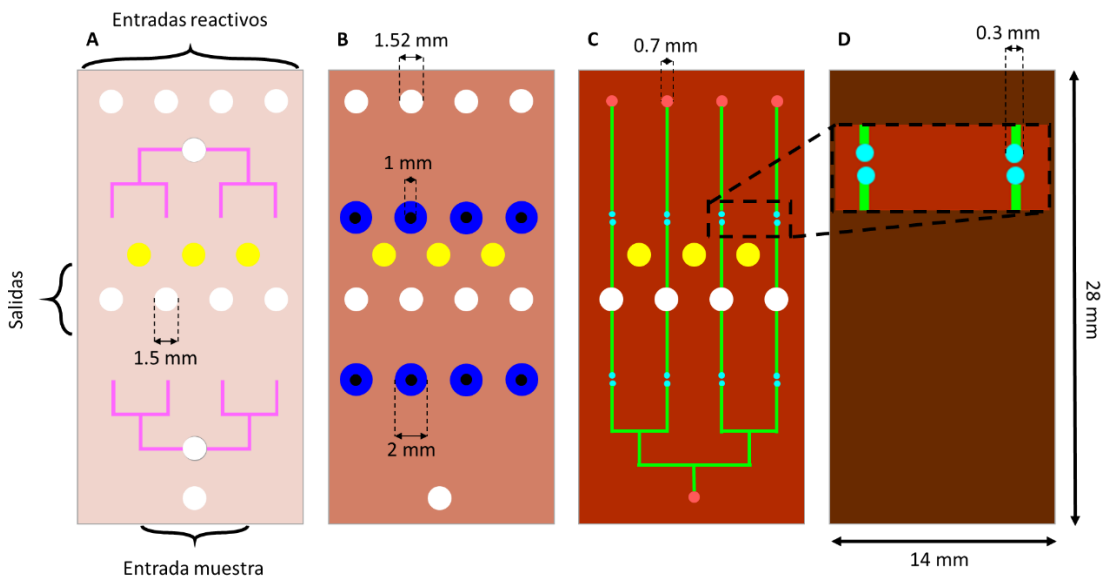
La capa de control (**Figura 18A**) es idéntica a la correspondiente del dispositivo con válvulas de acrílico (**Figura 16A**); únicamente se encuentran tres contenedores adicionales (amarillo) de 1.5 mm de diámetro que son utilizados para colocar un sensor de temperatura.

En la capa de válvulas (**Figura 18B**) se encuentra una serie de cuatro asientos de 2 mm de diámetro (azul) a cada lado del pozo/cámara central, ambas sirven para colocar membranas externas de PDMS que reemplazan a las membranas de acrílico en su función de válvulas. Más adelante se explica el proceso de fabricación de dichas membranas de PDMS. Los pozos

concéntricos a los asientos (negro) miden 1 mm de diámetro y permiten conducir la presión desde la capa de control hasta la válvula para activarla.

En la capa de flujo (**Figura 18C**) existen cuatro canales discontinuos (verde) que conducen la muestra y los reactivos por un lado y otro, respectivamente, hasta el pozo central correspondiente. La discontinuidad se observa en los dos micropozos intermedios de cada canal (cyan) a cada lado de la cámara central, los cuales tienen un diámetro de 0.3 mm y una separación entre sí de 0.1 mm. El flujo en esta discontinuidad se produce en sentido vertical cuando la válvula se encuentra desactivada, como se describe en la **Figura 17**. Por último, se encuentran las entradas a la capa (rojo) de 0.7 mm, y el fondo de los pozos.

Finalmente, la capa inferior (**Figura 18D**) sirve únicamente como tapa de los canales de flujo, dado que la capa inmediatamente superior (**Figura 18C**) es ensamblada de manera invertida en el dispositivo, como se observa en la **Figura 17**.



**Figura 18.** Esquemas de capas individuales de dispositivo con válvulas de PDMS en su versión completa. A) Capa de control. B) Capa de válvulas. C) Capa de flujo. D) Tapa inferior.

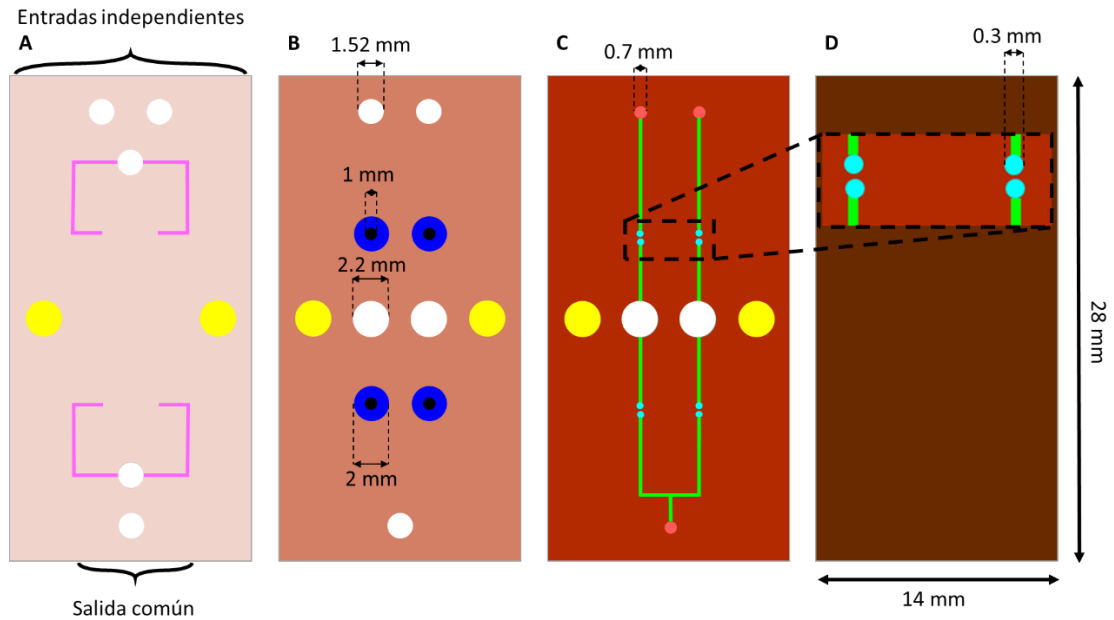
Al igual que en el dispositivo con válvulas de acrílico, las entradas de muestra y reactivos provienen desde la capa de control y se extienden a lo largo de todas las capas, así como también lo hacen las cámaras de reacción y los contenedores para el sensor de temperatura.

Por otro lado, en la **Figura 19** se muestra la versión simplificada del dispositivo con válvulas de PDMS. Como se mencionó anteriormente, en este diseño se redefinió el funcionamiento global, teniendo ahora dos entradas independientes (lado superior, **Figura 19**) y una salida común (lado inferior, **Figura 19**), de modo que los pozos centrales se encuentran sellados por la capa de control y el flujo a través de los canales sólo se produce cuando las válvulas de paso a ambos lados de la cámara se encuentran abiertas. Por lo tanto, las entradas son, este caso, para introducir una mezcla ya preparada con los reactivos para PCR y la muestra de cDNA de interés.

A diferencia de la versión completa, en este dispositivo los canales (rosa) de la capa de control (**Figura 19A**) fueron ligeramente rediseñados para conducir la presión a sólo dos válvulas de cada lado de las cámaras centrales (blanco), las cuales también fueron disminuidas de cuatro a dos. Sin embargo, el diámetro de estas últimas aumentó a 2.2 mm, similar al de los pozos del dispositivo de la **Figura 14**. Finalmente, las dos cámaras restantes se utilizaron como contenedores para el sensor de temperatura (amarillo), los cuales se extienden a lo largo de todo el dispositivo.

En esta versión simplificada las entradas de presión en la capa de control (**Figura 19A**) y las estructuras restantes en la capa de válvulas (**Figura 19B**) y de flujo (**Figura 19C**) son similares a las de la versión completa, con excepción de las diferencias ya mencionadas respecto a la menor cantidad de válvulas y cámaras.





**Figura 19.** Esquemas de capas individuales de dispositivo con válvulas de PDMS en su versión simplificada. A) Capa de control. B) Capa de válvulas. C) Capa de flujo. D) Tapa inferior.

## 5.2. Fabricación de dispositivos por micromaquinado

Todos los dispositivos microfluídicos fueron fabricados en acrílico, el cual es un polímero transparente cuyos contenidos pueden visualizarse bajo el microscopio o cualquier otro sistema óptico, por lo que es común emplearlo en aplicaciones de ingeniería y microfluídica [28][29]. Para maquinar cada uno de ellos se utilizaron brocas micrométricas y una máquina fresadora (MDX-40A, Roland DG, Alemania), la cual es capaz de fabricar estructuras de hasta aproximadamente 10 micras de resolución y cuyos parámetros de entrada son los siguientes: X/Y Speed (velocidad de la broca en los ejes X y Y), Spindle RPM (número de revoluciones por minuto para la broca), Z Speed (velocidad de la broca en el eje Z), Z Up Position (distancia recorrida hacia arriba en el eje Z al terminar un gravado), Z Down Position (profundidad máxima en el eje Z), Z Engraving Pitch (tamaño de paso en el eje Z), Infill (valor de relleno en el gravado o posición exacta para la broca).

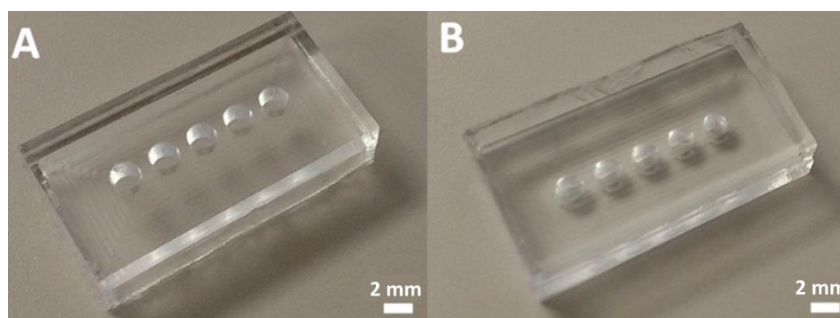
A continuación, se describen los parámetros específicos para maquinar cada dispositivo, así como los materiales utilizados en su fabricación. Además,

se explican los protocolos utilizados para fabricar las membranas de PDMS y para el ensamblado final de los dispositivos que poseen varias capas.

### 5.2.1. Dispositivo de pozos

El chip de pozos se fabricó por ambos lados en acrílico de 5.1 mm de grosor utilizando una broca de 1 mm Endmill (Kyocera, 1610-0394D117). Los parámetros comunes para ambos lados fueron los siguientes: X/Y Speed: 2 mm/s, Spindle RPM: 7000, Z Speed: 6 mm/s, Z Up Position: 0.5 mm, Z Engraving Pitch: 0.5 mm, Infill: 0.5. Para maquinarse ambos lados fue necesario voltear el acrílico sobre el que se trabajaba una vez maquinado uno de los dos lados, por lo que cada lado fue rebajado con un valor de Z Down Position de -2.55 mm. Los cinco pozos del lado superior se maquinaron con una profundidad de 1.5 mm, contenidos a su vez en una piscina de 1 mm de profundidad. En el lado inferior, el valor de Z Down Position del rectángulo para ajustar el dispositivo al calentador fue de -2.4 mm.

Para eliminar las rebabas en el interior de los pozos, el chip fue colocado sobre un portaobjetos dentro de una caja de Petri de vidrio (9 mm) con un 1 mL de cloroformo (288306, Sigma Aldrich), el arreglo se colocó a su vez dentro de otra caja de Petri (12 mm) llena de agua, la cual fue sellada para someter el dispositivo a una atmósfera de cloroformo gaseoso por 3 minutos. Una vez pasado el tiempo, el dispositivo se colocó en una plancha a 60 °C por 2 minutos para evaporar cualquier residuo de cloroformo [17]. La **Figura 20** muestra el dispositivo de pozos completamente fabricado.

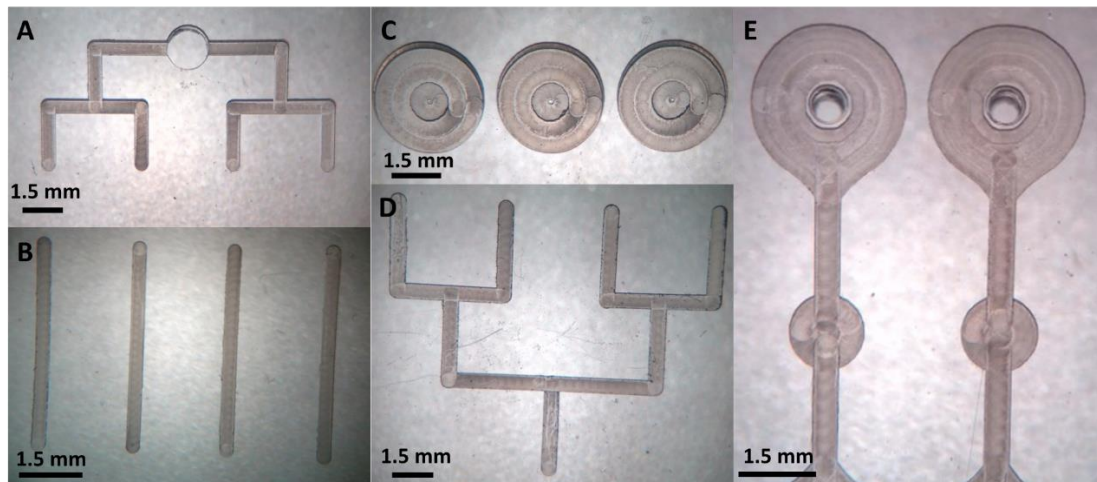


**Figura 20.** Dispositivo de pozos. A) Vista superior e B) inferior.

### 5.2.2. Dispositivo con válvulas de acrílico

Cada capa del dispositivo con válvulas de acrílico se fabricó en acrílico de 1.3 mm de grosor (ME303018, Good Fellow, USA) utilizando una broca de 0.020" (0.5 mm) Endmill (Kyocera, 1610-0200.060).

Los parámetros comunes de maquinado fueron los siguientes: X/Y Speed: 1 mm/s, Spindle RPM: 15000, Z Speed: 6 mm/s, Z Up Position: 0.5 mm, Z Engraving Pitch: 0.3 mm. El valor de Infill fue de 0.25 en las secciones correspondientes. Mientras que el parámetro de Z Down Position se determinó dependiendo de **(a)** la profundidad de los árboles de canales de control (-0.5 mm) y de las entradas de muestra, reactivos y presión/vacío así como de los pozos centrales (-1.30 mm) en la capa de control; **(b)** el grosor deseado para la membrana de las válvulas (-1.20 mm) y para el soporte adicional central de la misma (-1.0 mm) en la capa de válvulas; **(c)** la profundidad de los canales de flujo y base de las válvulas (-0.2 mm) y de las entradas hacia y desde la capa de flujo inferior (-1.30 mm) en la capa de flujo superior; y **(d)** la profundidad tanto del árbol de canales como de los canales individuales de flujo (-0.1 mm) en la capa de flujo inferior.



**Figura 21.** Estructuras del dispositivo con válvulas de acrílico. A) Árbol de canales de control. B) Canales individuales de flujo inferior. C) Membranas de acrílico. D) Árbol de canales de flujo inferior. E) Canales de flujo superior.

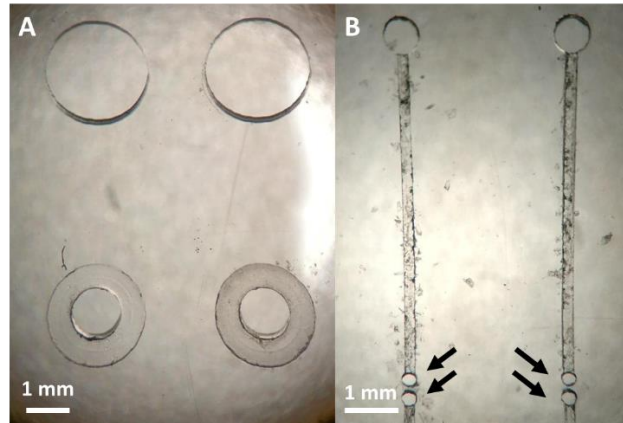
Por lo tanto, el grosor ideal de las membranas de acrílico es de 100 micras, mientras que el de su segmento central es de 300 micras. Por otro lado, los pozos centrales tienen una profundidad de 2.8 mm, lo que les permite almacenar un volumen de 4.95  $\mu\text{L}$ . Las fotografías de la **Figura 21** muestran con detalle las estructuras previamente descritas.

### 5.2.3. Dispositivos con válvulas de PDMS

Ambas versiones del chip con válvulas de PDMS se fabricaron con dos tipos de acrílico, siendo las capas de control y de válvulas maquinadas en acrílico de 1.3 mm de grosor (ME303018, Good Fellow, USA) con una broca de 0.020" (0.5 mm) Endmill (Kyocera, 1610-0200.060), mientras que la capa de flujo se maquinó en acrílico de 0.5 mm de grosor (ME303006, Good Fellow, USA) con una broca de 0.008" (0.2 mm) Endmill (Kyocera, 1620-0080L012).

Nuevamente los parámetros de maquinado para las capas variaron sólo en cuanto al valor de Z Down Position, dependiendo de la profundidad de las entradas, los contenedores para el sensor de temperatura y/o las cámaras para PCR (-1.30 mm), así como de los canales de control (-0.5 mm) en la capa de control; los huecos que conducen la presión hasta las válvulas (-1.30 mm) y el asiento para acoplar la membrana de PDMS (-0.18 mm) en la capa de válvulas; y la profundidad de los canales de flujo discontinuos (-0.2 mm) y de los micropozos verticales en la discontinuidad de dichos canales que permiten el flujo a través de las válvulas (-0.5 mm). El resto de los parámetros de maquinado fueron iguales en todos los casos: X/Y Speed: 1 mm/s, Spindle RPM: 15000, Z Speed: 6 mm/s, Z Up Position: 0.5 mm, Z Engraving Pitch: 0.2 mm (en caso de un valor de Z Down Position < 0.2, el valor del Pitch se iguala al de Down Position). El Infill fue de 0.1 o 0.25 dependiendo de la broca utilizada, 200 y 500 micras, respectivamente.

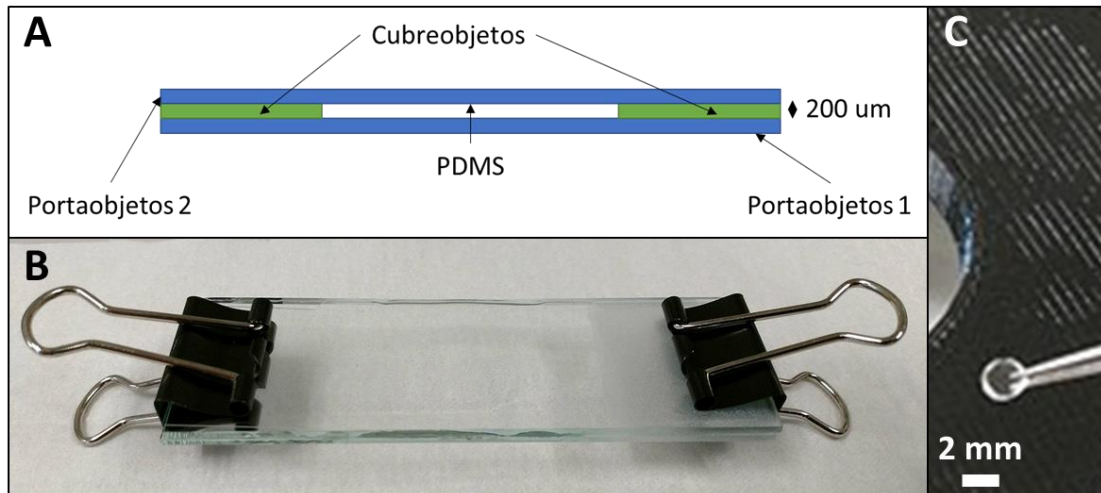
Las fotografías de la **Figura 22** muestran al detalle las estructuras que diferencian este dispositivo del de válvulas de acrílico.



**Figura 22.** Estructuras del dispositivo con válvulas de PDMS. A) Asientos de válvulas. B) Canales de flujo discontinuos. Las flechas negras indican la discontinuidad de los canales de flujo.

#### 5.2.4. Membranas de PDMS

Para fabricar las membranas utilizadas en el dispositivo con válvulas de PDMS se hizo un arreglo como el mostrado en la **Figura 23**. Brevemente, en un portaobjetos se colocan dos cubreobjetos, uno en cada extremo; la altura de 200 micras de los cubreobjetos determina el grosor de la membrana de PDMS. A continuación, se vacían 300  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:10 de base para PDMS con 'cross linker' (Sylgard<sup>®</sup> 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation) en medio de los dos cubreobjetos, luego se utiliza un segundo portaobjetos para cubrir el arreglo. Finalmente, se colocan un par de pinzas en cada extremo del arreglo para garantizar que este quede fijo, seguidamente se deja 45 minutos sobre una plancha a 100 °C para que el PDMS sea curado. Para recortar las membranas individuales que se colocan en el dispositivo, se utilizó un sacabocados de 2 mm de diámetro.



**Figura 23.** Membranas de PDMS. A) Esquema y B) Fotografía de arreglo de portaobjetos y cubreobjetos para fabricar una membrana de PDMS de 200 micras de grosor. C) Fotografía de una membrana.

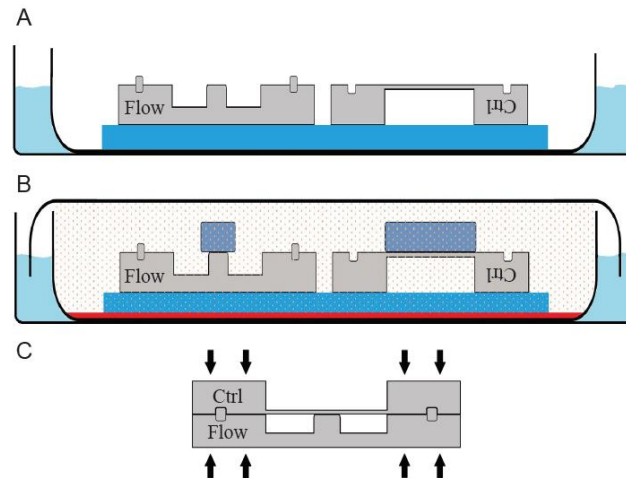
### 5.2.5. Protocolo para sellado de dispositivos multicapas

En el caso de los dispositivos con válvulas, una vez fabricada la totalidad de sus capas es necesario eliminar cualquier basura o rebaba remanente en estas, así como sellarlas entre sí, de modo que sus estructuras puedan cumplir su correcta función (e.g. entradas, salidas, válvulas, etc.). Para ello se utilizó un tratamiento con solventes y se hizo uso de una prensa casera a alta temperatura siguiendo el protocolo descrito por Guevara-Pantoja, *et al.* [28]:

1. Se limpiaron las capas de acrílico con isopropanol (W292907, Sigma-Aldrich) y una brocha para sacar basuras contenidas en las estructuras.
2. Se secaron el total de las capas con nitrógeno gaseoso hasta que el alcohol se evaporara por completo del acrílico.
3. Se observó con un estereoscopio las estructuras de cada capa y se removió manualmente con una aguja las rebabas que aún se apreciaban.
4. Se repitieron los pasos 1 y 2.

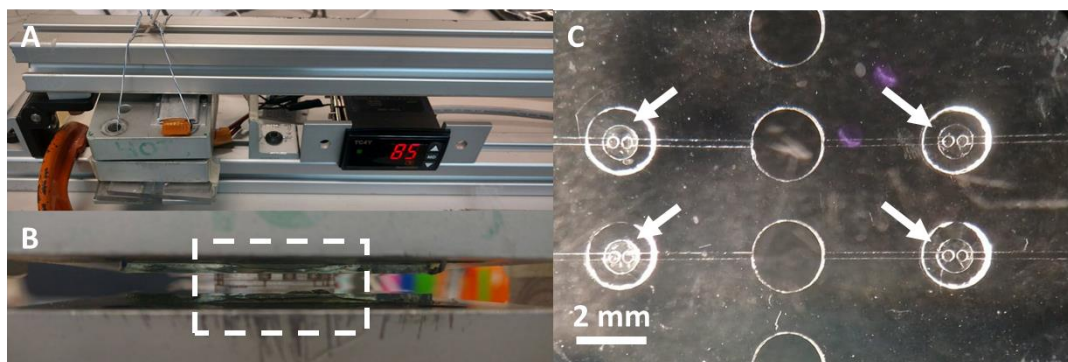
5. Se colocaron dos capas contiguas con la cara a sellar expuesta hacia arriba sobre tres portaobjetos superpuestos dentro de una caja de Petri de vidrio (90 mm) abierta. Posteriormente, se colocó esta caja de Petri dentro de otra de mayor tamaño (140 mm) con agua en su interior (el nivel del agua debía cubrir aproximadamente dos terceras partes de la altura de la caja de Petri más pequeña).
6. Se añadió 1 mL de cloroformo al interior de la caja de Petri pequeña, cuidando que el solvente no entrara en contacto directo con las superficies de las capas de acrílico. A continuación, se cubrió la caja de Petri pequeña formando un sello de agua entre su tapa y la base de la caja de Petri grande. Se mantuvo este arreglo por dos minutos y medio.
7. Se quitó la tapa de la caja de Petri pequeña y se extrajeron las dos capas de acrílico, estas se colocaron una encima de la otra poniendo en contacto las caras que fueron expuestas al cloroformo gaseoso.
8. Se colocaron las dos capas de acrílico unidas en una prensa caliente a 85 °C durante diez minutos, utilizando una masa de 10 kg en el extremo final del brazo de la prensa para ejercer presión.
9. Una vez selladas las capas, se repitieron los pasos 5, 6, 7 y 8 para ensamblar estas dos capas con cada una de sus capas contiguas.

En la **Figura 24** se esquematiza el protocolo de sellado anterior.



**Figura 24.** Protocolo de sellado. A) Dos capas de un dispositivo con válvulas de acrílico son colocadas dentro de dos cajas de Petri, la segunda de ellas llena de agua. B) En este caso, se colocan parches de PDMS sobre la membrana flexible y la base de la válvula para proteger ambas estructuras del cloroformo gaseoso. C) El PDMS es removido y las capas son alineadas previo a ser colocadas en la prensa caliente. Tomada de [28].

Para ejemplificar este proceso, en la **Figura 25** se muestra una fotografía del sellado de las capas de válvulas y flujo del dispositivo con válvulas de PDMS. Se resalta la incorporación de la membrana de PDMS en el asiento correspondiente. Previamente se mencionó que dicho asiento era fabricado con una profundidad menor al grosor de la membrana (180 y 200 micras, respectivamente), por lo que esta última queda presionada durante el sellado (**Figura 17**) y se garantiza que no se desplace incorrectamente al ser activada.



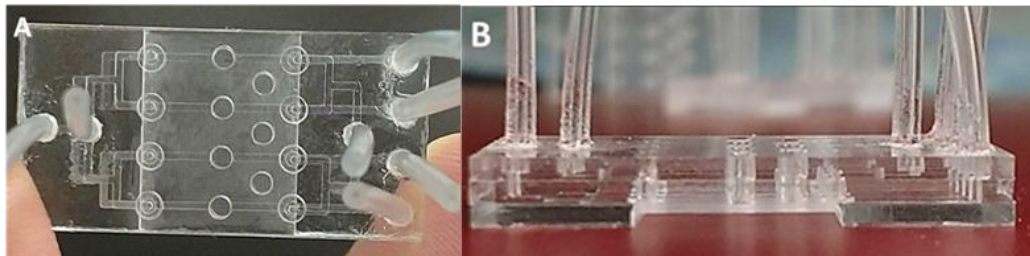
**Figura 25.** Proceso de sellado con calor. A) Prensa casera a 85 °C. B) Vista lateral de dispositivo siendo sellado. C) Capas de válvulas y de flujo del dispositivo con válvulas de PDMS una vez selladas. Las cuatro membranas de PDMS fueron colocadas manualmente en sus asientos correspondientes previo al sellado, se señalan con flechas blancas.



### 5.2.6. Arreglos finales de dispositivos multicapas

Una vez ensamblados, los dispositivos con válvulas se colocaron nuevamente en la máquina fresadora con el lado inferior hacia arriba para maquinarse un hueco que les permitiera ser acoplados al calentador del termociclador, similar al rectángulo del dispositivo de pozos (**Figura 14**), el cual se fabricó con dimensiones de 11 mm (ancho) por 14 mm (largo) en el segmento central de cada dispositivo, con 1 mm de profundidad.

Finalmente, se pegaron mangueras de plástico de 1.5 mm de diámetro en las entradas de control y de flujo. En la **Figura 26** se muestra un dispositivo microfluídico con válvulas completamente terminado y listo para ser utilizado.



**Figura 26.** Dispositivo microfluídico con válvulas de PDMS (versión completa). A) Vista superior y B) lateral.

### 5.3. Protocolo de aislamiento de RNA y síntesis de cDNA

Los ensayos de qPCR, tanto en el termociclador comercial como en el sistema integrado por el dispositivo microfluídico y el termociclador portable, fueron realizados para detectar la presencia del gen de control endógeno 18S rRNA en una muestra de cDNA a diferentes concentraciones. La secuencia de interés forma parte del RNA estructural de los ribosomas y es expresada por todas las células eucariotas [30], dada su abundancia y poca variación de expresión con diferentes tratamientos se le considera como un buen, sino el mejor, control interno para este tipo de ensayos [31], de modo que permitió comprobar el funcionamiento del sistema propuesto como prueba de concepto.

Para obtener la muestra de cDNA se llevó a cabo el siguiente protocolo, el cual fue estandarizado y es comúnmente utilizado en uno de los laboratorios de biología molecular dentro de la Unidad Monterrey del Cinvestav previo a la realización de la técnica qRT-PCR en un termociclador comercial:

### **5.3.1. Aislamiento de RNA de un tejido biológico**

#### 1. Homogenización (2-8 °C):

- Se homogenizó una porción de tejido de corazón de ratón (100 mg) en 1 ml de Trizol (T9424, Sigma-Aldrich) con un mortero y pistilo.

#### 2. Separación:

- Se colocó la muestra homogenizada en un tubo Eppendorf (2 mL) y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo (C2432, Sigma-Aldrich) y se agitó vigorosamente por 1 minuto.
- Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y a continuación se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C (generación de la fase acuosa de RNA y la interfase fenol-cloroformo de ADN y proteínas).
- Se tomaron 400  $\mu$ L de la fase acuosa con una micropipeta y para ser colocados en otro tubo Eppendorf (2 mL).

#### 3. Precipitación de RNA:

- Se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol (I9516, Sigma-Aldrich) a la fase acuosa, se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

#### 4. Lavado de RNA:

- El sobrenadante de la muestra fue eliminado por medio de un decantado y enseguida se agregó 1 mL de etanol al 75%, siendo agitado por 60 segundos.

- Se centrifugó a 7,500 rpm por 5 minutos a 4 °C y se volvió a eliminar el sobrenadante.
- Para eliminar el exceso de etanol, se dejó secar la pastilla de RNA de 3 a 5 minutos.

#### 5. Resuspensión de RNA:

- Se resuspendió la pastilla de RNA en 50 µL de agua DEPC al 0.1 % (Dietilpirocarbonato) libre de RNAsas (D5758, Sigma-Aldrich)..

#### 6. Cuantificación de RNA:

- Se tomaron 5 µL de la solución de RNA y se disolvieron en 495 µL de agua DEPC, quedando un volumen total de 500 µL.
- Se tomó una gota de 2 µL de la solución, la cual fue colocada en un NanoDrop 2000, para medir la relación  $A_{260/280}$  (Absorbancia 260 nm sobre absorbancia 280 nm), y conocer la pureza del RNA.

### 5.3.2. Síntesis de cDNA

El cDNA, o DNA complementario, consiste en una cadena doble de nucleótidos, donde una de sus hebras es una secuencia complementaria al RNA mensajero desde el cual se sintetizó, y es un reactivo necesario para llevar a cabo la técnica de PCR a partir de una retrotranscripción [22][23]. El protocolo se continuó a partir del RNA previamente extraído, todos los reactivos descritos a continuación provienen de Invitrogen/Life Technologies.

- Se preparó una solución de 12 µL con el volumen necesario de RNA para tener 5 microgramos en solución (dada su concentración obtenida experimentalmente), 1 µL de 'random primers' (48790-011) y de 10mM dNTP Mix (18427-013), así como agua DEPC hasta completar el volumen faltante.

- Se incubó a 65 °C durante 5 minutos en un termociclador comercial (Gradient Palm-Cycler, Corbett Life Science, Australia) y posteriormente la muestra fue centrifugada.
- Se añadieron 4 µL de 5X First Strand Buffer (P/N Y02321), 2 µL de 0.1M DTT (P/N Y00147) y 1 µL de RNAsa OUT (10777-019).
- La mezcla fue resuspendida por pipeteo e incubada a 37 °C por 2 minutos en el termociclador comercial.
- Se añadió 1 µL de MVLRT (i.e. enzima transcriptasa reversa) (28025-013) y se resuspendió nuevamente por medio de una pipeta.
- Se incubó la mezcla final en el termociclador comercial con el siguiente protocolo térmico: 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 50 minutos, y 70 °C por 15 minutos.
- 2 µL del cDNA sintetizado se colocaron en el NanoDrop 2000 para conocer su pureza (relación  $A_{260}/A_{280}$ ) y su concentración.

#### **5.4. qPCR en termociclador comercial**

Para realizar los ensayos de amplificación por PCR en un termociclador comercial (StepOne RealTime PCR, Applied Biosystems, USA) se hizo uso de placas de 48 pozos, o bien de tiras de 8 tubos, dependiendo del número de reacciones que se quisieran llevar a cabo por ensayo. Por cada reacción se utilizaron los siguientes reactivos y sus correspondientes cantidades: 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (4304437, Applied Biosystems), 7 µL de agua destilada ultra pura libre de nucleasas (10977, Life Technologies), y 1 µL de 20X TaqMan® Gene Expression Assay (Mm03928990\_g1, Applied Biosystems), para un total de 18 µL de reactivos

por pozo/tubo, a los cuales se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de cDNA a una cierta concentración, teniendo un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  [17].

El protocolo de preparación de 6 diluciones seriales 1:5 de la muestra 'stock' de cDNA (para curvas de validación en qPCR) así como de las mezclas en los pozos y de la ejecución del ensayo de qPCR fue el siguiente:

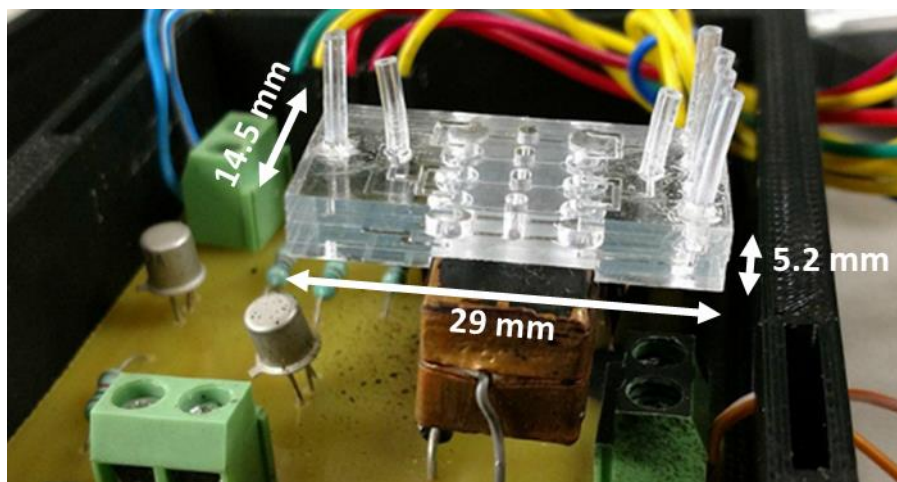
- Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra 'stock' y se mezclaron con 40  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, obteniéndose así la primera dilución (Factor de dilución 1:5).
- Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la dilución (D1) y se repitió el proceso anterior, obteniéndose así la segunda dilución (Factor de dilución 1:5 respecto a D1 y 1:25 respecto a la muestra 'stock').
- Se repitieron los pasos anteriores hasta obtener seis diluciones. Cada una de ellas, así como la muestra 'stock', se colocaron en tubos Eppendorf independientes (0.2 mL) con las siguientes etiquetas: S, D1, D2, D3, D4, D5 y D6.
- Para realizar una curva de validación de qPCR se extrajeron 2  $\mu\text{L}$  de cada dilución y mezclaron en una placa de 48 pozos con 18  $\mu\text{L}$  de la mezcla para PCR (i.e. Master Mix, agua libre de nucleasas y sonda para 18S rRNA). Cada dilución se colocó por triplicado y tres pozos adicionales fueron utilizados como control negativo (sólo mezcla para PCR, sin cDNA).
- Finalmente, se colocó la placa de pozos en el termociclador comercial y se ejecutó el siguiente protocolo térmico: Fase 1 (x1): 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos; fase 2 (x40): 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto.

## 5.5. qPCR en termociclador portable

Los ensayos de qPCR en el termociclador portable fueron llevados a cabo con el protocolo térmico anterior. Para ello, los diferentes dispositivos microfluídicos fueron acoplados al calentador, como se muestra, a manera de ejemplo, el dispositivo con válvulas de acrílico de la **Figura 27**.

La mezcla para PCR base consistió nuevamente de 10  $\mu\text{L}$  de TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) y 1  $\mu\text{L}$  de 20X TaqMan® Gene Expression Assay, pero se agregó 1  $\mu\text{L}$  de BSA (A9647, Sigma Aldrich) a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y sólo 6  $\mu\text{L}$  de agua destilada ultra pura libre de nucleasas, además de los 2  $\mu\text{L}$  del templado de cDNA.

Sin embargo, las diferencias en cuanto a la incorporación de las muestras dependieron directamente del dispositivo utilizado. De igual forma, cada dispositivo recibió un tratamiento químico para su limpieza y esterilización, así como para hacer su superficie más hidrofílica y evitar la formación de burbujas, lo cual se explica con detalle en las siguientes subsecciones.



**Figura 27.** Dispositivo microfluídico con válvulas de acrílico acoplado al calentador del termociclador.

En general, la detección del gen 18S rRNA se debió a la fluorescencia emitida por el fluoróforo 6-FAM de la sonda TaqMan® (520 nm). Al inicio de

cada ensayo de qPCR, la interfaz gráfica del termociclador desplegó una imagen de los pozos y solicitó al usuario seleccionar las regiones de interés del dispositivo, es decir, el centro de cada cámara de reacción. El algoritmo programado en la Raspberry Pi (encargada de controlar todas las funciones del termociclador) calculó el valor promedio de los píxeles de dichas regiones mediante el sensor CMOS incorporado en la cámara del termociclador (tiempo de exposición = 300 ms), utilizado como la intensidad de fluorescencia basal. Durante la ejecución de los ciclos, las muestras contenidas en las cámaras fueron excitadas por el LED (475 nm, OSW-6303, Newark) al final de la fase de alineación/extensión, de modo que la intensidad de fluorescencia promedio se midió nuevamente en la región de interés y la diferencia con respecto a la fluorescencia basal fue desplegada en tiempo real en la interfaz del usuario.

A continuación, se explican las diferencias de implementación del protocolo de qPCR en el termociclador portable para cada dispositivo microfluídico.

### **5.5.1. Ensayos en dispositivo de pozos**

Gotas de 4  $\mu$ L de la mezcla para PCR previamente descrita se pipetearon en tres de los pozos del dispositivo, mientras que en los dos pozos restantes se colocaron 4  $\mu$ L de un control negativo (sin cDNA). A su vez, en uno de estos últimos, se colocó manualmente el termistor que monitorea la temperatura de la reacción. Una vez cargados los pozos, 100  $\mu$ l de aceite mineral (M5904, Sigma Aldrich) fueron pipeteados por encima de los mismos (en el interior de la piscina) para evitar tanto la evaporación de su contenido debido a la alta temperatura como su contaminación. Dependiendo del ensayo realizado, una o varias diluciones de los templados de cDNA fueron colocadas en las mezclas para PCR de cada pozo (una dilución por pozo).

Cabe mencionar que, instantes previos a la colocación de la mezcla para PCR, el chip fue esterilizado con etanol, lavado con RNaseZAP (R2020, Sigma Aldrich) y enjuagado con agua destilada ultra pura libre de nucleasas. A

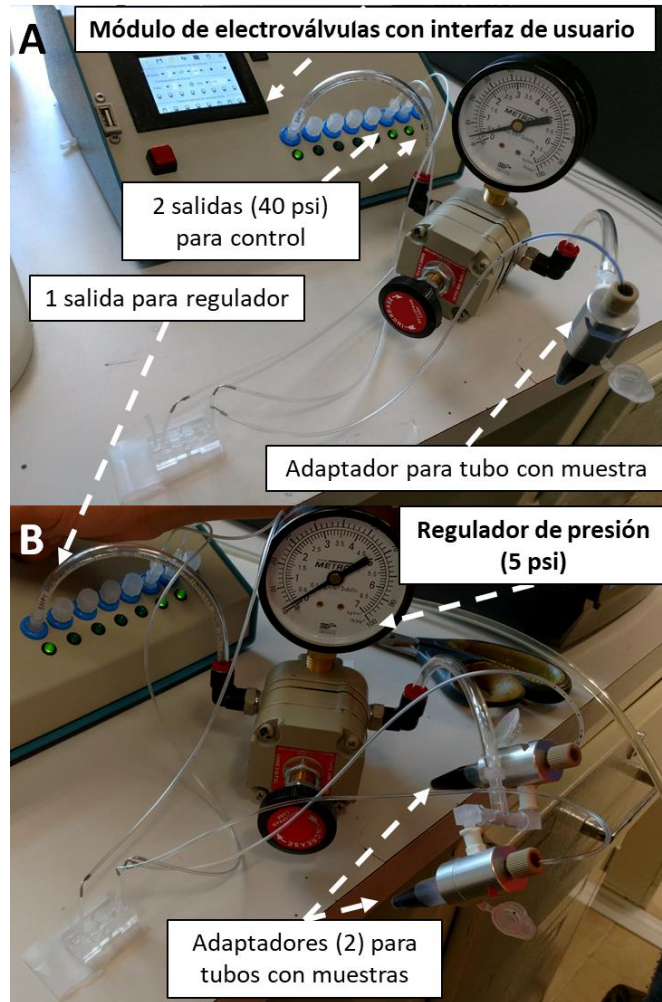
continuación, fue sometido al siguiente tratamiento con plasma de oxígeno (Zepto, Diener Electronic GmbH & Co. KG, Deutschland): aplicación de vacío por 2:47 minutos; incorporación de oxígeno por 1:30 minutos; tratamiento con plasma por 1 minuto; y ventilación por 1 minuto. Posteriormente, el chip fue manipulado dentro de una campana de flujo laminar en un cuarto limpio; y finalmente, el dispositivo fue acoplado al calentador del termociclador para dar inicio al ensayo de qPCR.

### **5.5.2. Ensayos en dispositivos con válvulas**

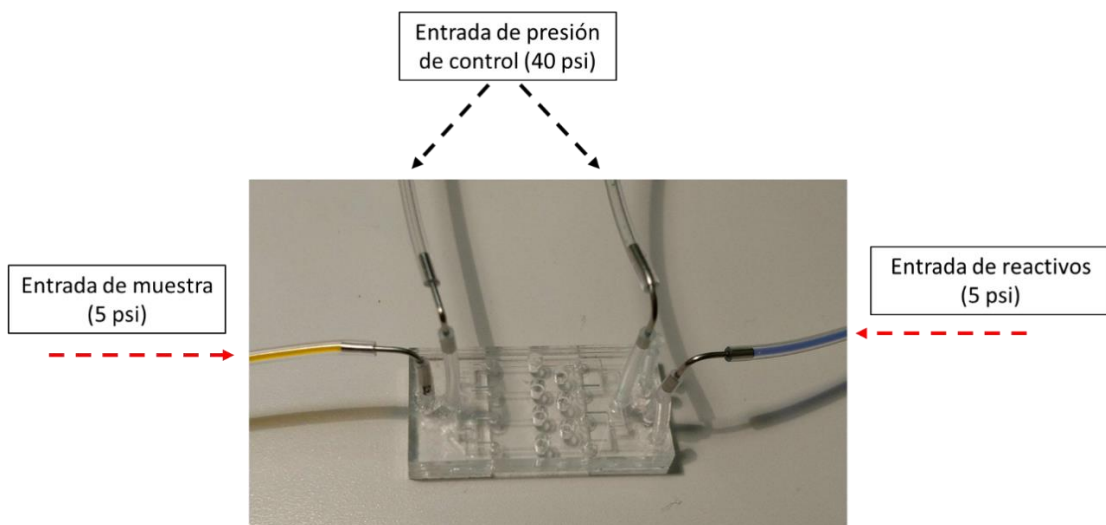
En los dispositivos con válvulas la muestra de cDNA y los reactivos, o la mezcla para PCR preparada de manera externa (versión simplificada de chip con válvulas de PDMS), son incorporados de manera automatizada a través de las mangueras conectadas a las entradas de flujo mediante un módulo de electroválvulas de 8 salidas programado en una Raspberry Pi y controlado por una interfaz gráfica de usuario. La entrada al módulo de electroválvulas corresponde a la presión que directamente es utilizada para la activación de las válvulas (40 psi) a través de 2 de sus 8 salidas. Mientras que, en una de las 6 salidas restantes, se conectó un regulador de presión que permite ajustar una presión de 5 psi para el flujo de las muestras. A su vez, a la salida del regulador de presión, es posible colocar uno o dos adaptadores de tubos Eppendorf de 1.5 mL, los cuales permiten la salida constante del contenido de dichos tubos a la presión colocada en el regulador.

El arreglo experimental previamente descrito se muestra en las **Figuras 28 y 29**. En la primera se observa el módulo de electroválvulas programado y su correspondiente interfaz, así como sus 8 salidas, dos de ellas conectadas directamente al dispositivo y una más conectada al regulador de presión, desde donde uno o dos adaptadores de tubos Eppendorf son colocados. La segunda fotografía esquematiza las entradas al dispositivo provenientes del módulo de electroválvulas y del regulador de presión.





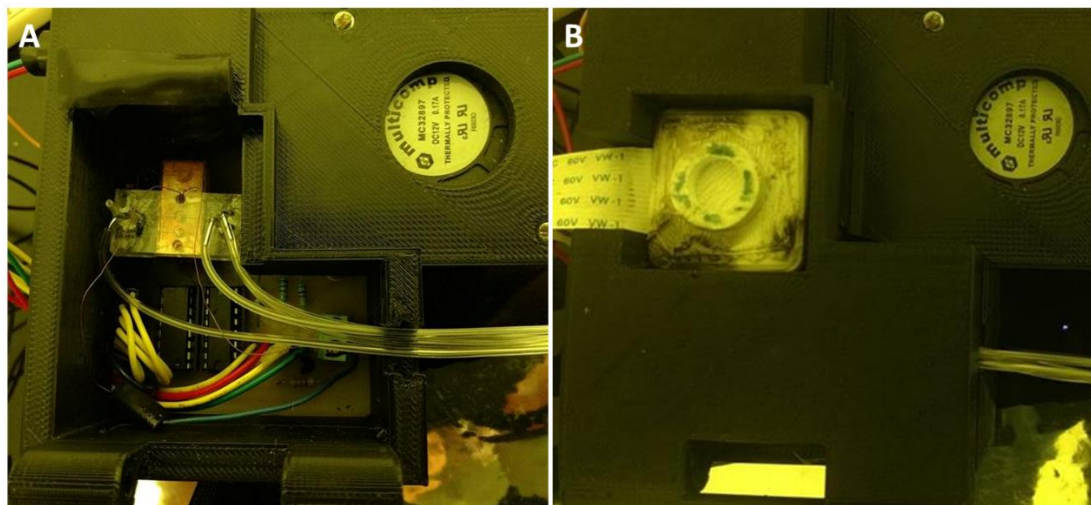
**Figura 28.** Módulo de electroválvulas conectado al dispositivo con A) una o B) dos entradas de flujo.



**Figura 29.** Esquema de conexiones al dispositivo microfluidico. Como ejemplo se muestran las conexiones al dispositivo con válvulas de PDMS en su versión completa.

Al igual que el dispositivo de pozos, y previo al llenado de las muestras y reactivos, el chip con válvulas fue sometido al mismo tratamiento con plasma de oxígeno. Adicionalmente, el dispositivo se colocó en una cámara de vacío por 30 minutos para extraer el aire contenido tanto en los canales de control como en los de flujo. En el instante en que el vacío era desactivado, todos los canales fueron llenados con una solución de PBS (i.e. búfer de fosfato salino) estéril, tratando de que no se formara ninguna burbuja al interior de estos.

Finalmente, una vez conectadas las mangueras a sus correspondientes entradas de control y de flujo, el dispositivo con válvulas se acopló al calentador del termociclador portable (**Figura 30**). Una vez ahí, las válvulas fueron desactivadas (sin aplicar presión) para permitir la entrada de las mezclas de PCR a los pozos centrales del dispositivo. Por último, las válvulas de paso fueron nuevamente activadas por presión, aislando a las cámaras centrales y dando inicio al protocolo de qPCR.



**Figura 30.** Vista superior de dispositivo con válvulas de PDMS (versión simple) acoplado al termociclador portable y conectado mediante mangueras al módulo de electroválvula para permitir la entrada de la mezcla para PCR y de la presión de control. A) Termociclador abierto. B) Termociclador cerrado.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo se presentan en cuatro diferentes apartados.

En primer lugar, como entrenamiento en la técnica de qPCR realizada de manera convencional en un termociclador comercial, se muestran los resultados obtenidos de diferentes ensayos de detección del gen 18S rRNA contenido en diferentes diluciones de una muestra de cDNA.

La segunda sección incluye los diferentes prototipos de válvulas que fueron fabricados hasta conseguir el diseño óptimo para llevar a cabo de manera adecuada la función deseada. En este proceso se hizo uso de diferentes materiales para la construcción de las válvulas, así como de un maquinado simultáneo y otro de manera individual para las capas de los microdispositivos.

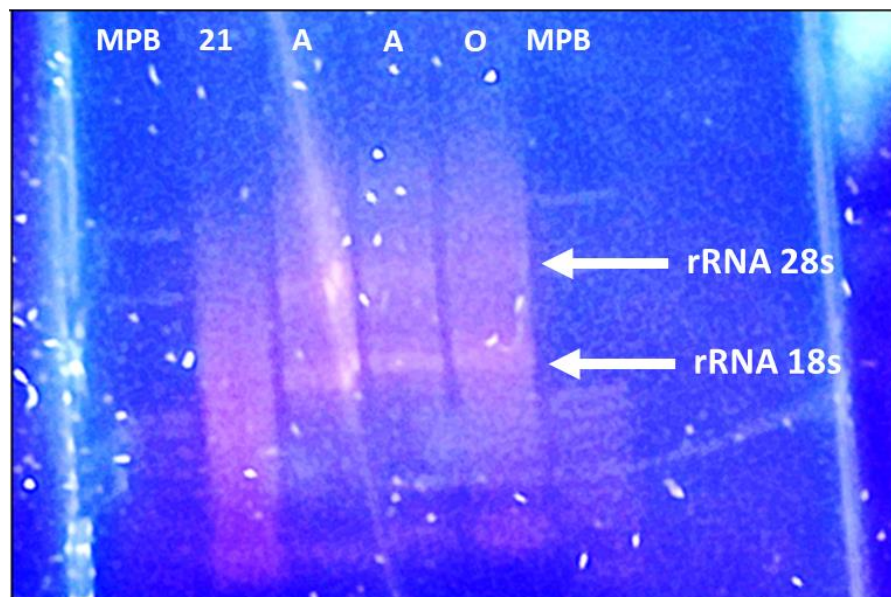
Para la tercera sección, y previo a la realización de los ensayos de qPCR en el sistema integrado, se realizaron mediciones de fluorescencia utilizando un chip de pozos [17] para verificar el adecuado funcionamiento del termociclador portable; sin embargo, fue necesario llevar a cabo una serie de optimizaciones al sistema debido a 1) un bajo límite de detección en la intensidad de fluorescencia observada, y 2) la evaporación de las muestras durante la ejecución del protocolo térmico. De modo que son explicadas las modificaciones realizadas sobre el termociclador, así como la estrategia utilizada para resolver el problema de la evaporación.

Finalmente, en el último apartado se detalla el proceso de integración del dispositivo microfluídico con válvulas con el termociclador portable modificado para llevar a cabo ensayos similares a los realizados en el termociclador comercial. Sin embargo, la generación de burbujas en el interior del dispositivo al momento de ser llenado impidió un adecuado desempeño del sistema y no fue posible realizar dichos ensayos de manera correcta. Pese a ello, sí fue posible realizar experimentos de qPCR en el chip de pozos utilizando hasta

tres diferentes concentraciones de cDNA, por lo que los resultados obtenidos pudieron ser comparados con los reportados en la primera sección.

### 6.1. Ensayos de qPCR en un termociclador comercial

Las muestras de cDNA utilizadas para los ensayos de qPCR fueron sintetizadas a partir de RNA previamente aislado por medio del protocolo descrito en la sección de anterior. Sin embargo, antes de llevar a cabo dicha síntesis fue necesario verificar la integridad y pureza del RNA mediante un proceso típico de electroforesis en gel de agarosa y el uso de un espectrofotómetro de barrido espectral (NanoDrop 2000), respectivamente. En la **Figura 31** se muestra una fotografía de un gel de agarosa tomada desde una cámara de luz UV, en la cual es posible apreciar las bandas de los RNA ribosomales 28S y 18S, las cuales indican una adecuada integridad de las muestras etiquetadas como “A” y “O”; caso contrario ocurre con la muestra “21”, en cuyo carril no es posible apreciar ninguna banda.



**Figura 31.** Electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se observa la integridad de las muestras “A” y “O” de acuerdo a los marcadores de pares de bases (MPB) para los rRNA 28S y 18S.

Por otro lado, en la **Tabla 1** se observan los valores de concentración y de la relación  $A_{260/280}$  de las dos muestras cuya integridad resultó adecuada, los cuales fueron medidos por medio del NanoDrop 2000.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$
A	5.1	1.8
O	2.6	2.48

**Tabla 1.** Concentración y pureza de muestras de RNA.

La muestra "A" fue la seleccionada para llevar a cabo el proceso de síntesis de cDNA debido a su mayor concentración y a que su relación  $A_{260/280} > 1.7$  indica una pureza aceptable [32]. Como referencia, un rango de  $2.0 < A_{260/280} < 2.2$  significa una pureza óptima, mientras que un valor de  $A_{260/280} < 1.7$  indica una contaminación por compuestos aromáticos [32].

Del volumen disponible de RNA ( $\approx 498 \mu$ L) fue posible llevar a cabo la síntesis de cinco muestras diferentes de cDNA, a las cuales les fue igualmente medida su pureza y concentración para determinar cuáles de ellas podían ser utilizadas en los ensayos de qPCR. En la **Tabla 2** se muestran los valores obtenidos por medio del NanoDrop 2000 de dichas mediciones.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$
1	1190.1	1.75
2	1132.5	1.75
3	1194.4	1.76
4	1327.8	1.75
5	1335.6	1.76

**Tabla 2.** Concentración y pureza de muestras de cDNA.

Para muestras de DNA un rango de  $1.6 < A_{260/280} < 1.8$  indica una pureza aceptable, y dado que la concentración de todas las obtenidas era mayor a

1000 ng/ $\mu$ L, cualquiera podía ser utilizada para los experimentos de qPCR. Como referencia, un rango de  $1.8 < A_{260/280} < 2.0$  significa una pureza óptima, mientras que contaminaciones por compuestos aromáticos se determinan cuando el valor de  $A_{260/280} < 1.6$ , o por RNA si  $A_{260/280} > 2.1$  [32].

Se escogieron las muestras “1” y “3” para realizar diluciones seriales 1:5 y después usarlas en los ensayos de qPCR. La **Tabla 3** muestra las concentraciones correspondientes a las diluciones de cDNA de cada muestra.

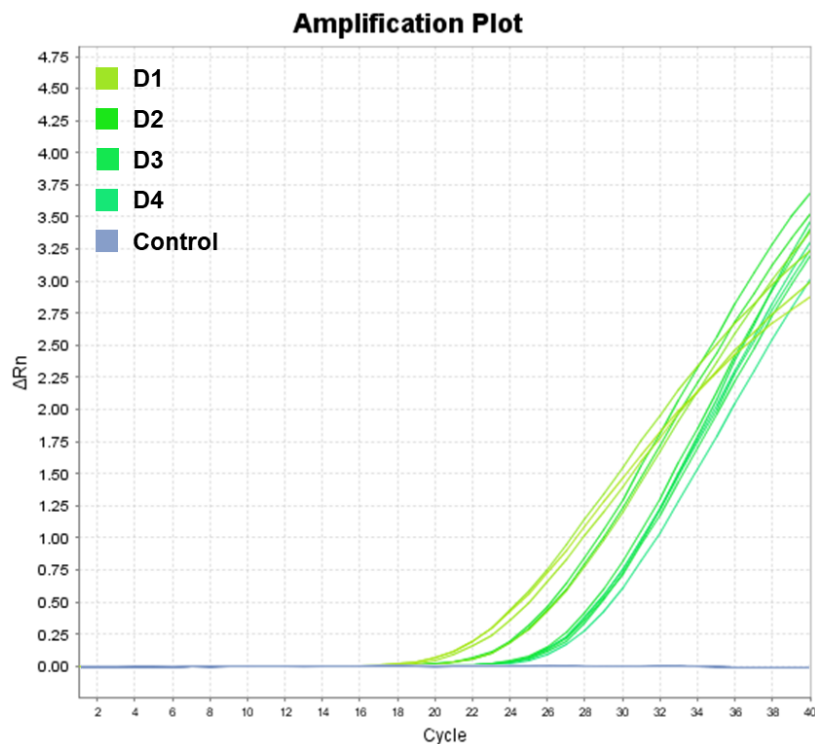
	Concentración (ng/ $\mu$ L)							
Muestra	Stock	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
1	1190.1	238.02	47.60	9.52	1.90	0.38	0.08	-
3	1194.4	238.88	47.78	9.56	1.91	0.38	-	0.02

**Tabla 3.** Concentración de diluciones seriales 1:5 de dos muestras de cDNA.

Con fines de aumentar el límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) del ensayo, la dilución 5 (D5) de la muestra “3” se diluyó 1:25 para tener una dilución 7 (D7) con un valor de concentración aún menor.

A continuación, se llevaron a cabo tres ensayos de qPCR para generar curvas de validación, en los cuales las diluciones se colocaron por triplicado y se agregaron tres controles negativos (sólo reactivos, sin cDNA). En el primero de ellos se hizo uso de las 4 primeras diluciones seriales de la muestra “1”, mientras que en el segundo se utilizaron el total de las diluciones de la muestra “3”. Por otro lado, en el tercer ensayo únicamente se hizo uso de las diluciones 3, 4 y 5 de la muestra “3”, colocándolas sólo por duplicado y conteniendo una de ellas la mezcla para PCR que incluía BSA, mientras que la otra tenía la mezcla estándar. El último ensayo se realizó para corroborar que las mezclas que serían utilizadas en los ensayos con el dispositivo microfluídico también podían ser medidas con el termociclador comercial, se colocaron por duplicado únicamente para ahorrar reactivos y cDNA.

Los siguientes gráficos muestran en el *eje x* el ciclo 'threshold' ( $C_T$ ) contra el cambio en intensidad de fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) en el *eje y*, medido en unidades arbitrarias de fluorescencia (a.u.f.). El  $C_T$  define el ciclo exacto en el cual la reacción de una cierta concentración de cDNA alcanza la fase geométrica en la cinética de amplificación. Esta fase se define como aquella en la que hay una abundancia de reactivos en la reacción y la eficiencia de amplificación es muy cercana al 100%, por lo que una molécula de DNA genera 2 moléculas más después de cada ciclo [33]. Los resultados fueron generados en el software integrado del termociclador StepOne RealTime PCR, por lo que ningún análisis previo o posterior se realizó sobre los mismos; sin embargo, las leyendas de las diferentes diluciones fueron agregadas sobre las gráficas originales para facilitar una mayor comprensión de las curvas. En la **Figura 32** se muestra la gráfica de amplificación del primer ensayo de qPCR. En la **Tabla 4**, a su vez, se detallan los valores de  $C_T$  promedio para cada una de las diluciones, así como su desviación estándar ( $n=3$ ).

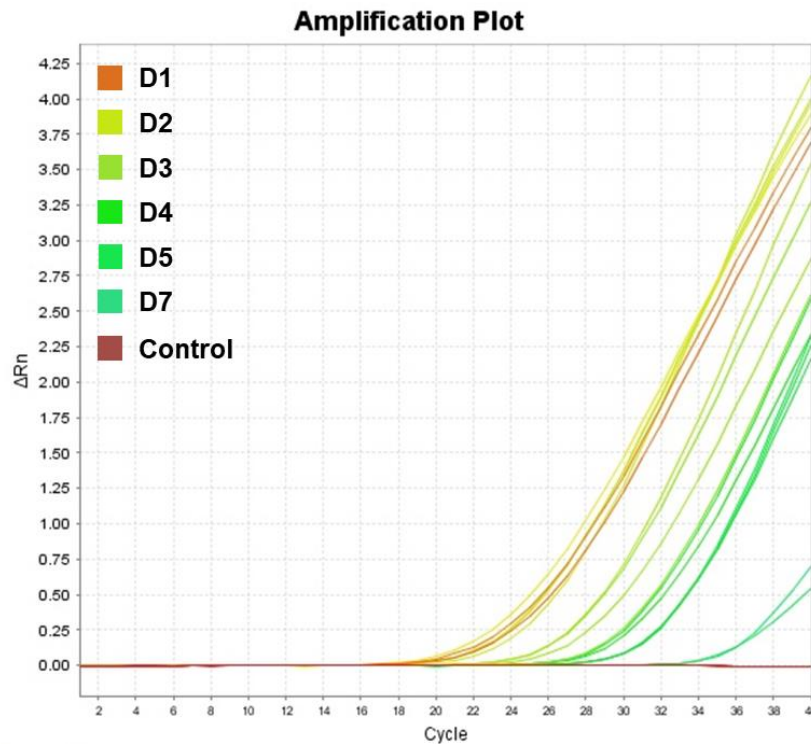


**Figura 32.** Gráfica de amplificación para 4 diluciones de cDNA. D1, D2, D3 y D4 = 238.02, 47.60, 9.52, 1.90 (ng/ $\mu$ L), respectivamente.

Dilución	$C_T (\bar{X} \pm SD)$
D1	$22.68 \pm 0.28$
D2	$24.55 \pm 0.10$
D3	$27.15 \pm 0.24$
D4	$27.29 \pm 0.37$

**Tabla 4.**  $C_T$  promedio para 4 diluciones seriales 1:5 de una muestra de 'stock' de cDNA (1190.1 ng/ $\mu$ L).

En la **Figura 33** se muestra la gráfica de amplificación del segundo ensayo de qPCR. En la **Tabla 5**, a su vez, se detallan los valores de  $C_T$  promedio para cada una de las diluciones, así como su desviación estándar (n=3).



**Figura 33.** Gráfica de amplificación para 6 diluciones de cDNA. D1, D2, D3, D4, D5 y D7 = 238.88, 47.78, 9.56, 1.91, 0.38 y 0.02 (ng/ $\mu$ L), respectivamente.

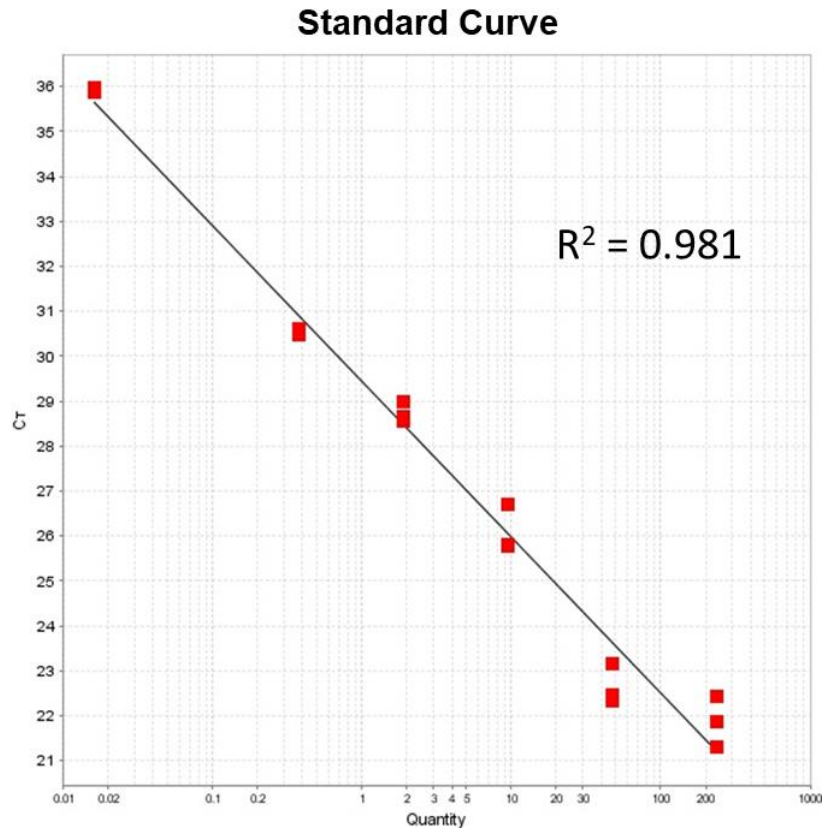


Dilución	C <sub>T</sub> ( $\bar{X} \pm SD$ )
D1	21.87 ± 0.56
D2	22.66 ± 0.45
D3	26.11 ± 0.52
D4	28.73 ± 0.22
D5	30.56 ± 0.06
D7	35.91 ± 0.06

**Tabla 5.** C<sub>T</sub> promedio para 6 diluciones seriales 1:5 de una muestra de 'stock' de cDNA (1194.4 ng/μL).

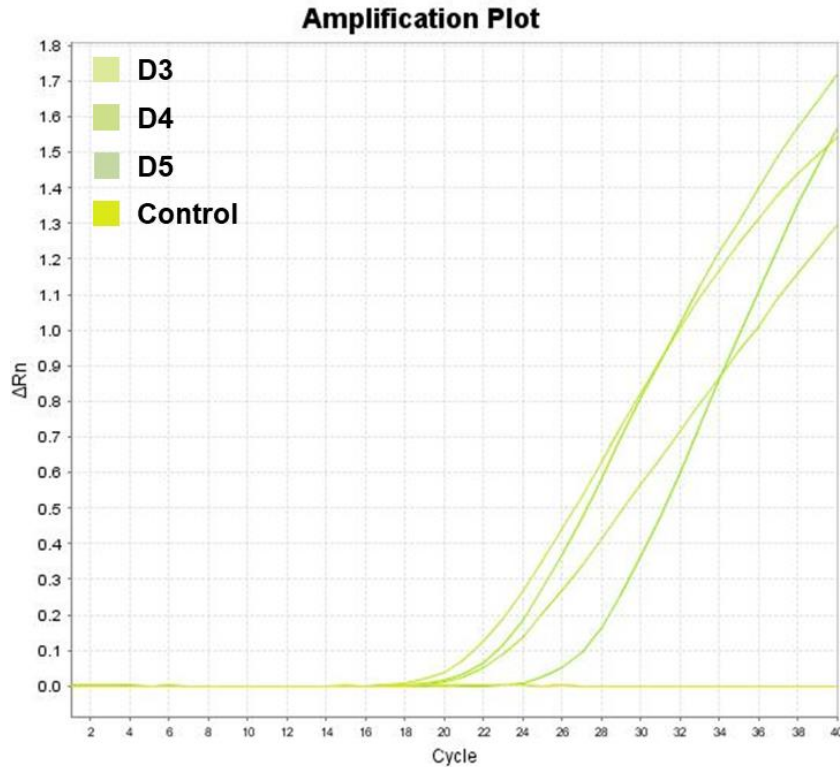
Por otro lado, los resultados anteriores también pueden representarse como la regresión semi logarítmica de los valores promedio de C<sub>T</sub> contra el logaritmo de la cantidad de DNA empleada en cada punto respectivo [34]. Dado que en este ensayo fue posible amplificar el total de las diluciones, en la **Figura 34** se muestra esta otra representación, la cual se conoce como *Curva Estándar*. En esta gráfica se presenta en el *eje x* el logaritmo base 10 de la concentración inicial de cDNA en cada dilución, y en el *eje y* el C<sub>T</sub> resultante de la amplificación de cada una de ellas [34]. A su vez, cada punto de la gráfica representa el valor de C<sub>T</sub> individual de cada curva mostrada en la **Figura 33**. Además, la pendiente de la *Curva Estándar* es -3.46, por lo que la eficiencia de la reacción es de 94.559%, y se puede calcular a partir de la ecuación **(1)**.

$$E = (10^{-1/pendiente} - 1) \times 100 \dots\dots\dots \mathbf{(1)} [34]$$



**Figura 34.** Curva Estándar correspondiente a los resultados de la **Figura 33**.

La **Figura 35** muestra la gráfica de amplificación del último ensayo de qPCR realizado. Igualmente, en la **Tabla 6** se detallan los valores de  $C_T$  promedio para cada una de las diluciones, así como su desviación estándar ( $n=2$ ). Pese a que en este caso sólo se amplificó una muestra tanto de la D3 como de la D5, se pudo corroborar que no existen diferencias evidentes en cuanto el desempeño de la reacción de PCR al hacer uso de una mezcla con y sin BSA. Lo anterior debido a que para D4 ambas muestras sí se amplificaron.



**Figura 35.** Gráfica de amplificación para 3 diluciones de cDNA. D3, D4, D5 = 9.56, 1.91, 0.38 (ng/μL), respectivamente.

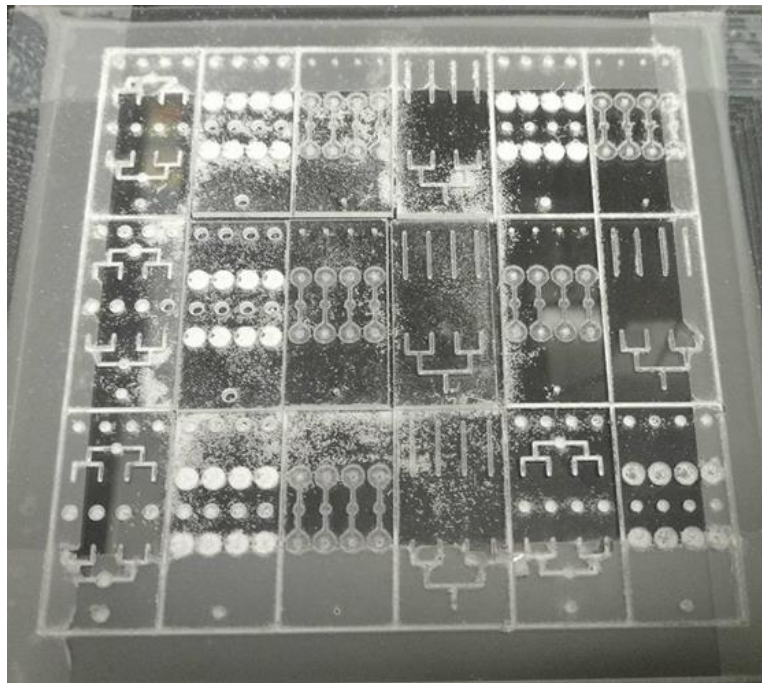
Dilución	$C_T (\bar{X} \pm SD)$
D3	21.31
D4	22.76 ± 0.32
D5	26.9

**Tabla 4.**  $C_T$  promedio para 4 diluciones seriales 1:5 de una muestra de 'stock' de cDNA (1190.1 ng/μL).

En general, todos los valores de  $C_T$  en cada uno de los diferentes ensayos realizados muestran la misma tendencia, esto es, a mayor concentración inicial de cDNA, menor el valor umbral para iniciar la amplificación geométrica de la correspondiente dilución. De modo que con las curvas validación obtenidas, y habiendo generado una vasta cantidad de cDNA (almacenado a -20 °C), se procedió a continuar con los ensayos s de qPCR en el dispositivo microfluídico.

## 6.2. Dispositivo microfluídico con válvulas integradas

Inicialmente, la fabricación de todos los dispositivos microfluídicos de este trabajo se realizaba de manera masiva, esto es, el total de las capas que componían a los dispositivos se maquinaba de manera simultánea. La fotografía de la **Figura 36** muestra una placa de acrílico de 10 cm (largo) x 10 cm (ancho) sobre la cual se gravaron hasta 18 capas (4 dispositivos completos de válvulas de acrílico y 2 capas adicionales) en aproximadamente 3 horas. Lo anterior representaba una mejora considerable de tiempo, puesto que al maquinar cada capa de manera individual la duración por dispositivo era de aproximadamente 1 hora, debido principalmente al tiempo requerido para cortar el total de las capas antes de su gravado correspondiente, así como el tiempo muerto que existía al terminar cada una de ellas y colocar la siguiente.



**Figura 36.** Capas de microdispositivos maquinadas de manera simultánea en la máquina fresadora.

El primer diseño de válvulas implementado corresponde al mostrado en la **Figuras 15**, en el cual, como se describió con anterioridad, los parámetros de maquinado para la membrana de acrílico estaban pensados para que esta tuviera un grosor de 100 micras. Sin embargo, el método masivo de fabricación

presentó un problema que hasta el momento no había sido contemplado, el cual provocaba que el grosor de las membranas no fuera constante entre aquellas de un mismo dispositivo, y que a su vez fuera aún más variable entre las de diferentes dispositivos. Lo anterior se debía, por un lado, a que la base sobre la que se maquinaban las capas estaba desnivelada, y, por otro, a que la propia placa de acrílico no tenía el mismo grosor en toda su superficie. En la **Tabla 5** se muestran mediciones realizadas al grosor de las 8 membranas de 6 dispositivos diferentes, las cuales se realizaron por medio de un micrómetro y un balín metálico que era introducido directamente en el hueco donde se encontraban las membranas.

Dispositivo	Grosor de membrana (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.13	0.13	0.14	0.15
2	0.13	0.14	0.15	0.2	0.15	0.16	0.16	0.17
3	0.22	0.22	0.22	0.23	0.22	0.22	0.22	0.24
4	0.13	0.13	0.12	0.12	0.2	0.19	0.18	0.2
5	0.05	0.05	0.09	0.12	0.05	0.07	0.1	0.15
6	0.07	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07	0.06	0.06

**Tabla 6.** Medición de membranas de acrílico en capas maquinadas para diferentes dispositivos.

Si bien algunos de los dispositivos mostraron un grosor relativamente constante entre sus membranas (dispositivos 3 y 6), hubo otros que llegaron a tener variaciones de hasta 100 micras (dispositivo 5, membranas 1 y 8) entre ellas. Además, las variaciones entre membranas de diferentes dispositivos eran aún más notorias, en algunos el grosor de las membranas rondaba las 70 micras (dispositivo 6) mientras que en otros estas llegaban a medir hasta más de 220 micras (dispositivo 3).

El problema con estas variaciones de grosor implicaba que la presión a la que serían sometidas las válvulas les podría afectar de diferente manera en cuanto a su desplazamiento, lo cual fue previamente caracterizado por

Vázquez-Vergara, *et al.* [35], quienes fueron capaces de caracterizar el comportamiento de una membrana de acrílico de 100 micras a diferentes presiones, encontrando que dicho desplazamiento disminuye en los extremos de la membrana, así como conforme se aplique una menor presión. De modo que, mientras para mayores grosores la presión aplicada pudiera no ser suficiente para desplazar la membrana, para grosores pequeños la presión podría ser demasiado alta, pudiendo provocar incluso la ruptura de las membranas debido a la rigidez propia del acrílico con que están fabricadas.

Por lo que, a partir de ese momento, el uso de la técnica de maquinación de dispositivos de manera masiva dejó de ser implementada, dando paso a la maquinación individual, con lo que fue posible tener un mayor control del grosor de las membranas en cada dispositivo. La **Tabla 7** muestra las mediciones realizadas en dos dispositivos fabricados de esta manera.

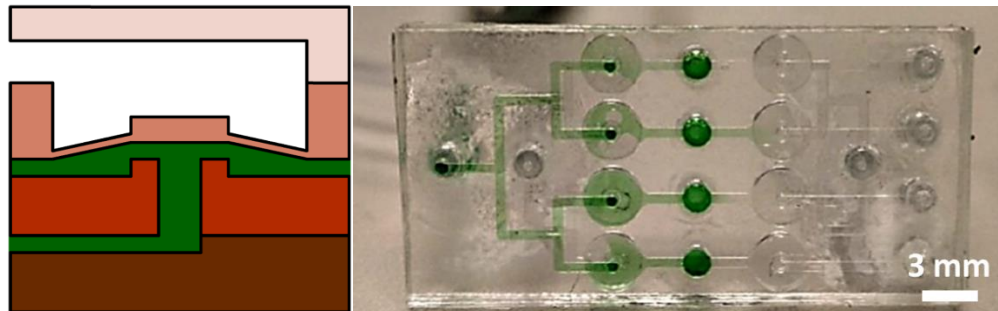
Dispositivo	Grosor de membrana (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.093	0.095	0.095	0.094	0.093	0.09	0.091	0.092
2	0.091	0.098	0.094	0.093	0.091	0.094	0.09	0.09

**Tabla 7.** Medición de membranas de acrílico en capas maquinadas para diferentes dispositivos.

Una vez fabricado el dispositivo microfluídico con válvulas de acrílico mediante el protocolo de sellado previamente descrito, se procedió a la caracterización de este usando colorantes. Sin embargo, fugas de colorante hacia las cámaras de reacción fueron visualizadas cuando las válvulas se encontraban cerradas. La causa de dichas fugas se verificó posteriormente al observar que algunas estructuras de acrílico habían sufrido rupturas.

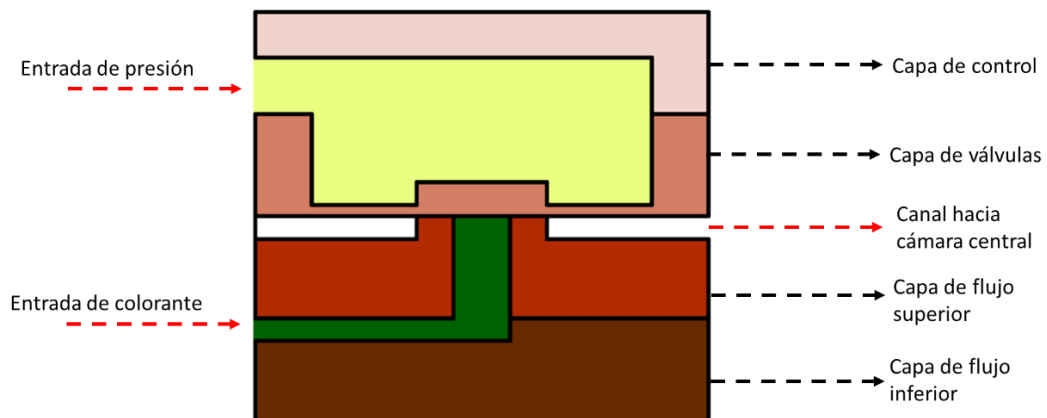
Primeramente, en la **Figura 37** se esquematiza un corte transversal del dispositivo con las válvulas abiertas, así como una fotografía real del mismo,

en la cual se observa un adecuado llenado de los pozos centrales, pese a la formación de burbujas justo donde se encuentran las válvulas.



**Figura 37.** Corte transversal de válvula de acrílico abierta y fotografía de dispositivo lleno con colorante verde e introducido a través de la entrada de muestra. De la parte superior a la parte inferior, los colores en el esquema de la válvula representan las capas de control (crema), de membranas (naranja), de flujo superior (rojo), y de flujo inferior (marrón); el flujo de colorante se esquematiza con color verde.

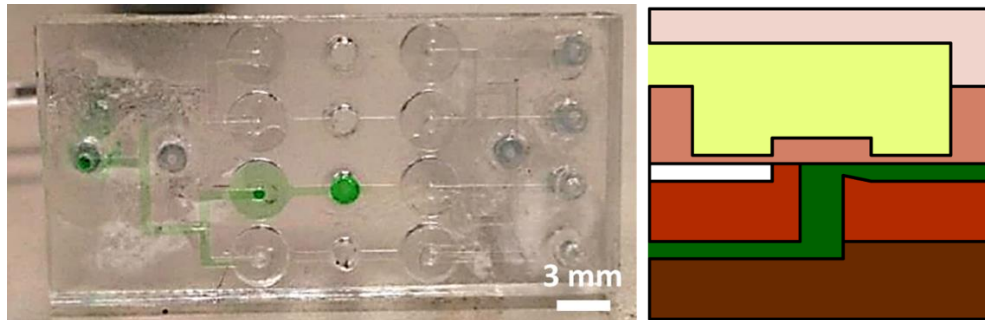
En la **Figura 38** se esquematiza un corte transversal del comportamiento esperado del dispositivo una vez cerrada la válvula. La entrada de presión por el canal de control provoca que la membrana de acrílico obstruya el canal de flujo, cerrando así la válvula e impidiendo el flujo hacia la cámara central.



**Figura 38.** Corte transversal de válvula de acrílico mostrando esquema de cierre adecuado.

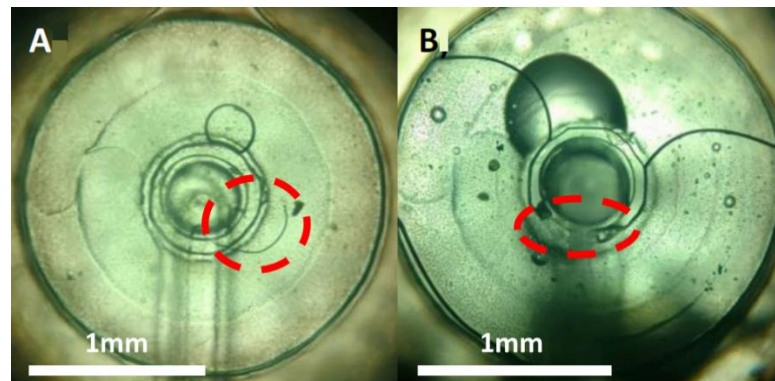
Sin embargo, en la **Figura 39** se muestra el comportamiento real del dispositivo debido a la presencia de una fuga, la cual se esquematiza igualmente mediante un corte transversal de la válvula de acrílico. En el esquema se muestra la válvula cerrada debido a la entrada de presión, pero a

diferencia del cierre mostrado en la **Figura 38**, aquí se observa una fuga de colorante por el canal hacia la cámara central debido a que la pared del asiento de la válvula está destruida.



**Figura 39.** Fotografía de dispositivo con una fuga de colorante verde a través de una sola válvula y esquema de corte transversal de válvula cerrada con presencia de una fuga. De la parte superior a la parte inferior, los colores en el esquema de la válvula representan las capas de control (crema), de membranas (naranja), de flujo superior (rojo), y de flujo inferior (marrón); la presión de control se esquematiza con color amarillo y el flujo de colorante con color verde.

Las fotografías de la **Figura 40** corroboran el esquema de fuga mostrado. Se puede observar que una ruptura en el asiento para la válvula de acrílico es la causante del mal sellado de la válvula durante su cierre. De la misma manera, basuras atrapadas en la misma zona pueden afectar este cierre y provocar eventuales fugas. Ambas condiciones resultan ser poco controlables, en particular la de la ruptura del asiento dada su fragilidad al momento de llevar a cabo el proceso de sellado de capas para el ensamblado de los dispositivos.

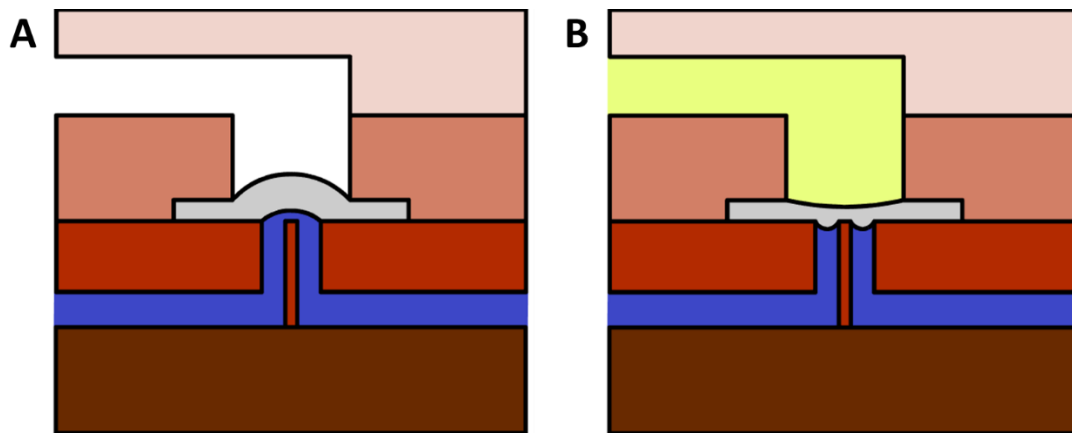


**Figura 40.** Daños señalados en las válvulas de acrílico debido a A) basuras en la región de cierre de la válvula y B) ruptura del asiento que permite su correcto sellado.



De modo que el siguiente prototipo propuesto consistió en la sustitución de las membranas de acrílico por membranas de PDMS y en un rediseño de la válvula para garantizar su adecuado funcionamiento, el cual fue previamente mostrado en el esquema de la Figura 19. Si bien antes se mencionó que el uso de un polímero adicional para integrarse en el dispositivo podría implicar un aumento en el tiempo de fabricación, las bondades del PDMS como elastómero resistente a altas temperaturas lo hacen un candidato idóneo para su uso en aplicaciones como la PCR.

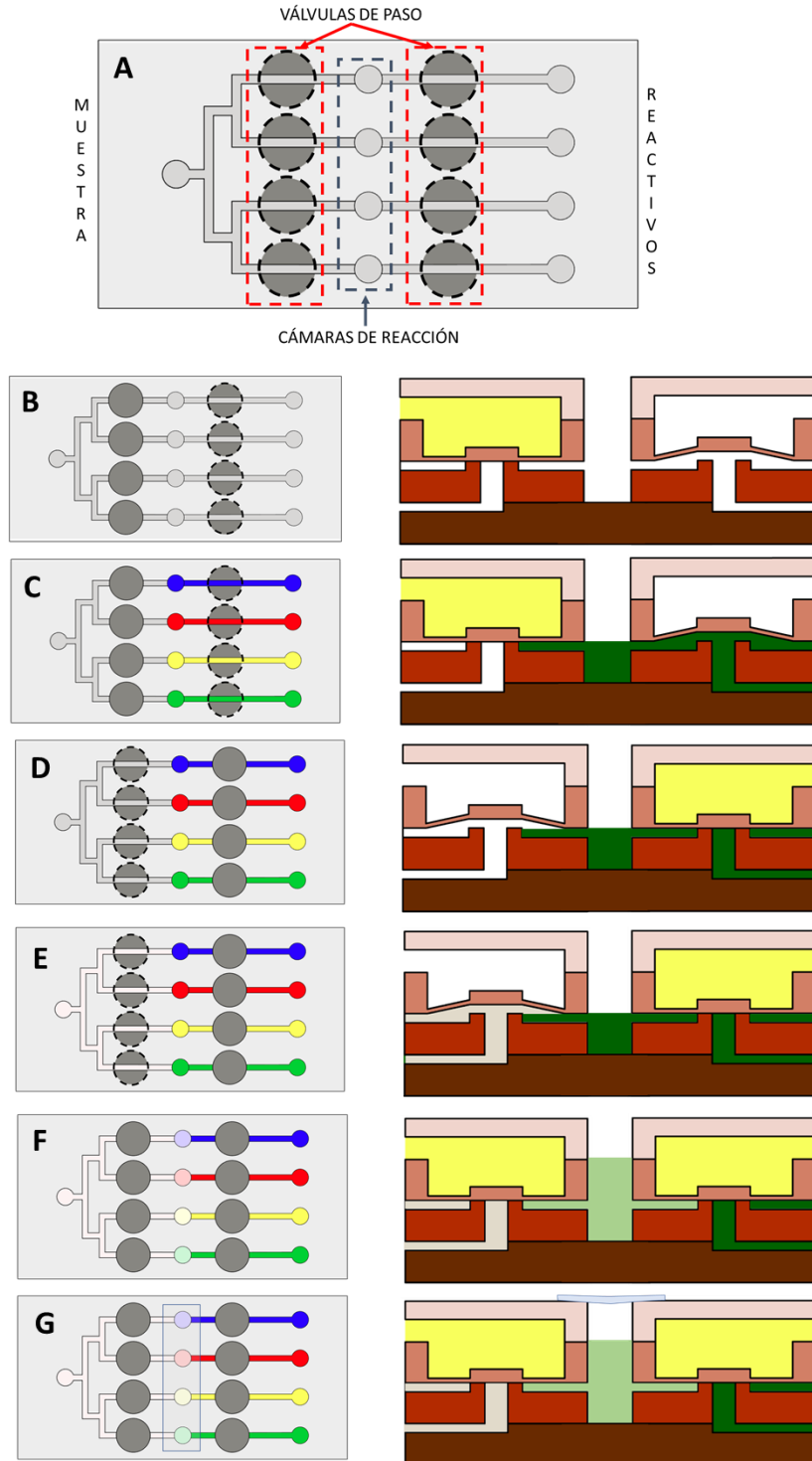
En la **Figura 41** se muestran los esquemas de apertura y cierre de las válvulas de PDMS, cuyo funcionamiento fue detallado en la **Figura 17**. Brevemente, la entrada a presión constante del colorante azul provoca la apertura de la válvula (**Figura 41A**), mientras que su cierre se produce al aplicar una mayor presión de control (**Figura 41B**). Se resalta el hecho de que, al ser ahora el flujo en la misma dirección que el desplazamiento de la válvula, la membrana corre menos riesgo de desplazarse erróneamente desde su correspondiente asiento hacia alguna dirección no deseada o inesperada.



**Figura 41.** Corte transversal de esquemas de A) apertura y B) cierre de la válvula de PDMS. De la parte superior a la parte inferior, los colores en el esquema de la válvula representan las capas de control (crema), de válvulas (naranja), y de flujo (rojo), así como la tapa inferior (marrón); la presión de control se esquematiza con color amarillo y el flujo de colorante con color azul.

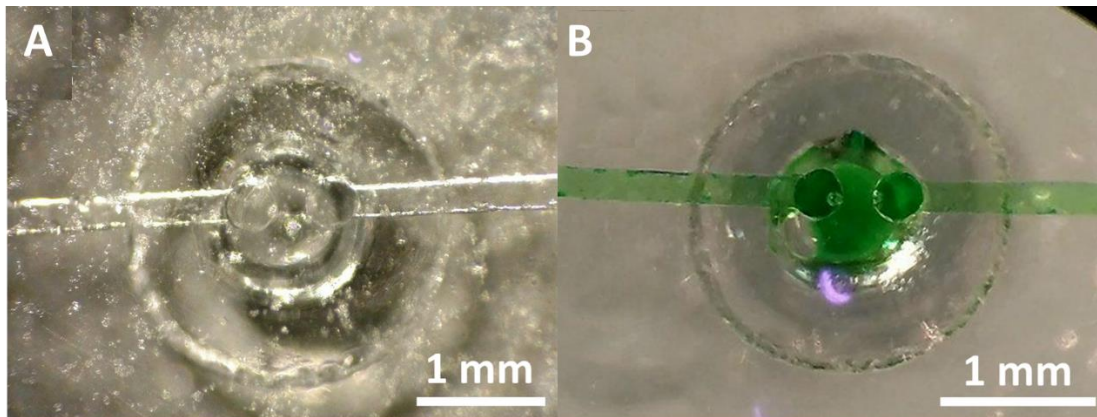
Cabe recordar que para este diseño de válvulas se plantearon dos versiones de dispositivos. El primero de ellos fue la versión completa, similar al de válvulas de acrílico, es decir, con 8 válvulas de paso repartidas en dos series de 4 válvulas, cada una a un lado del pozo central. Por lo que para llevar a cabo la caracterización con colorantes se hicieron las pruebas que a continuación se describen.

Para comenzar, el esquema de funcionamiento de la versión completa se muestra en la **Figura 42**. Brevemente, se tiene por un lado la entrada para la muestra a través de un árbol de canales, mientras que por el otro lado hay 4 entradas independientes que permiten la incorporación de reactivos para detectar hasta 4 diferentes secuencias de interés de manera paralela. La salida común se encuentra en los pozos/cámaras centrales, los cuales a su vez son aislados una vez que las válvulas de paso son activadas (**Figura 42A**). El llenado del dispositivo es como sigue: se activan las válvulas de muestra (**Figura 42B**), impidiendo que el flujo de reactivos llegue hasta el árbol de canales, quedándose en las cámaras de reacción (**Figura 42C**). A continuación, las válvulas de reactivos son activadas, mientras que las de muestra son abiertas (**Figura 42D**), permitiendo que esta fluya a través del árbol de canales hasta las cámaras centrales y se mezcle con los diferentes reactivos de manera independiente (**Figura 42E**). Finalmente, las válvulas de mezcla son nuevamente activadas (**Figura 42F**), y una cinta térmica transparente es colocada sobre las cámaras de reacción, aislándolas por completo del resto del dispositivo y del exterior (**Figura 42G**).



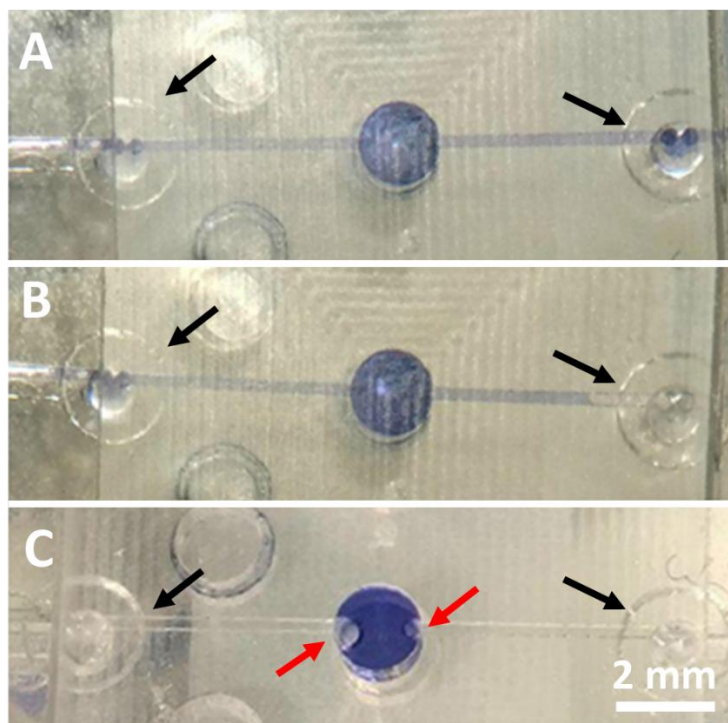
**Figura 42.** Esquema de funcionamiento de dispositivo con válvulas de acrílico y con válvulas de PDMS en su versión completa. A) Entradas del microdispositivo y estructuras principales. B) Cierre de válvulas de muestra y apertura de válvulas de reactivos. C) Entrada de reactivos. D) Cierre de válvulas de reactivos y apertura de válvulas de muestra. E) Entrada de muestra y mezcla de muestra y reactivos en cámaras de reacción. F) Cierre de válvulas de muestra. G) Sellado de cámaras de reacción con cinta térmica transparente. Las vistas transversales ejemplifican sólo una de las cámaras de reacción.

La primera prueba con colorantes consistió en verificar el correcto flujo a través de la válvula, por lo que las fotografías de la **Figura 43** muestran su estado cerrado (activado por presión) y posteriormente abierto (debido a la no activación de la válvula y a la entrada del colorante a presión constante).



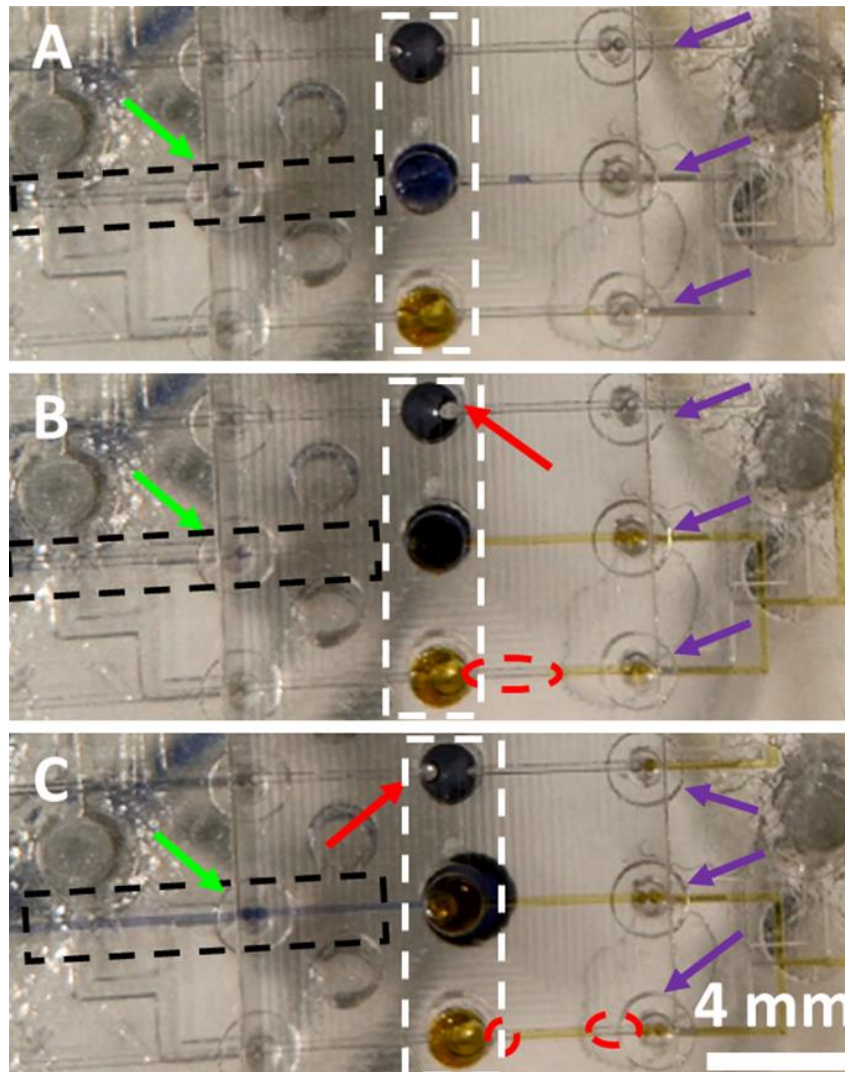
**Figura 43.** Fotografía de válvula de PDMS en su estado A) cerrado y B) abierto.

Posteriormente, para verificar que el flujo a través de todo un canal (a ambos lados de la cámara), así como la activación de las dos válvulas presentes podían llevarse a cabo sin inconvenientes, se realizó la prueba mostrado en las fotografías de la **Figura 44**. Primeramente, el flujo con colorante azul a presión constante (5 psi) cuando ambas válvulas no eran activadas, permitió el correcto llenado de la cámara de reacción (**Figura 44A**). A continuación, la activación de la válvula del lado derecho (40 psi) (**Figura 44B**), seguida de la del lado izquierdo (**Figura 44C**), permitió el completo aislamiento de la cámara central. Sin embargo, un inconveniente observado por primera vez en estos experimentos se aprecia en la última figura: la generación de burbujas en el canal de flujo (flechas rojas) provenientes desde el canal de control y debido a la presurización con aire, las cuales son capaces de atravesar la membrana de PDMS debido a su porosidad.



**Figura 44.** Fotografías de cámara de reacción y válvulas de un mismo canal. A) Apertura de ambas válvulas y llenado de la cámara. B) Cierre de válvula del lado derecho. C) Cierre de válvula del lado izquierdo y aislamiento de la cámara. Sin embargo, las flechas rojas indican la presencia de burbujas. Las flechas negras señalan la ubicación de las válvulas a ambos lados de la cámara de reacción.

Por último, se mencionó que con el arreglo experimental mostrado en la **Figura 28** era posible incorporar dos diferentes muestras de manera simultánea. Por lo que las fotografías de la **Figura 45** ejemplifican la entrada de la muestra hacia el dispositivo por el árbol de canales (colorante amarillo), así como la de un reactivo a través de un canal independiente (colorante azul).



**Figura 45.** Entrada de colorante azul y amarillo a través de una entrada independiente de reactivos y el árbol de canales de muestra, respectivamente. A) Cierre de las válvulas a ambos lados de la cámara de reacción, por lo que no hay flujo de colorantes. B) Apertura sólo de las válvulas de muestra y entrada del colorante amarillo. C) Apertura de las válvulas de reactivos y cierre de las de muestra para entrada del colorante azul por un único canal independiente, produciéndose el mezclado de ambos colorantes en la cámara de reacción. Los señalamientos rojos indican la presencia de burbujas, los blancos muestran las cámaras de reacción, y los negros denotan el canal independiente sin y con colorante azul (canal de reactivo). Las flechas púrpuras señalan las válvulas de muestra, y las verdes la válvula de reactivo.

En este ejemplo, tres diferentes cámaras ya habían sido previamente cargadas de manera manual con una jeringa, sin embargo, el flujo a través de cada lado de estas indica la entrada de colorante por uno u otro lado del dispositivo. El canal independiente (entrada individual de reactivo) por donde se hizo fluir el colorante azul corresponde al de en medio de cada fotografía.

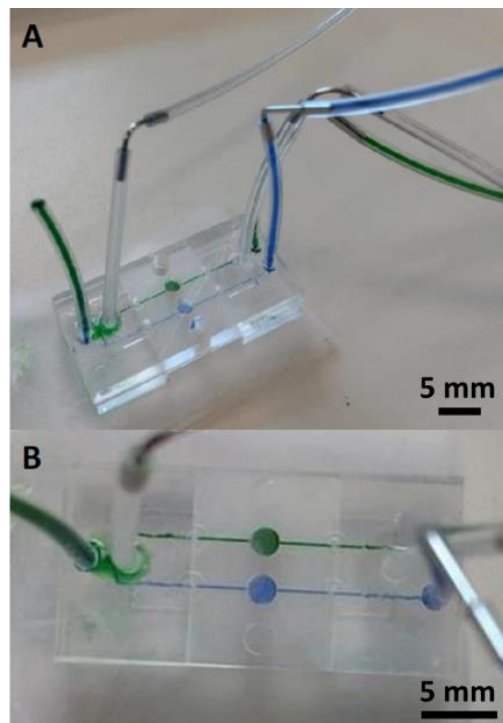
Al inicio, ambas válvulas se encontraban cerradas, de modo que no se observa colorante en ningún lado del canal (**Figura 45A**). A continuación, la apertura conjunta de las válvulas de muestra permitió la entrada del colorante amarillo hacia las cámaras (**Figura 45B**), sin embargo, se puede apreciar que la presencia de burbujas afecta su llenado simultáneo, ya que provocan un aumento en la resistencia del canal. Finalmente, el colorante azul es introducido a través de un único canal de reactivo cuando las válvulas correspondientes son desactivadas, mientras que las de muestra vuelven a ser cerradas (**Figura 45C**), lo que provoca un mezclado de ambos colorantes en la cámara de reacción.

Finalmente, se llevó a cabo el diseño de la versión simplificada del dispositivo con válvulas de PDMS debido a que el uso de múltiples válvulas provocaba variabilidad en el desempeño de la versión completa en cuanto al llenado simultáneo de las cámaras de reacción, o incluso la posibilidad de que alguna de ellas no se llenara. En las fotografías de la **Figura 45** se muestran únicamente 3 de los 4 canales debido a que el cuarto había presentado la ruptura de una de las válvulas. Esta ruptura se debió, en parte, a la variación de tamaños de estructuras, previamente ejemplificada en las mediciones de las membranas de acrílico (**Tabla 6**), ya que en el proceso de micromaquinado no siempre son controlables los parámetros de profundidad, lo que eventualmente puede comprometer a las estructuras delgadas. Además, dado que la contaminación es un factor importante por considerar en los ensayos de PCR, el hecho de que las cámaras del dispositivo se encuentren abiertas durante su llenado, así como la posterior colocación manual de la cinta térmica, resultan ser una condición de riesgo que puede ser evitada si dichas cámaras se encuentran selladas desde el inicio del experimento.

De modo que, como se detalló en el esquema de la **Figura 19**, la versión simplificada del dispositivo con válvulas de PDMS posee únicamente dos canales con entradas independientes y una salida común, pensados para

introducir simultáneamente una muestra a detectar y una muestra control, ambas preparadas antes de incorporarse al dispositivo. Además, dado que las cámaras de reacción se encuentran selladas (no hay salida común en el centro del dispositivo), el flujo a través de los canales sólo es posible mediante la apertura de las válvulas a ambos lados de las cámaras. Sin embargo, el posterior cierre de las válvulas permite igualmente el aislamiento de ambas muestras en sus respectivas cámaras previo al inicio de los ensayos.

Por lo tanto, la **Figura 46** muestra la caracterización del dispositivo con colorantes azul y verde, cada uno de ellos representado a un tipo de muestra (con y sin cDNA). Se puede observar como ambos canales se encuentran completamente llenos sin contaminación entre sí, además de que la incorporación de líquido a los canales de control evita la presencia de burbujas. Las fotografías fueron tomadas una vez que las válvulas habían sido cerradas, puesto que no hay flujo a través de la manguera conectada a la salida común.



**Figura 46.** Caracterización con colorantes de versión simplificada de dispositivo con válvulas de PDMS. A) Vista trimétrica, se observan las conexiones a las entradas de flujo (con colorantes) y de control (con aire). B) Vista superior, se aprecia el correcto llenado tanto de los canales como las cámaras.

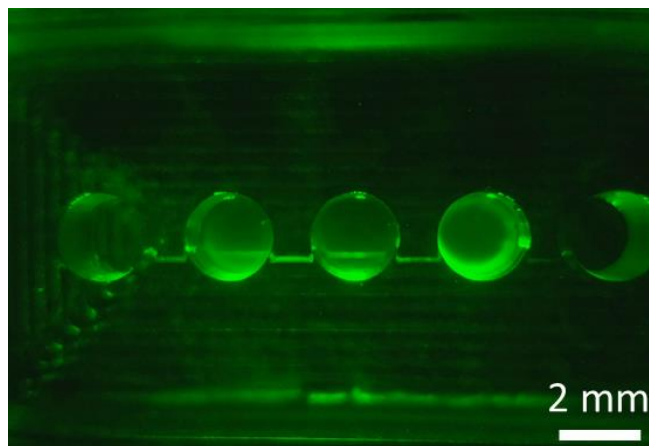


### 6.3. Optimización del termociclador portable

El termociclador portable en el que se basó este trabajo fue desarrollado por Mendoza-Gallegos, *et al.* [17] siendo sus resultados obtenidos un antecedente directo al planteamiento inicial del proyecto. Inicialmente, se tuvieron dificultades para realizar las amplificaciones en los pozos, lo que motivó a realizar una serie de modificaciones y optimizaciones al sistema portable. A continuación, se detallan las condiciones iniciales observadas en la caracterización óptica y térmica del termociclador, las cuales limitaban su desempeño, así como las estrategias llevadas a cabo para darles solución.

#### 6.3.1. Mejoras ópticas

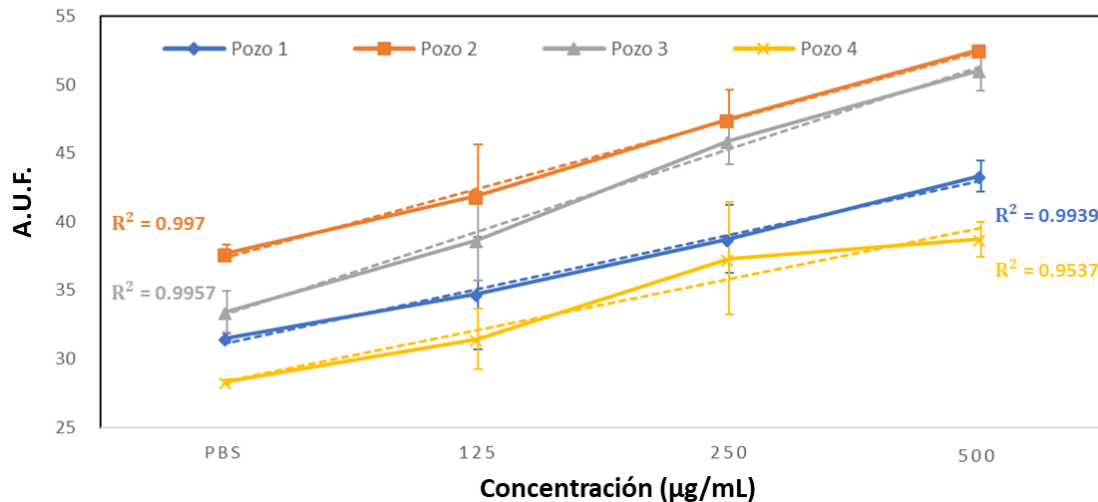
En primer lugar, en la **Figura 44** se presenta una imagen de fluorescencia de un dispositivo de pozos con solución de fluoresceína (FITC) a diferentes concentraciones. La fotografía fue tomada directamente con la cámara integrada al termociclador portable (i.e. Raspberry Camera Module v2), la cual posee un sensor RGB-CMOS de 8.08 Megapíxeles (IMX219, Sony) y un filtro paso-banda óptico ( $520\pm 10$  nm, Wratten #58) colocado de manera manual entre el sensor y la lente de la cámara [17].



**Figura 44.** Imagen de fluorescencia de solución de FITC a diferentes concentraciones en un chip de pozos dentro del termociclador portable. De izquierda a derecha, los valores de concentración son los siguientes: PBS (control), 62.5, 31.25 y 500 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el quinto pozo está vacío. No se perciben diferencias en cuanto al nivel de brillo de cada pozo.

A partir de diferentes arreglos de muestras de FITC como el mostrado en la figura anterior, en los que gotas de 4  $\mu\text{L}$  con concentración de 500, 250 y 125  $\mu\text{g/mL}$  fueron intercambiadas entre los pozos, se realizó primeramente una curva de calibración de fluorescencia, la cual se muestra en la **Figura 45**.

### Curvas de calibración de FITC por pozo



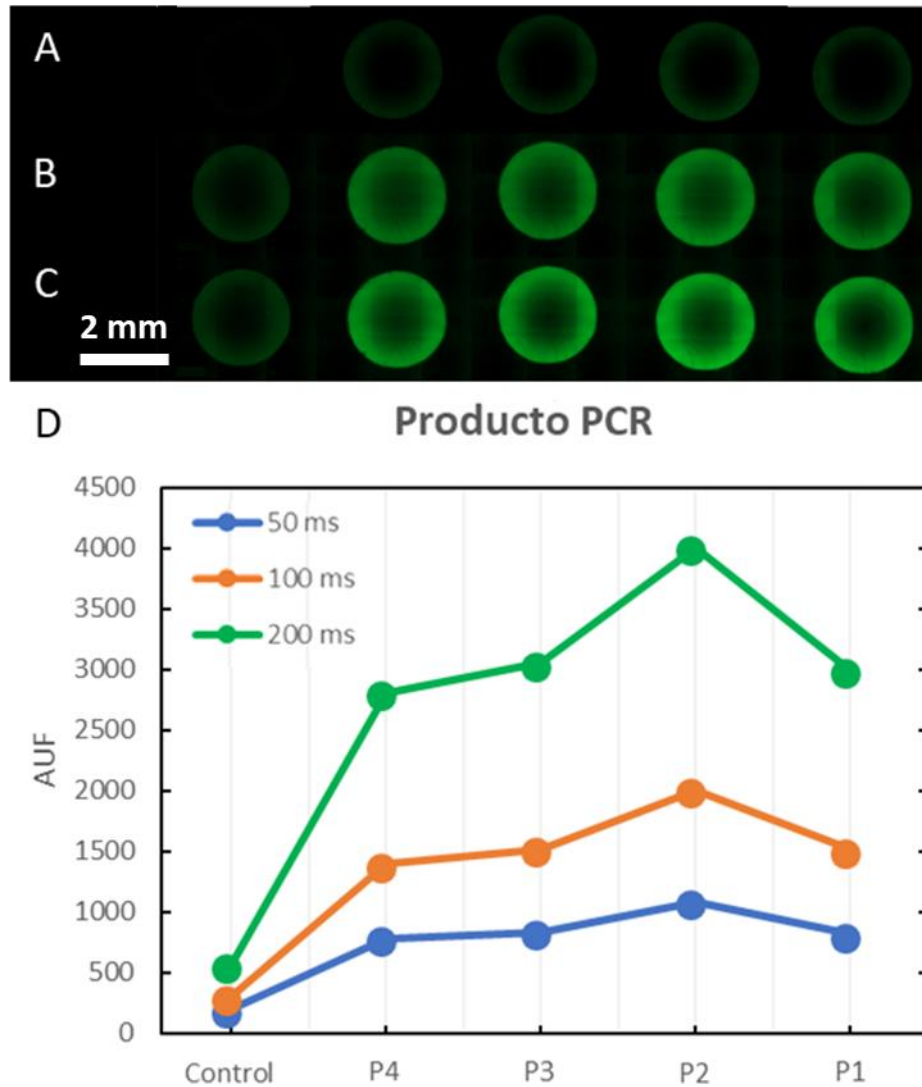
**Figura 45.** Intensidad de fluorescencia para muestras de FITC en diferentes posiciones dentro de un chip de pozos. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con 100 ms de tiempo de exposición.

En la **Figura 45** se grafica el nivel de fluorescencia emitida (*eje y*) por soluciones de FITC a diferentes concentraciones (*eje x*). Cada punto de cada curva representa el promedio de tres mediciones realizadas (i.e. para cada diferente concentración) en diferentes dispositivos, y se grafica con su correspondiente desviación estándar. Cada curva, a su vez, representa la intensidad de fluorescencia medida para diferentes concentraciones de FITC en el mismo pozo. Al etiquetar los pozos mostrados en la **Figura 44** del 1 al 4, de izquierda a derecha, se puede observar que los Pozos 2 y 3 reciben una mayor excitación por parte del LED azul, mientras que lo contrario sucede con los Pozos 1 y 4, lo cual puede deberse a que, como se observa en el esquema original del termociclador de la **Figura 12**. El LED radia de manera lateral a los pozos, siendo los pozos centrales los que reciben una mayor cantidad de luz debido a este diseño. Pese a ello, la tendencia de todos los pozos fue similar,

esto es, la muestra más concentrada de FITC siempre se observó con mayor nivel de fluorescencia, así como la menos concentrada presentó siempre una menor intensidad.

Ahora bien, se intuyó que los niveles de fluorescencia medidos no eran lo suficientemente bajos como para detectar el fluoróforo que sería utilizado con el cDNA almacenado. Se supuso esto debido a que las concentraciones de FITC graficadas anteriormente eran incluso percibidas a simple vista sin la necesidad de ser excitadas. En contraste, el producto de PCR obtenido de los ensayos realizados previamente en el termociclador comercial era incoloro a ojo humano, y, por tanto, sólo podía diferenciarse al ser excitado con una lámpara de fluorescencia.

Por lo tanto, en un chip de pozos se colocaron gotas de 4  $\mu$ L del producto de PCR (P1, P2, P3 y P4) generado a partir de las D1, D2, D3 y D4 del ensayo de qPCR realizado y mostrado en la **Figura 33**, cuyos valores de concentración inicial corresponden a la muestra “3” descrita en la **Tabla 3**. El dispositivo a continuación fue colocado en un microscopio invertido (Axio Observer A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH) con un objetivo de 20X, y las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas utilizando diferentes tiempos de exposición. Los resultados de las imágenes captadas y las gráficas de sus correspondientes niveles de fluorescencia se muestran en la **Figura 46**.

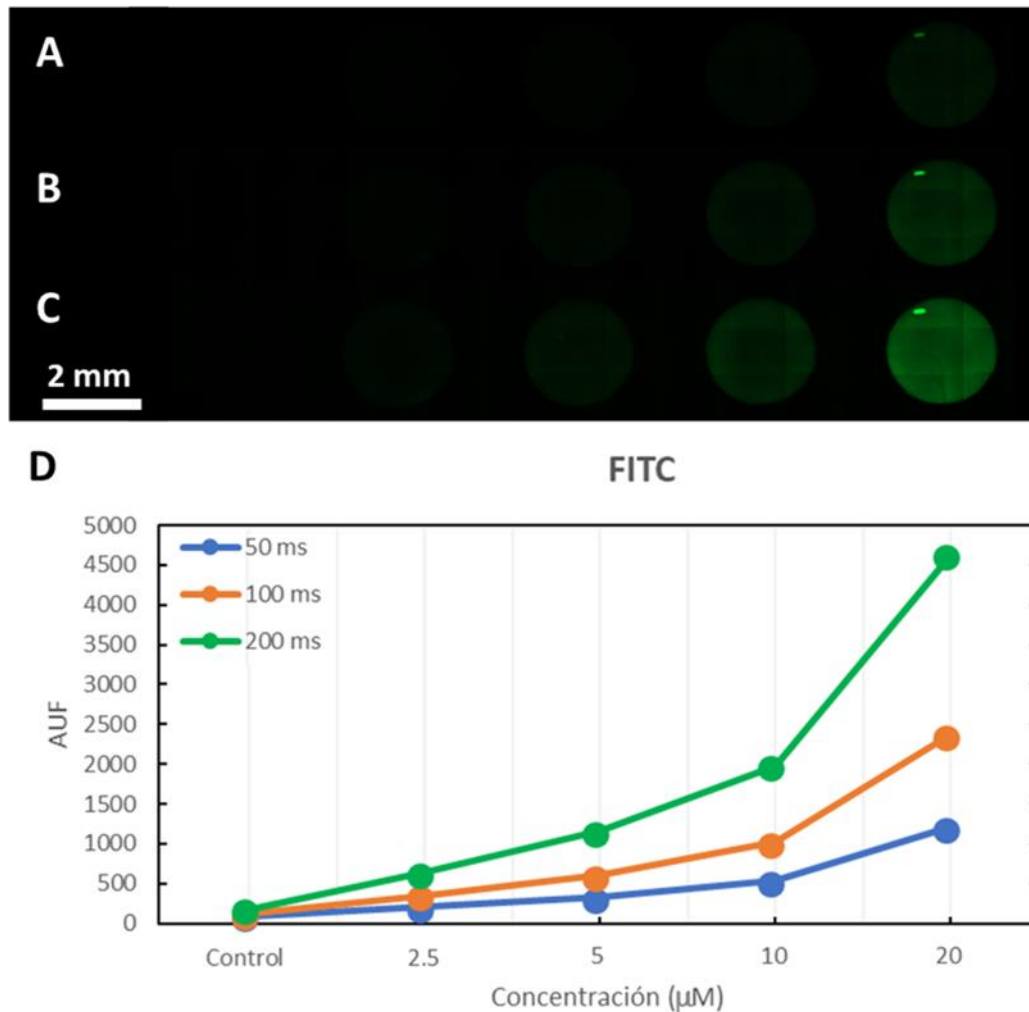


**Figura 46.** Intensidad de fluorescencia a diferentes tiempos de exposición para el producto de PCR de un ensayo previamente realizado. A), B) y C) muestran las imágenes de fluorescencia captadas a 50, 100 y 200 ms de tiempo de exposición, respectivamente, de los productos de PCR contenidos en un chip de pozos. D) Gráfica comparativa del nivel de fluorescencia de cada producto de PCR a los diferentes tiempos de exposición. P1 corresponde al producto generado a partir de D1 (238.88 ng/μL), de la misma manera con P2, P3 y P4, respecto a D2 (47.78 ng/μL), D3 (9.56 ng/μL) y D4 (1.91 ng/μL). El control corresponde a una solución de PBS.

En la gráfica anterior se muestra el nivel de fluorescencia en el *eje* y para cada producto de PCR generado a partir de su correspondiente dilución (*eje x*), y se compara entre diferentes tiempos de exposición, los cuales muestran la misma tendencia. Resalta el hecho de que el producto de la segunda dilución posee la mayor intensidad de fluorescencia, por lo que tuvo una mayor

amplificación que, incluso, la dilución más concentrada. Esto último, sin embargo, pudo deberse a que el volumen de cDNA era mayor en la mezcla para PCR preparada con la dilución 2. En otras palabras, al haber una mayor cantidad de moléculas de cDNA disponibles en dicha mezcla (pese a que la concentración de cDNA era menor que en la mezcla con la dilución 1), la cantidad de cDNA obtenido al final de la amplificación fue mayor, lo que se refleja en la mayor intensidad de fluorescencia observada. Sin importar la dilución utilizada, un mayor o menor volumen de cDNA en una mezcla para PCR se produce de manera accidental durante el proceso de pipeteo y preparación de dicha mezcla.

A continuación, se buscó determinar qué valor de concentración de FITC era equiparable a las mediciones de nivel de fluorescencia que el producto de PCR había mostrado. Lo anterior permitió, a su vez, determinar la diferencia de intensidad de fluorescencia detectable entre la concentración mínima de FITC observada en el termociclador portable (**Figura 45**) y el límite de detección mínimo necesario para observar las muestras de cDNA (**Figura 46**). La fluoresceína (FITC) tiene una emisión máxima a 518 nm, por lo que sus mediciones son equiparables a las del fluoróforo 6-FAM [17] utilizado en los ensayos de qPCR. Por lo tanto, diferentes concentraciones de FITC fueron preparadas, y medidas de la misma manera que el producto de PCR, hasta encontrar aquellas con una intensidad de fluorescencia similar. En la **Figura 47** se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 47.** Intensidad de fluorescencia a diferentes tiempos de exposición para soluciones de FITC a diferentes concentraciones. A), B) y C) muestran las imágenes de fluorescencia captadas a 50, 100 y 200 ms, respectivamente. D) Gráfica comparativa del nivel de fluorescencia de cada dilución a los diferentes tiempos de exposición. El control corresponde a una solución de PBS.

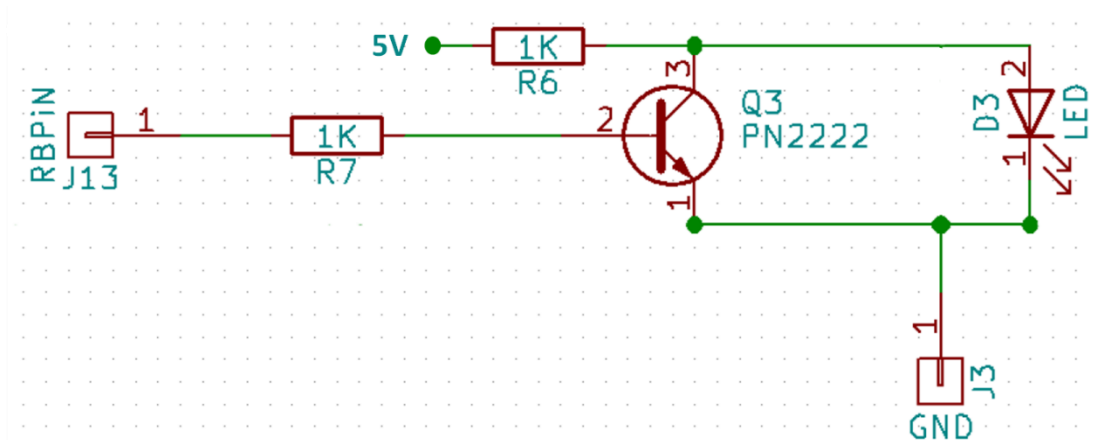
Al comparar las gráficas de las **Figuras 46 y 47**, se observa que concentraciones de FITC entre 20 y 10 µM presentan una intensidad de fluorescencia equiparable al producto de PCR. Dado que, en el producto de PCR, el valor mínimo de AUF es de 781 (P4 a 50 ms) . Mientras que el valor de AUF para 10 µM de FITC a 50 ms es de 532. Estos valores tienen a su vez una tendencia similar a tiempos de exposición mayores.

El valor mínimo de concentración de FITC que hasta el momento había sido detectado por el termociclador portable era el mostrado en la gráfica de la

**Figura 45**, esto es, 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o 321  $\text{mM}$ , es decir, 4 órdenes de magnitud por encima de lo requerido. Por lo tanto, en este punto se planteó el objetivo de lograr realizar una curva de calibración con FITC en el termociclador portable en el rango de la **Figura 47**, de modo que el producto PCR fuera detectable.

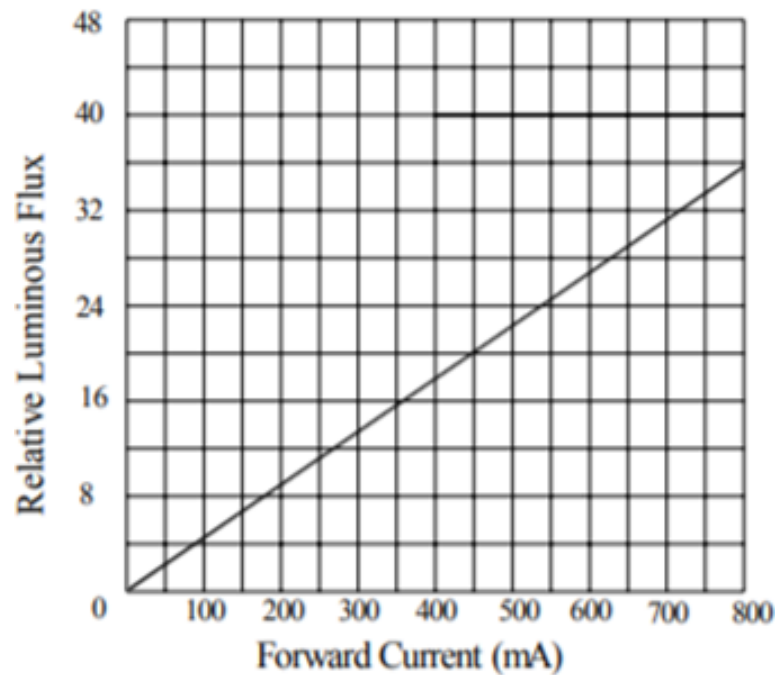
Se retiró el filtro de plástico colocado entre el sensor y la lente de la cámara del termociclador portable, y se incorporó el 'set' de filtros comerciales 38 HE de la marca Zeiss (489038-9901-000). Este 'set' está compuesto por un filtro de emisión (BP 525/50) y uno de excitación (BP 470/40), los cuales permiten únicamente el paso de luz verde y azul, respectivamente. Estos filtros son empleados en microscopía de fluorescencia, por lo que se esperaba que fueran capaces de reducir o eliminar cualquier ruido fluorescente.

Por otro lado, se mejoró la configuración electrónica con la que era utilizado el circuito original del LED del termociclador, la cual se muestra en la **Figura 48**. Originalmente el LED estaba conectado entre el colector y el emisor del transistor ("Q3" en el esquemático de la **Figura 48**), por lo que la corriente que encendía al LED se debía meramente a que había un circuito abierto (i.e. resistencia teóricamente infinita) en el transistor cuando la base de este no era activada (cuando no había señal de activación por la Raspberry). La corriente circulaba únicamente a través del LED debido a que encontraba ahí una menor resistencia, y existía el riesgo de que el transistor se quemara cuando la Raspberry enviaba un pulso de activación al circuito, ya que en ese caso la división de corriente entre el LED y el transistor no era constante (el LED se polariza con valores de corriente entre 0 y 800 mA, **Figura 49**). Además, la resistencia conectada en serie previo al nodo del colector del transistor y el LED ("R6" en el esquemático de la **Figura 48**) no hacía sino disminuir la corriente total que pasaba a través del LED, de tal forma que esta corriente medida experimentalmente fue de apenas 8 mA.



**Figura 48.** Circuito original del LED del termociclador portable. J13 es el pin de activación proveniente de la Raspberry. R7 y R6 son las resistencias de base y de colector, respectivamente, del transistor (Q3).

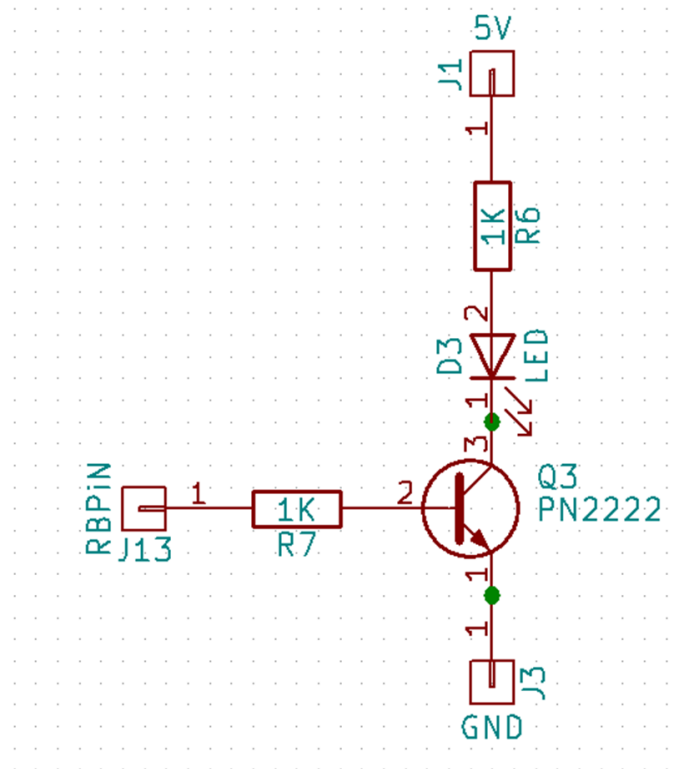
Al observar la gráfica de corriente de polarización del LED azul en la hoja de datos del fabricante (**Figura 49**) se encontró que el valor de corriente medido no era capaz de proporcionar una buena luminosidad relativa.



**Figura 49.** Gráfica de corriente de polarización vs luminosidad relativa en el LED azul utilizado en el termociclador portable. Una mayor corriente provoca una mayor intensidad de luz. Tomada de [36].



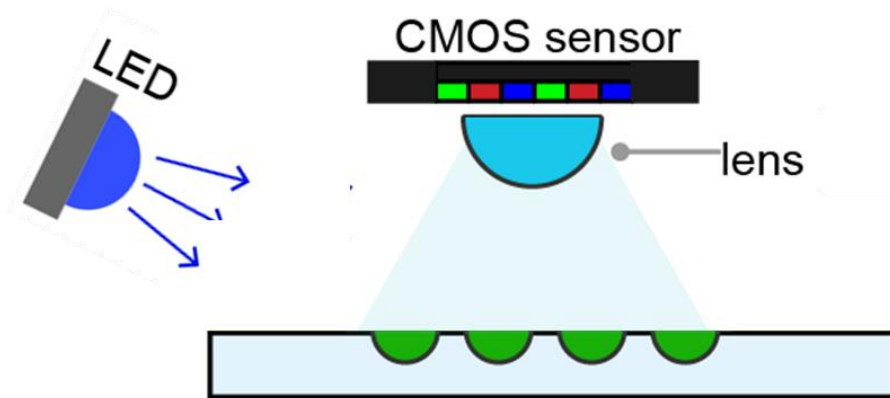
Por lo que se llevó a cabo la modificación al diseño del circuito del LED mostrada en la **Figura 50**. El LED se conectó en una configuración de ‘switch’ debido al transistor, esto es, al conectar el primero al colector y agregando una resistencia de potencia (5 Watts) para disipar el calor generado en el circuito. Con este arreglo fue posible encender o apagar el LED al activar o desactivar la base del transistor, respectivamente. En otras palabras, cuando la señal de la Raspberry es activada (“RBPiN J13” en los esquemáticos de las **Figuras 48** y **50**), el transistor se polariza y permite el paso de corriente a través del LED, provocando su encendido. Si el transistor no se polariza debido a que no hay señal activadora por parte de la Raspberry hacia la base del transistor, la corriente no circula de colector a emisor y, por tanto, tampoco circula a través del LED (no se enciende).



**Figura 50.** Circuito modificado del LED del termociclador portable. J13 es el pin de activación proveniente de la Raspberry. R7 y R6 son las resistencias de base y de colector, respectivamente, del transistor (Q3).

Al colocar una resistencia de base (“R7” en el esquemático de la **Figura 50**) con valor de  $100 \Omega$ , así como la resistencia del LED (“R6” en el esquemático de la **Figura 50**) con valor de  $2.2 \Omega$ , se midió una corriente experimental a través del LED de 355 mA, la cual proporciona una luminosidad relativa aproximadamente 16 veces superior a la que se tenía inicialmente.

Por otro lado, se optó por reubicar el LED dentro del termociclador portable debido a que los pozos del dispositivo recibían una diferente iluminación. Se pasó el LED de iluminar las muestras de forma lateral a una posición superior con una inclinación ajustable, como se esquematiza en la **Figura 51**.

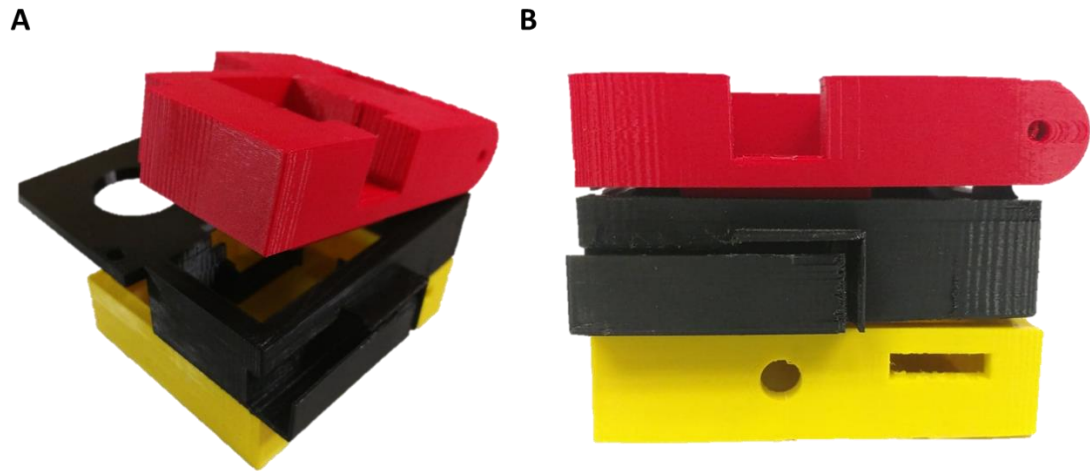


**Figura 51.** Nuevo esquema de iluminación del LED en el termociclador portable. Adaptado de [17].

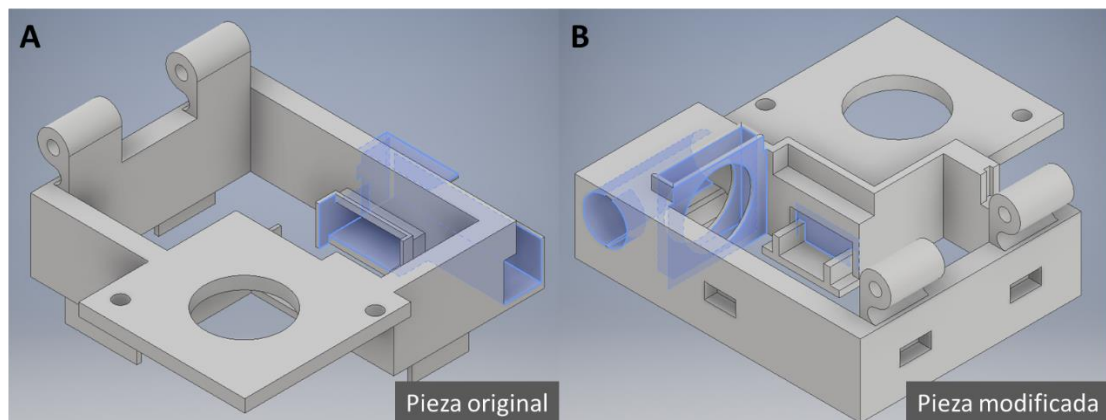
A continuación, para acoplar el ‘set’ de filtros comerciales y el nuevo circuito del LED al termociclador portable, se modificaron las piezas de este y posteriormente se imprimieron usando una impresora 3D Replicator 2 (MakerBot Industries, USA), de modo que los nuevos elementos ópticos y electrónicos se pudieran ajustar de forma exacta al termociclador modificado.

Las fotografías de la **Figura 52** muestran las tres piezas originales que conformaban al termociclador (superior, media e inferior). Los dibujos de la pieza media del termociclador portable mostrados en la **Figura 53** resaltan tanto la posición original que ocupaba el LED (a un costado de la parte central)

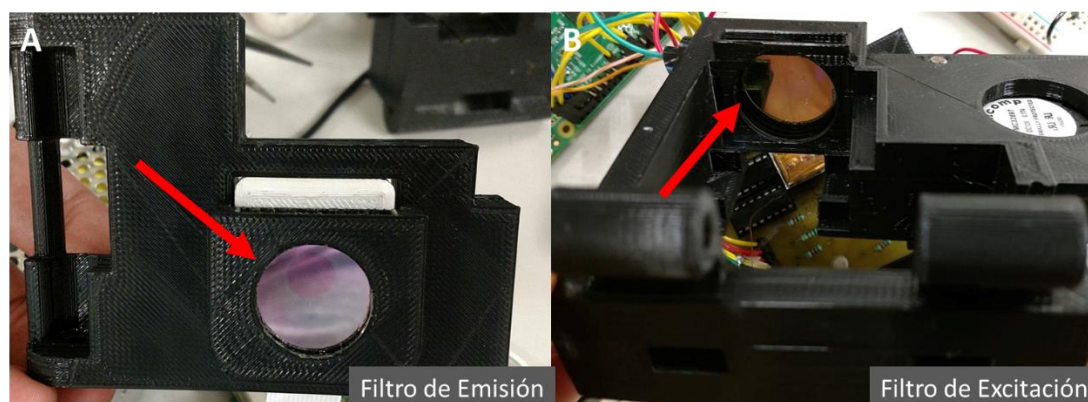
en la pieza original, así como la nueva posición (de frente a la parte central) en la pieza modificada, la cual se esquematizó también en la **Figura 51**. Por último, las fotografías de la **Figura 54** muestran los filtros de emisión y excitación comerciales colocados en la pieza superior y media modificadas, respectivamente, una vez hechas las adaptaciones correspondientes.



**Figura 52.** Fotografías de piezas originales de termociclador portable. Cada pieza se imprimió de un color diferente para su mayor distinción: Pieza superior (rojo), pieza media (negro), y pieza inferior (amarillo). A) Vista trimétrica. B) Vista lateral.

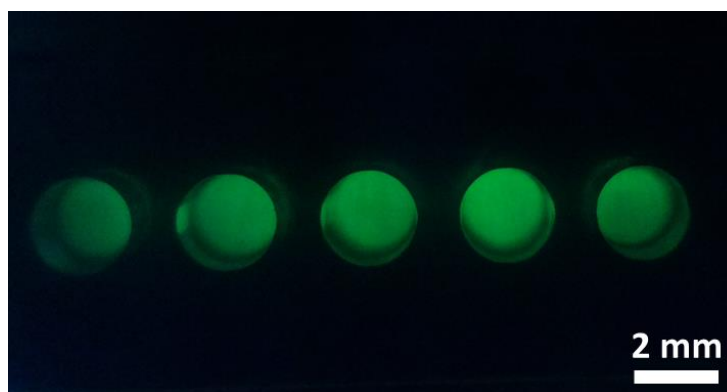


**Figura 53.** Dibujos tridimensionales de la pieza media del termociclador portable. A) Pieza original con espacio para LED lateral de la posición del microdispositivo. B) Pieza modificada con espacio para LED de frente a la posición del microdispositivo.



**Figura 54.** Fotografías de las piezas superior y media del termociclador portable una vez adaptadas para contener los filtros de emisión y excitación. A) El filtro de emisión se ubica justo por debajo de donde se posiciona la cámara. B) El filtro de excitación se encuentra frente a la nueva posición del LED.

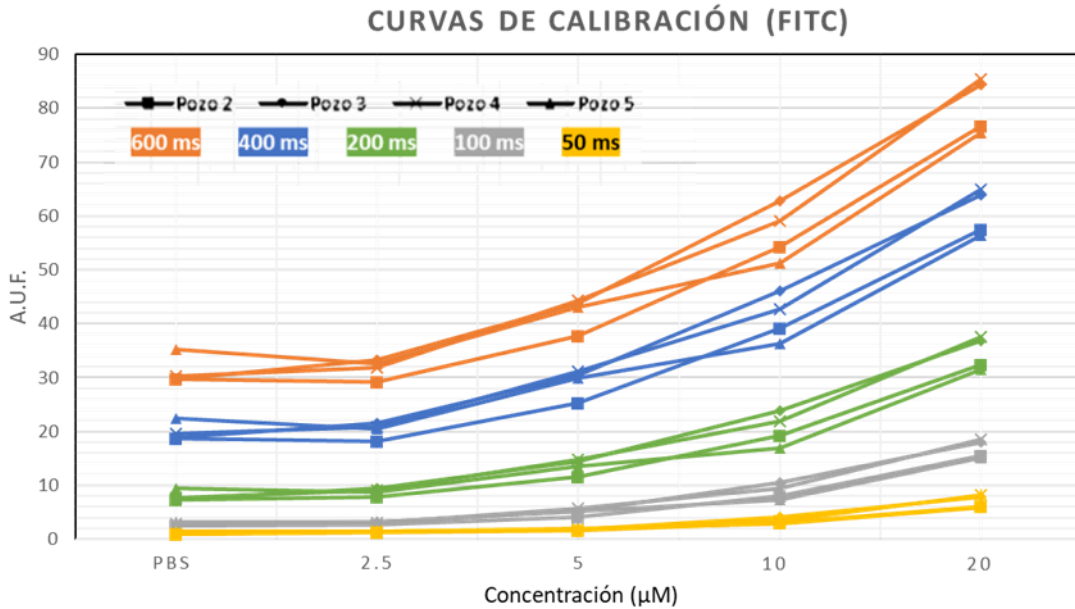
Una vez implementadas todas las modificaciones previamente descritas, se obtuvo la imagen de fluorescencia de la **Figura 55**. La muestra contenida en los pozos corresponde a una solución de FITC de  $20 \mu\text{M}$ . Al comparar esta imagen con la de la **Figura 44** se aprecia no sólo una disminución del ruido de fluorescencia, sino también una mayor homogeneidad en la iluminación de los pozos. Además de que el LOD del sistema óptico mejoró notablemente.



**Figura 55.** Imagen de fluorescencia de solución de FITC a  $20 \mu\text{M}$  una vez modificado el sistema óptico.

Por último, se llevó a cabo una nueva curva de calibración de FITC en el termociclador portable haciendo uso de soluciones de FITC con las mismas concentraciones que las usadas en las mediciones con el microscopio invertido. En la gráfica de la **Figura 56** se muestran nuevamente las curvas de

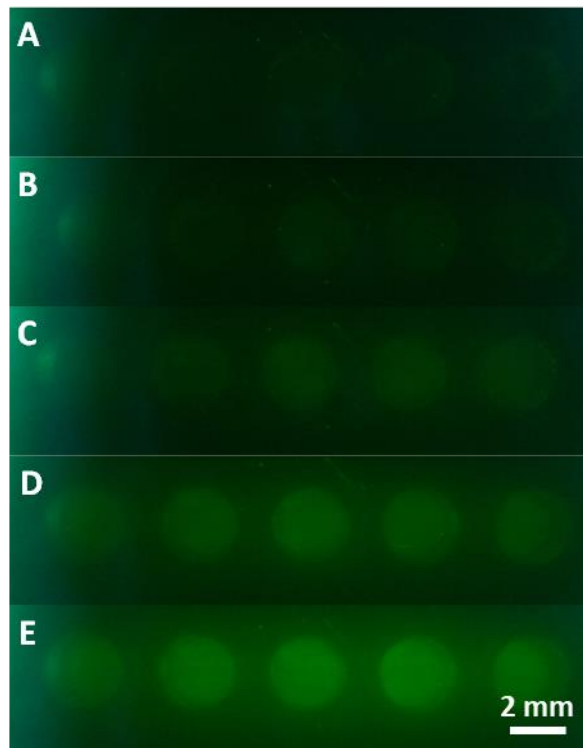
calibración de cada pozo del dispositivo, agrupadas por color de acuerdo con los diferentes tiempos de exposición utilizados para realizar las mediciones.



**Figura 56.** Intensidad de fluorescencia para diluciones de FITC en diferentes posiciones en un chip de pozos. Las mediciones se realizaron para tiempos de exposición desde 50 hasta 600 ms.

En cada dispositivo se colocó la misma concentración de FITC en todos los pozos, por lo que cada punto de la gráfica representa la medición de una concentración determinada de FITC en un solo pozo del dispositivo, y cada curva representa la medición de fluorescencia de diferentes concentraciones de FITC en un mismo pozo. Haciendo un análisis cualitativo, se observa que los valores de intensidad de fluorescencia para cada concentración de FITC son muy similares entre sí, sin importar el pozo en que se encuentren contenidas. De la misma manera, para tiempos de exposición mayores a 200 ms, no parece haber solapamientos de valores de fluorescencia entre pozos para diferentes concentraciones de FITC, lo que habla de una mayor homogeneidad de la luz recibida por cada pozo debido a la nueva posición del LED. Además, sin importar el tiempo de exposición con que se realice la medición, la intensidad de fluorescencia disminuye conforme se disminuye la concentración de FITC, al menos hasta la concentración de 2.5 µM, cuyo nivel

de fluorescencia ya es muy similar al control de PBS. Aun así, se confirma que fue posible aumentar el LOD del sistema más de cuatro órdenes de magnitud. La **Figura 57** representa un caso de la gráfica, las imágenes se tomaron con 400 ms de tiempo de exposición y en ellas se observan las diferentes muestras de FITC colocadas en el total de los pozos.



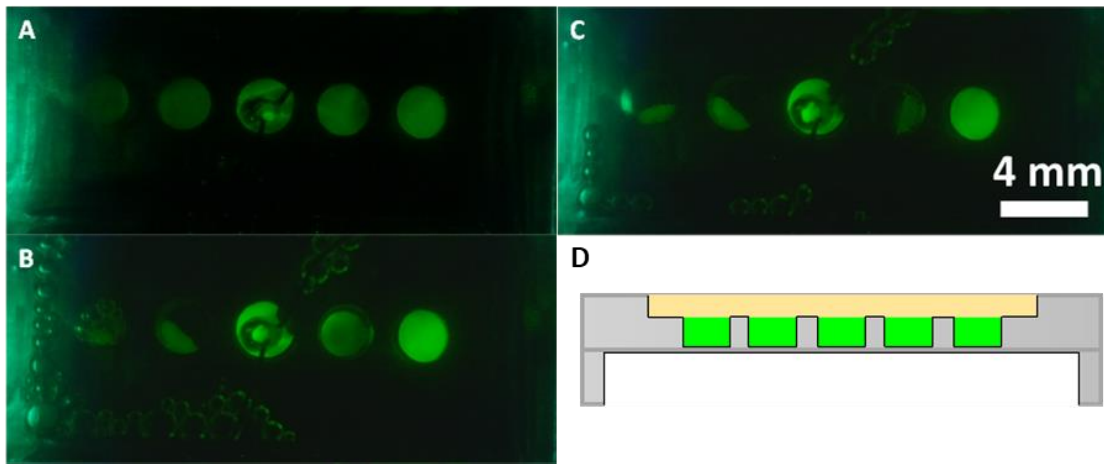
**Figura 57.** Imágenes de fluorescencia de soluciones de FITC a diferentes concentraciones. A) Control (PBS). B) 2.5, C) 5, D) 10 y E) 20 ( $\mu\text{M}$ ). Tiempo de exposición = 400 ms.

### 6.3.2. El problema de la evaporación

Otro problema detectado fue la evaporación de las muestras de FITC contenidas en los pozos una vez iniciado el protocolo térmico. Inicialmente este protocolo era utilizado para simular el ensayo de qPCR y observar si había cambios en el nivel de fluorescencia de las muestras a lo largo del tiempo.

La **Figura 58** muestra una solución de FITC inicialmente intacta, pero durante el transcurso de los 10 primeros ciclos térmicos las muestras en casi todos los pozos se habían evaporado. Este fenómeno, además, era aleatorio,

dado que al repetir los ensayos la evaporación ocurría en diferentes pozos, así como en diferentes ciclos. Era también un problema inesperado, dado que la colocación del aceite mineral por encima de los pozos debía evitar justamente la evaporación de sus contenidos. Al inicio se dejó de usar el ventilador, encargado de disminuir la temperatura en el proceso térmico, pensando que este pudiera desplazar el aceite de su lugar, dejando los pozos descubiertos y facilitando su evaporación. Sin embargo, el problema se siguió presentando.



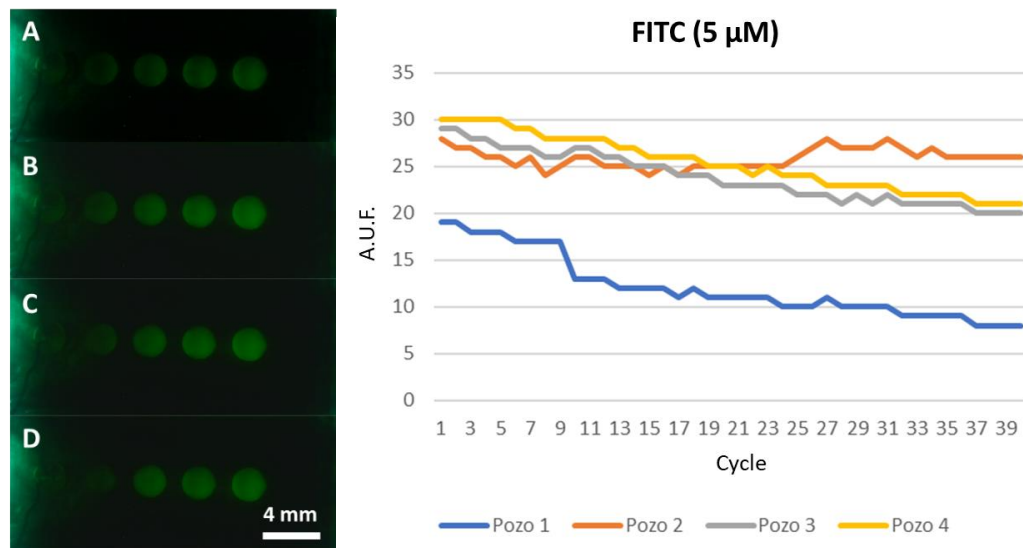
**Figura 58.** Problema de evaporación de muestras en dispositivo de pozos durante el protocolo térmico (el pozo del centro contiene el termistor). A) Inicio del protocolo. B) Fin del ciclo 1. C) Fin del ciclo 10. D) Esquema ideal de dispositivo de pozos cubiertos con aceite.

Por lo tanto, se comenzó a sospechar que el problema podía deberse a la presencia de pequeñas burbujas en el interior de los pozos desde antes de iniciar el protocolo térmico. Las burbujas aumentan su volumen debido al incremento de la temperatura, lo que podía ocasionar una ruptura en la interfaz agua-aceite en el pozo, dejándolo descubierta y, finalmente, favoreciendo la evaporación de su contenido.

Se optó entonces por implementar un tratamiento con plasma de oxígeno, el cual permitiría modificar la superficie del pozo, haciéndola más hidrofílica. El proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: el dispositivo es colocado dentro de una máquina de plasma, la cual es cerrada previa aplicación de

vacío. A continuación, se introduce oxígeno dentro de la máquina, el cual se ioniza y transforma en plasma debido a la combinación de energía y baja presión. Posteriormente, los iones excitados del plasma bombardean la superficie de los pozos, oxidándola y formando grupos hidroxilo en la superficie. Los grupos hidroxilo son polares y, por tanto, son capaces de atraer al agua, lo cual favorece la humectabilidad y adhesividad de la superficie [37].

Las fotografías de la **Figura 59** fueron tomadas durante el protocolo térmico de qPCR mostrado en la gráfica. Las muestras de FITC fueron cargadas en el microdispositivo después de haber sido tratado con plasma de oxígeno.



**Figura 59.** Izquierda: Imágenes de fluorescencia tomadas A) al inicio del protocolo térmico, B) al final del ciclo 1, C) 10 y D) 40. El pozo poco visible en el extremo izquierdo de las imágenes contiene el termistor. El etiquetado de los pozos es de izquierda a derecha a partir del segundo pozo. Derecha: Gráfica de intensidad de fluorescencia para los pozos mostrados en el lado izquierdo.

La gráfica muestra el nivel de fluorescencia medido en cada pozo (*eje y*) a través de cada ciclo del ensayo térmico (*eje x*), donde se observa que al menos uno de los pozos mostró un nivel de fluorescencia relativamente constante (pozo 2). Las fotografías, a su vez, muestran una diferencia evidente con respecto a las de la **Figura 58**, debido a que en este último caso la evaporación parece no haberse presentado en al menos tres pozos. Si bien el nivel de



fluorescencia del pozo 1 (segundo de izquierda a derecha) disminuyó considerablemente con respecto al resto de los pozos, pudo deberse a que el líquido/aceite contenido en el pozo a su izquierda se desplazó de su lugar debido a la colocación del termistor. La disminución global de la fluorescencia en los pozos 1, 3 y 4 pudo deberse a que la humedad producida dentro del termociclador empaña el filtro de emisión, provocando un error en la medición.

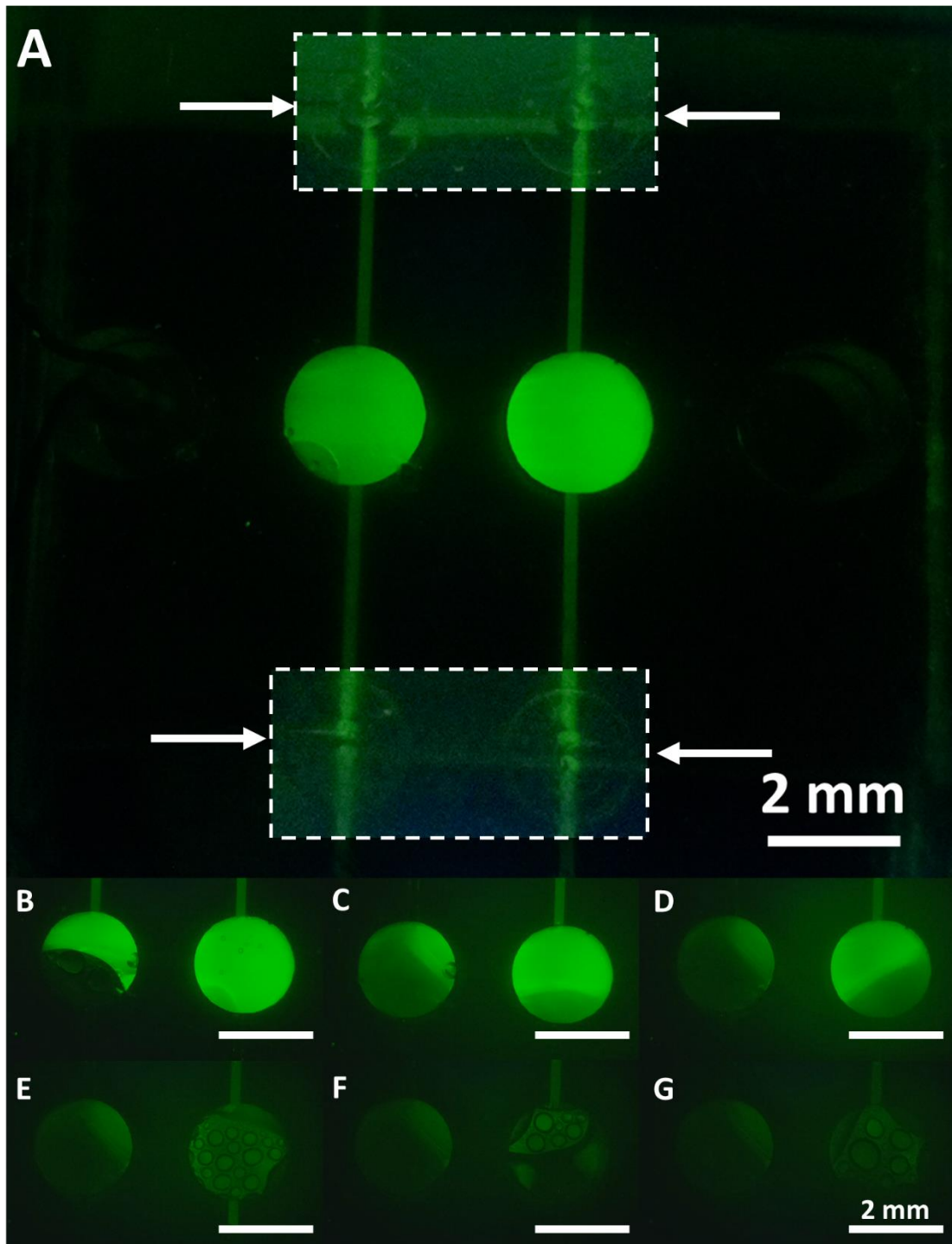
Este resultado confirmó el tratamiento con plasma de oxígeno como una solución parcial al problema de evaporación de las muestras, con lo que finalmente sería posible iniciar ensayos de qPCR en los dispositivos de pozos.

Ahora bien, tanto los dispositivos de pozos como los de válvulas habían sido diseñados de tal forma que ambos podían ser observados bajo las mismas condiciones por medio del sistema óptico del termociclador, de modo que las mejoras previamente descritas servían para visualizar correctamente los dos tipos de dispositivos. Sin embargo, el problema de la evaporación, ahora ya resuelto para el dispositivo de pozos, no podía ser abordado de la misma manera en el dispositivo con válvulas dado que una de las diferencias principales entre uno y otro consistía en la manera en que las muestras eran introducidas a los mismos. Al respecto, resulta necesario recordar que, mientras el diseño del dispositivo de pozos es abierto, el del dispositivo con válvulas es cerrado (versión simplificada). Por lo tanto, y al igual que con el de dispositivos de pozos, fue necesario llevar a cabo una estrategia para evitar la evaporación de las muestras durante el calentamiento, lo que implícitamente requería evitar la formación de burbujas.

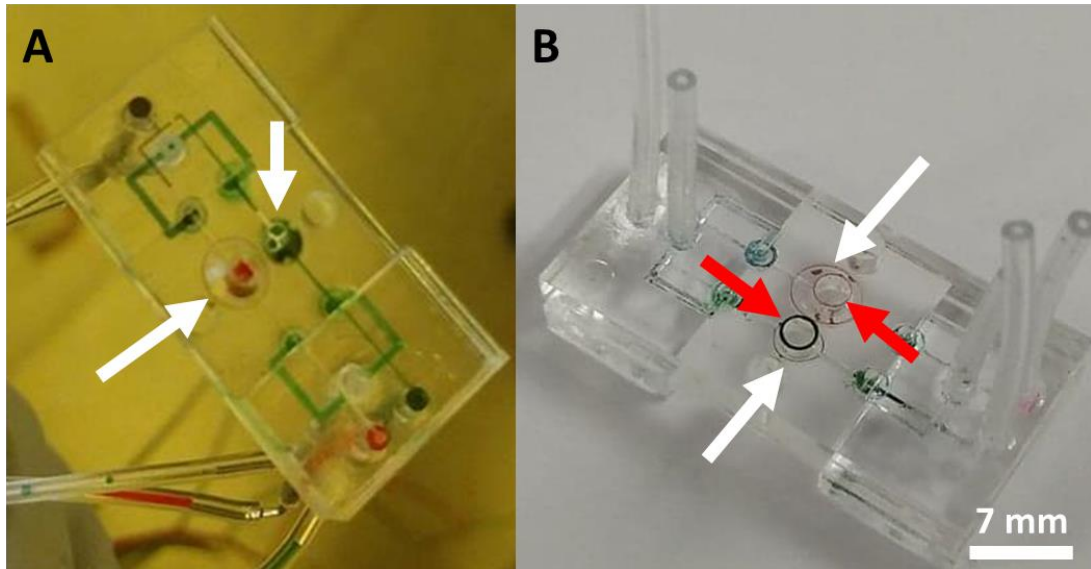
En las fotografías de las **Figura 60** se muestra el desarrollo consecutivo del fenómeno de generación de burbujas y evaporación de muestras en el dispositivo con válvulas. Antes de iniciar el protocolo térmico (**Figura 60A**) las cámaras de reacción contenían una solución de FITC (20  $\mu$ M) bastante homogénea, la cual fue introducida mediante el arreglo experimental de la

**Figura 28.** En esta imagen se observaban íntegramente los dos canales del dispositivo, así como las válvulas de PDMS en cada extremo de la cámara. Sin embargo, conforme los ciclos térmicos se llevaban a cabo (**Figura 60B, C, D, E, F y G**), el aumento de volumen de las burbujas desplazaba a la solución de FITC fuera de las cámaras de reacción. Sin embargo, no quedaba claro por dónde se había desplazado/evaporado la solución, dado que teóricamente la activación de las válvulas de PDMS generaban un espacio hermético.

Además, lo anterior no fue el único problema observado en este dispositivo. En ocasiones y conforme el paso de los ciclos térmicos, el fondo del chip comenzaba a deformarse y quemarse como resultado de la alta presión dentro de las cámaras, la cual se debía al aumento de volumen de las burbujas ahí contenidas. En la **Figura 61** se ejemplifica uno de estos casos.



**Figura 60.** Generación de burbujas y evaporación de muestras en dispositivo con válvulas de PDMS (versión simplificada). A) Cámaras aisladas y llenas de FITC ( $20\ \mu\text{M}$ ) previo al inicio del protocolo térmico, las regiones de las válvulas activadas de PDMS fueron a propósito señaladas y resaltadas al aumentar su brillo y contraste. El resto de las imágenes muestran el contenido de las cámaras al final de los ciclos B) 1, C) 10, D) 20, E) 26, F) 32 y G) 38.



**Figura 61.** Deformación y ruptura del fondo de las cámaras del chip de válvulas de PDMS. A) Vista inferior del dispositivo, las flechas blancas indican las deformaciones y rupturas de las cámaras producidas justo en ese lado. B) Vista superior del dispositivo, las flechas blancas nuevamente indican las deformaciones de las cámaras (en la parte inferior), mientras que las flechas rojas señalan el tamaño original de las cámaras, el cual se identifica debido a los restos de colorantes en las paredes.

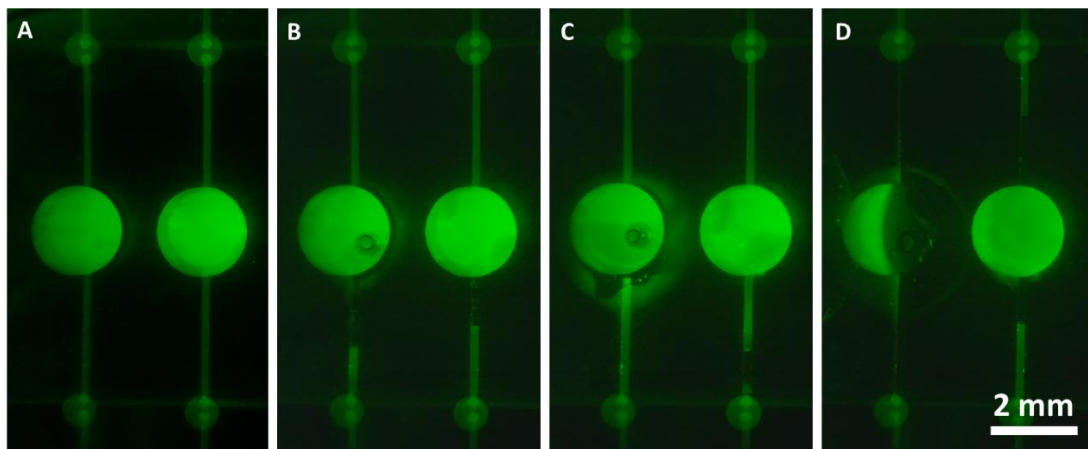
En el caso del dispositivo con válvulas de PDMS, la generación de burbujas en el interior de las cámaras podía tener dos posibles orígenes: por un lado, estas podían producirse al incorporar una solución al dispositivo, lo cual se resolvió previamente (para el chip de pozos) mediante el tratamiento con plasma de oxígeno. Sin embargo, el segundo caso era más grave, dado que las burbujas podían estar siendo generadas desde los canales de control, los cuales, aunque estaban llenos de líquido, seguían siendo presurizado con aire. Además, dado que la membrana de PDMS es porosa, la posibilidad de que las burbujas llegaran a los canales de flujo a través de ella resultaba factible.

Por lo que para corroborar si el problema de la ruptura se debía justamente a la presencia de burbujas generadas desde el canal de control, se diseñó y fabricó una variante adicional de la versión simplificada del dispositivo con válvulas de PDMS, en la cual se omitió el uso de las válvulas y se dejaron las estructuras de los canales y cámaras completamente comunicadas.

Estos dispositivos fueron llenados de manera manual con una jeringa y las mangueras de entradas y salida fueron tapadas con trozos de metal para evitar la evaporación de las soluciones contenidas debido al calentamiento. Además, con estos dispositivos se estudió también el tipo de sellado de las cámaras, haciendo uso del sellado con acrílico, pero también con una película térmica.

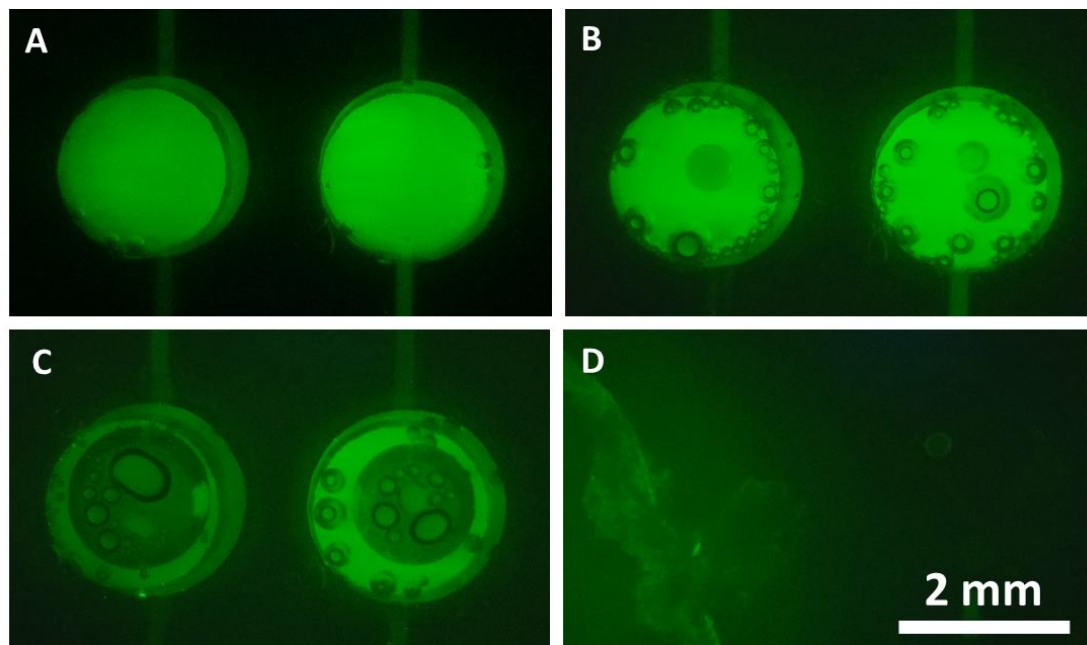
Las imágenes de fluorescencia de la **Figura 62** muestran el resultado del uso de estos dispositivos con el sellado de acrílico, mientras que las de la **Figura 63** corresponden al sellado con la película térmica. Cabe mencionar que, previo a la incorporación de la solución de FITC, estos dispositivos fueron tratados con el mismo procedimiento de plasma de oxígeno previamente descrito y posteriormente fueron colocados en una cámara de vacío donde sus canales fueron igualmente llenados (ver sección 5.5.2.).

Las fotografías de la **Figura 62** muestran una evidente ruptura del fondo de una de las cámaras a partir del ciclo 3 (**Figura 62D**), lo que parecía indicar que, sin importar que las burbujas se generaran desde el canal de control o de flujo, el aumento en la presión de la cámara debido a ellas era tal que, la menor resistencia del fondo del dispositivo era la “salida” más cercana para liberar la presión generada, provocando así su deformación y su eventual ruptura.



**Figura 62.** Generación de burbujas y evaporación de muestras en variante sin válvulas de dispositivo con válvulas de PDMS (versión simplificada) sellado con acrílico. El inicio del ensayo se muestra en A), mientras que el final de los ciclos 1, 2 y 3 se muestra en B), C) y D), respectivamente.

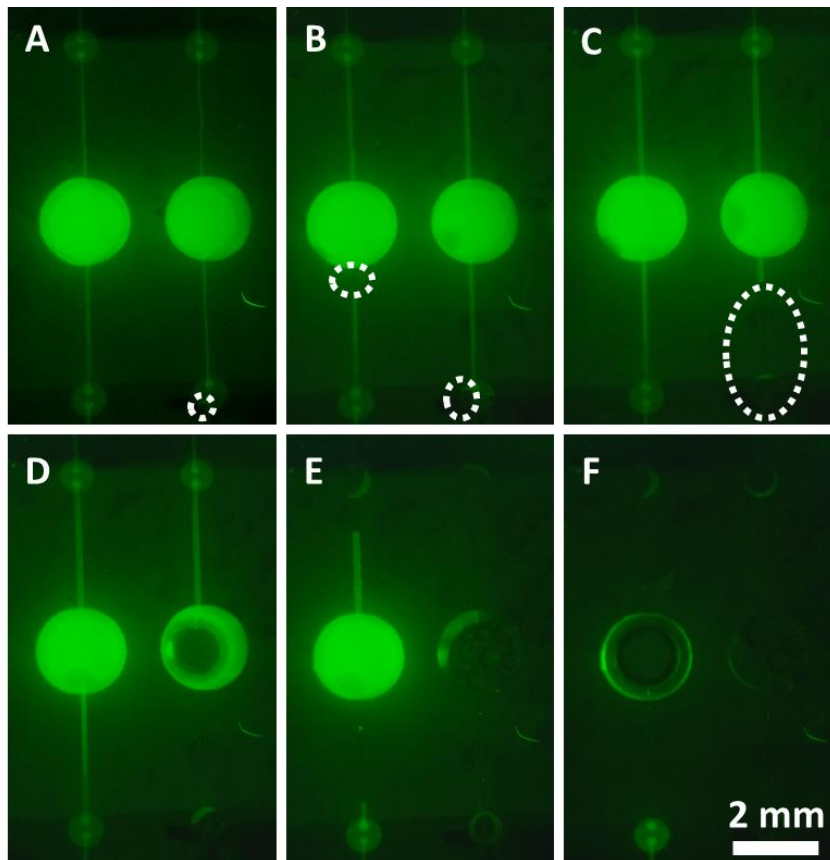
Lo anterior precisamente se pudo corroborar a partir de las fotografías de la **Figura 63**. En este caso no se produjo la ruptura del fondo de las cámaras debido a que, en el ciclo 18 (**Figura 63D**), ocurrió el desprendimiento de la película térmica, liberándose en ese instante la alta presión contenida en las cámaras y consecuentemente provocando la evaporación de las muestras. Es posible imaginar que el resultado de este experimento se debió a que la resistencia opuesta por la película era aún menor que la del acrílico del fondo del dispositivo, por lo que la ruptura se produjo en la región superior de las cámaras.



**Figura 63.** Generación de burbujas y evaporación de muestras en variante sin válvulas de dispositivo con válvulas de PDMS (versión simplificada) sellado con ‘film’ térmico. El inicio del ensayo se muestra en A), mientras que el final de los ciclos 1, 10 y 18 se muestra en B), C) y D), respectivamente.

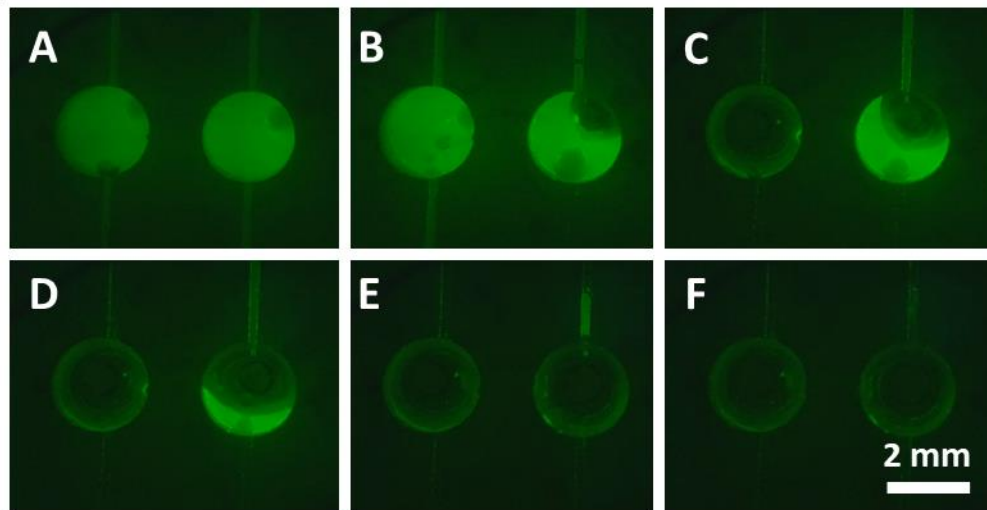
Por lo tanto, se realizó un experimento adicional en el cual el fondo del dispositivo microfluídico se fabricó con un grosor de 1.3 mm, haciendo uso nuevamente del sellado con acrílico, cuya capa medía igualmente 1.3 mm. Anteriormente el fondo del dispositivo tenía aproximadamente un grosor de 500 micras con el propósito de que el fondo de las cámaras estuviera más cerca del calentador para tener una mejor transferencia de calor.

En la **Figura 64A** se puede observar que, al inicio del ensayo, tanto las cámaras como los canales parecían estar casi libres de burbujas, lo cual indicaba que el tratamiento con plasma y vacío resultaba efectivo. Sin embargo, en la misma imagen era apenas visible una burbuja. Lamentablemente, esta pequeña burbuja aumentó su volumen y desplazó la solución de FITC de las cámaras en los primeros 20 ciclos (**Figuras 64B-F**). Además, seguía habiendo duda respecto al destino final de la solución de FITC, dado que parecía haberse evaporado por completo. Sin embargo, como también se observa en las imágenes, en este ensayo no hubo ruptura alguna del dispositivo, por lo que el haber aumentado la resistencia del fondo del dispositivo fue suficiente para evitar este problema.



**Figura 64.** Generación de burbujas y evaporación de muestras en dispositivo con válvulas de PDMS (versión simplificada de dos cámaras y sin válvulas integradas) sellado acrílico y con fondo grueso. El inicio del ensayo se muestra en A), mientras que el final de los ciclos 1, 2, 3, 10 y 20 se muestra en B), C), D), E) y F), respectivamente. Los óvalos punteados señalan la presencia de burbujas en los primeros ciclos, en los ciclos posteriores estas últimas son claramente observables.

Con el experimento anterior se logró resolver el problema de la ruptura del chip, pero no fue posible garantizar la ausencia de burbujas en su interior y la visible evaporación de las muestras de FITC. Por lo tanto, se realizó un experimento para tratar de determinar por qué se seguía produciendo dicha evaporación, la cual era inesperada ya que todos los diseños implementados se trataban de sistemas herméticamente cerrados. Para este experimento se utilizó la versión simplificada del dispositivo con válvulas de PDMS (i.e. variante con las válvulas integradas), las imágenes de fluorescencia obtenidas se muestran en la **Figura 65**.



**Figura 65.** Generación de burbujas y evaporación de muestras en dispositivo con válvulas de PDMS (versión simplificada de dos cámaras) sellado con acrílico y con fondo grueso. Imágenes de fluorescencia al final de los ciclos 1, 5, 10, 15, 20 y 30 se muestra en A), B), C), D), E) y F), respectivamente.

Lo observado en las fotografías anteriores demuestra que, con o sin válvulas, existe una continua evaporación de las muestras de FITC en el interior de los microdispositivos. Una posible explicación a este problema se deduce a partir del concepto de *presión de vapor* de un líquido. Este concepto se define como la presión de equilibrio de la fase gaseosa sobre su correspondiente fase líquida a una cierta temperatura; en otras palabras, es la presión que resulta de la evaporación de un líquido en una muestra del mismo líquido dentro de un contenedor cerrado [38]. Este fenómeno ocurre



precisamente en los ensayos de qPCR realizados en estos dispositivos, ya que las cámaras de reacción se encuentran selladas y el líquido ahí contenido (e.g. FITC diluido en PBS) sufre evaporación durante el protocolo térmico.

Se sabe que la presión de vapor de un líquido varía con respecto a su temperatura. Para el caso del agua, por ejemplo, el aumento de presión crece de manera exponencial de 0 a 1 atmósferas (atm) en el rango de 0 a 100 grados °C [38], lo que equivale a un aumento de 14.69 psi.

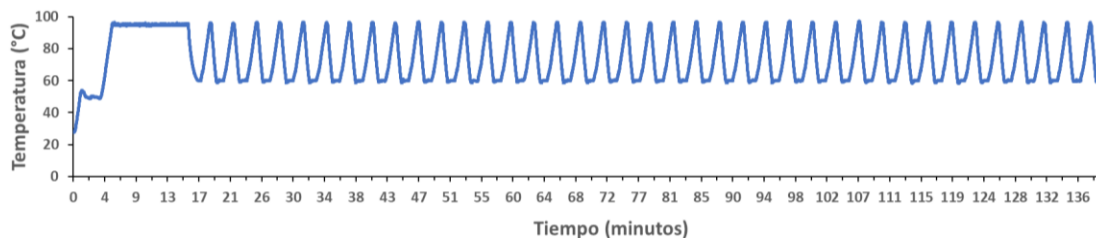
En los ensayos de qPCR las muestras contenidas dentro de las cámaras se encuentran inicialmente a temperatura ambiente ( $\approx 25$  °C), y al elevar la temperatura el valor máximo alcanzado es de 95 °C, por lo que la presión de vapor incrementa  $\approx 1$  atm. Por otro lado, los 40 psi establecidos para presurizar las válvulas son aplicados a la entrada de un canal de control lleno de líquido, por lo que la presión real de sellado de las válvulas podría ser menor a este valor debido a la caída de presión a lo largo del canal de control.

Por lo tanto, la “evaporación” de las muestras puede en realidad tratarse de un desplazamiento de éstas fuera de los canales (e.g. hasta las mangueras de salida y/o entradas) cuando la presión en el interior de las cámaras supera a la presión de cierre de las válvulas, provocando la apertura de las válvulas y permitiendo que las muestras se fuguen al exterior del dispositivo.

#### **6.4. Ensayos de qPCR en sistema integrado**

Los resultados de los experimentos de caracterización con fluoresceína permitieron realizar la integración entre el termociclador portable y únicamente el dispositivo de pozos, por lo que los ensayos de qPCR se realizaron sólo con este tipo de dispositivo. Por lo tanto, el sistema integrado es similar al mostrado en la **Figura 12**, en el cual el dispositivo es cargado con las mezclas para PCR y el aceite mineral, y posteriormente acoplado al calentador. Una vez colocado, el sensor de temperatura es posicionado manualmente en uno de los pozos.

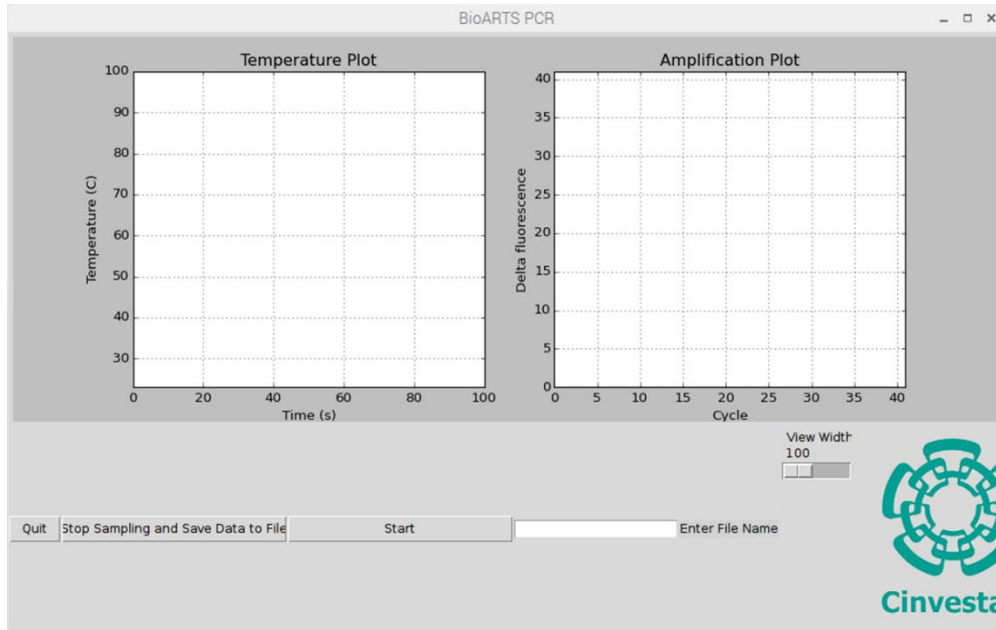
El protocolo térmico ejecutado se describió previamente en la sección de Materiales y Métodos, siendo el mismo que el de los ensayos realizados en el termociclador comercial. Sin embargo, ocasionalmente en estos ensayos el número total de ciclos fue alargado a propósito para estudiar el desempeño de la reacción durante más tiempo. En la **Figura 66** se muestra la duración del protocolo térmico ejecutado en el termociclador portable (40 ciclos), la cual es mayor que la de los ensayos realizados en el termociclador comercial debido a que las rampas de calentamiento y enfriamiento son más lentas [17].



**Figura 66.** Protocolo térmico (40 ciclos) del termociclador portable. Duración aproximada: 140 minutos.

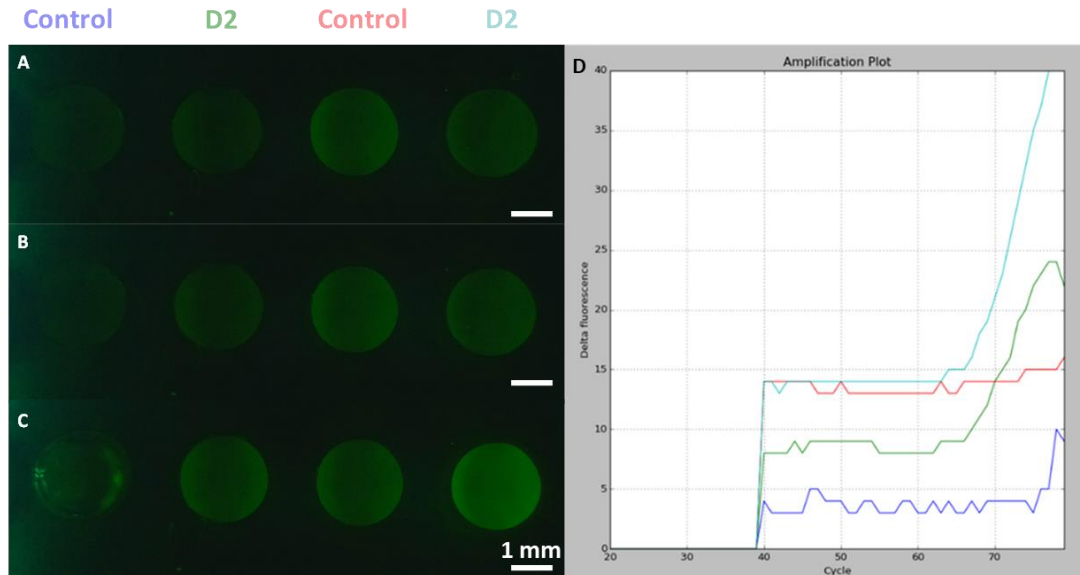
Todos los templates de cDNA utilizados para la obtención de los siguientes resultados corresponden a las diluciones de la muestra “3” descritas en la **Tabla 3**. También cabe mencionar que algunas de las gráficas de amplificación a continuación mostradas fueron directamente obtenidas de la interfaz gráfica del termociclador portable (**Figura 67**), las cuales erróneamente muestran el ciclo 40 como inicio de la reacción debido a errores en la programación al establecer el rango visible de la gráfica de amplificación en la interfaz de usuario. Al tratar de corregir este error se encontraron múltiples errores adicionales de sintaxis, por lo que para fines prácticos se debe considerar el ciclo 40 como el inicio de la amplificación (ciclo 0).

En los otros tipos de gráficos, los resultados se graficaron externamente a partir de los valores de fluorescencia de cada pozo en cada ciclo del protocolo, los cuales son guardados como archivos de texto al final del ensayo, de la misma manera que los datos de temperatura a lo largo del tiempo. Igualmente, todas las imágenes de los pozos al final de cada ciclo fueron almacenadas.



**Figura 67.** Interfaz gráfica del termociclador portable. La información desplegada en tiempo real corresponde a una gráfica de temperatura (°C) de la reacción con respecto al tiempo (s) y a otra del cambio en la intensidad de fluorescencia (a.u.f.) en 4 regiones de interés en cada ciclo del ensayo.

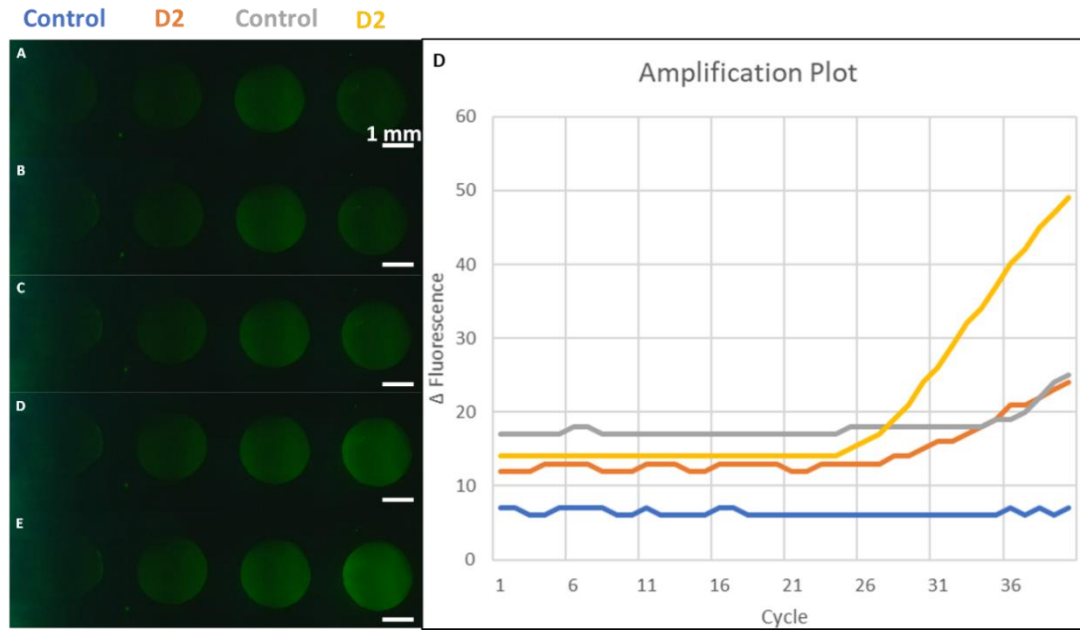
El resultado de un primer ensayo positivo se muestra en la **Figura 68**, en el cual se utilizó una misma dilución de cDNA ( $D2 = 47.78 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) y dos controles.



**Figura 68.** Ensayo de qPCR en termociclador portable (40 ciclos). A), B) y C) son imágenes de fluorescencia representativas del experimento captadas al final de los ciclos 1, 26 y 40, respectivamente. D) Gráfica de amplificación de dos muestras D2 ( $47.78 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) y dos controles negativos. El valor de  $C_T$  para ambas muestras de cDNA fue de aproximadamente 26.

Las diferencias en cuanto a la intensidad de fluorescencia basal de cada curva de la gráfica anterior (y, por tanto, el nivel máximo alcanzado) pudieron deberse a que cada pozo recibía una diferente cantidad de luz por parte del LED dependiendo de su posición en el dispositivo. Anteriormente se explicó que la nueva posición del LED permite que su inclinación pueda ser modificada manualmente y, desafortunadamente, esto pudo haber ocurrido al manipular el termociclador previo al inicio del experimento. Aun así, el hecho de que ambas muestras de cDNA iniciaran su amplificación geométrica de manera simultánea ( $C_T \approx 26$ ) es un indicativo de que, efectivamente, poseían la misma concentración inicial de cDNA. Por último, el nivel de fluorescencia de los controles negativos (sin cDNA) se mantuvo relativamente constante hasta casi el final del ensayo, donde el aumento más representativo del control azul pudo deberse a un error de medición originado por la presencia de una burbuja, la cual puede apreciarse en el pozo del extremo izquierdo de la **Figura 68C**.

Aunque en el experimento anterior se utilizó dos veces la misma muestra de cDNA, así como dos controles negativos, se optó por replicarlo exactamente bajo las mismas condiciones; los resultados se muestran en la **Figura 69**. De la gráfica de amplificación mostrada (**Figura 69D**), así como de su comparación con la correspondiente gráfica del primer ensayo llevado a cabo (**Figura 68D**), es posible confirmar una buena reproducibilidad entre los ensayos de qPCR realizados en el sistema integrado con el termociclador portable y el microdispositivo, dado que la muestra D2 (amarilla) del segundo ensayo alcanzó su fase de amplificación geométrica en el mismo ciclo que las dos muestras D2 del primero ( $C_T \approx 26$ ). Sin embargo, inesperadamente la otra muestra D2 (naranja) de este segundo experimento comenzó su amplificación aproximadamente hasta el ciclo 30. Más desafortunado aun, el control negativo (gris) mostró un evidente aumento de nivel de fluorescencia a partir del ciclo 35.

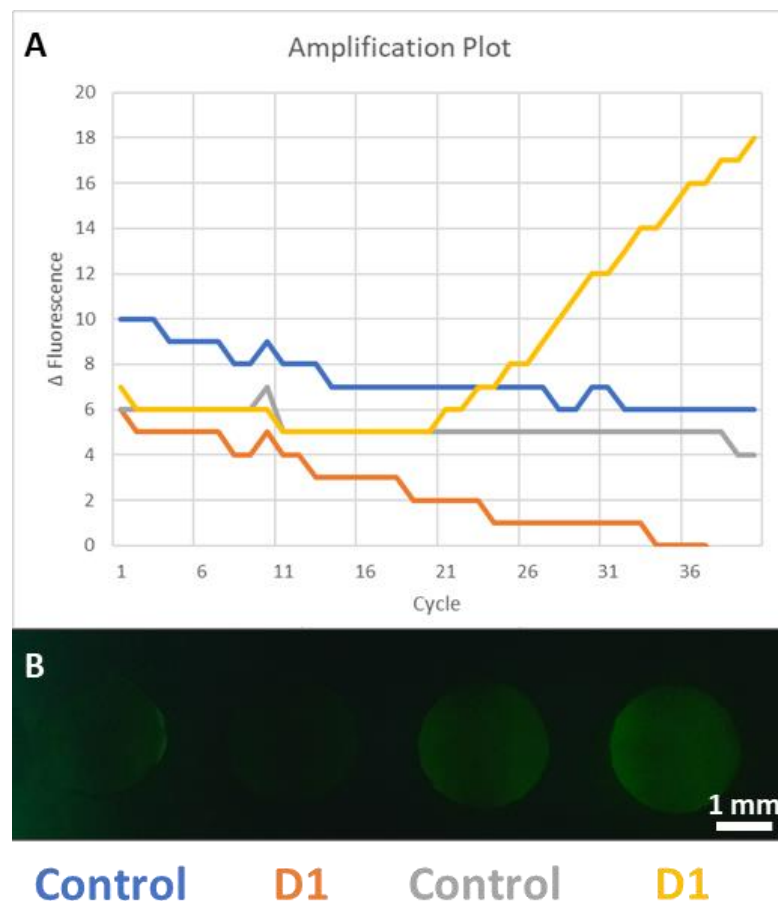


**Figura 69.** Ensayo de qPCR en termociclador portable. A), B), C), D) y E) son imágenes de fluorescencia representativas del experimento captadas al final de los ciclos 1, 26, 30, 35 y 40, respectivamente. D) Gráfica de amplificación de dos muestras D2 (47.78 ng/μL) y dos controles negativos. Los valores de  $C_T$  para las muestras D2 (amarilla) y D2 (naranja) de cDNA fueron aproximadamente 26 y 30, respectivamente.

Este problema puede explicarse a partir de una posible contaminación entre pozos durante la carga y/o manipulación del dispositivo previo a dar inicio al experimento. Los pozos que contenían la muestra roja y el control negativo gris se encontraban uno al lado del otro en el dispositivo, por lo que bastaría una mezcla parcial entre las soluciones contenidas en ambos para explicar el hecho de que la muestra D2 (naranja) se diluyó ligeramente e inició su amplificación después de la otra muestra D2 (amarilla), mientras que el control pasó a contener una cantidad pequeña de cDNA que fue capaz de ser amplificada en ciclos posteriores a la muestra D2 diluida. Si los pozos que contenían esta muestra y control se encontraban muy llenos, es posible que este mezclado se produjera al manipular el dispositivo, ya sea durante el traslado hacia el termociclador portable, o al colocarlo encima el calentador. O bien, la mezcla podría haberse dado debido a que la punta de pipeta con que se colocaron una y otra solución derramara ligeramente parte de su contenido en el pozo contiguo durante el proceso de llenado del dispositivo.

La dilución 2 fue la utilizada en los primeros experimentos de qPCR en un microdispositivo para desafiar desde un inicio el LOD del sistema, dado que no se trataba de la muestra disponible de cDNA más concentrada (D1 y 'Stock' son 5 y 25 veces más concentradas, respectivamente). Por lo que los ensayos a continuación mostrados hicieron uso de las muestras D1, D3 y D4 con el propósito de generar posteriormente una curva estándar de al menos 4 puntos, y si aún fuera posible, ampliar esta aún más.

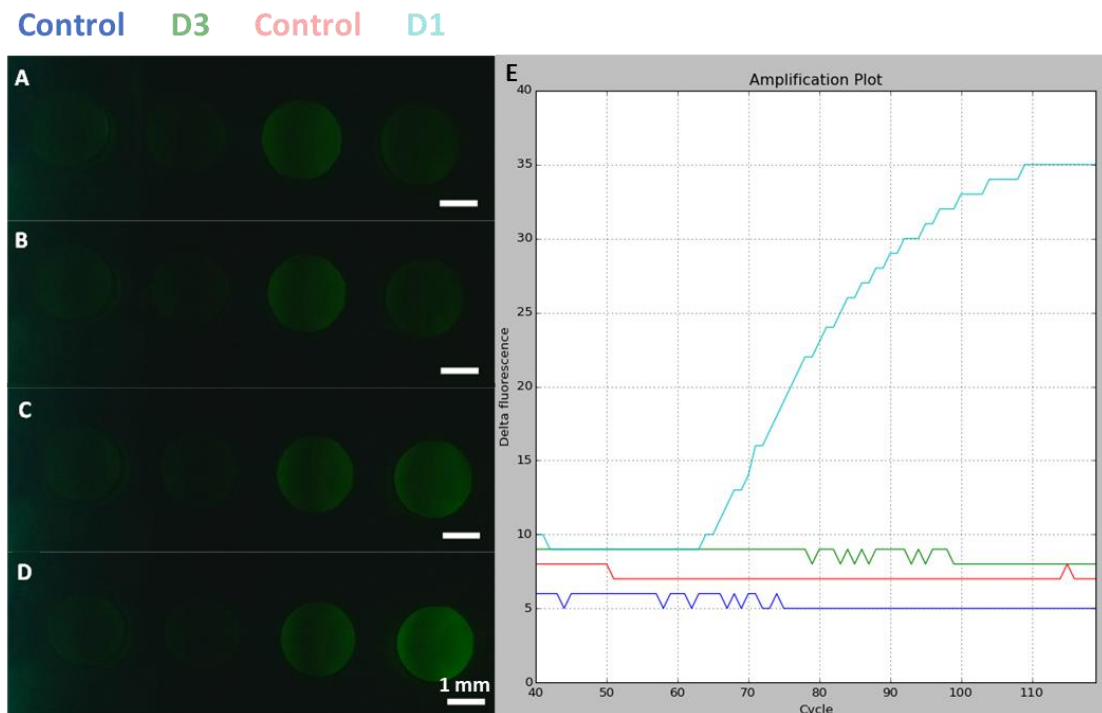
En la **Figura 70** se presenta un tercer ensayo de qPCR parcialmente positivo, en el cual se utilizó nuevamente una misma dilución de cDNA (D1 = 238.9 ng/μL) y dos controles negativos (sin cDNA).



**Figura 70.** Ensayo de qPCR en termociclador portable. A) Gráfica de amplificación de dos muestras D1 (238.9 ng/μL) de cDNA y dos controles negativos. El valor de  $C_T$  para la muestra D1 (amarilla) fue aproximadamente 24. B) Imagen de fluorescencia de los pozos al final del ensayo (ciclo 40), se aprecia la aparente evaporación de la muestra D1 (naranja).

En el transcurso de este experimento se sospechó de la evaporación de la muestra D1 (naranja), dado que su nivel de fluorescencia al final del ensayo estaba muy disminuido. Al observar con detalle la imagen de fluorescencia de los pozos al final del ensayo (**Figura 70B**) es posible apreciar que, efectivamente, parece no haber solución alguna en el que contenía la muestra D1 (naranja), cuya evaporación pudo producirse debido a alguna burbuja generada en el pozo pese al tratamiento previo con plasma de oxígeno del chip. Aun así, la muestra D1 (amarilla) se amplificó de manera normal, teniendo un valor de  $C_T \approx 24$ .

A continuación, se optó por realizar ensayos comparativos, es decir, se colocaron diferentes diluciones de cDNA en un mismo dispositivo, esperando observar inicios de amplificación geométrica a partir de diferentes ciclos. En la **Figura 71** se muestra un ejemplo, donde las diluciones 1 y 3 fueron las usadas.



**Figura 71.** Ensayo de qPCR en termociclador portable (80 ciclos). A), B), C) y D) son imágenes de fluorescencia representativas del experimento captadas al final de los ciclos 1, 25, 40 y 80, respectivamente. D) Gráfica de amplificación de dos muestras de cDNA, D1 (238.9 ng/ $\mu$ L) y D3 (9.56 ng/ $\mu$ L), y dos controles negativos. El valor de  $C_T$  para D1 fue de aproximadamente 25, D3 no se amplificó.

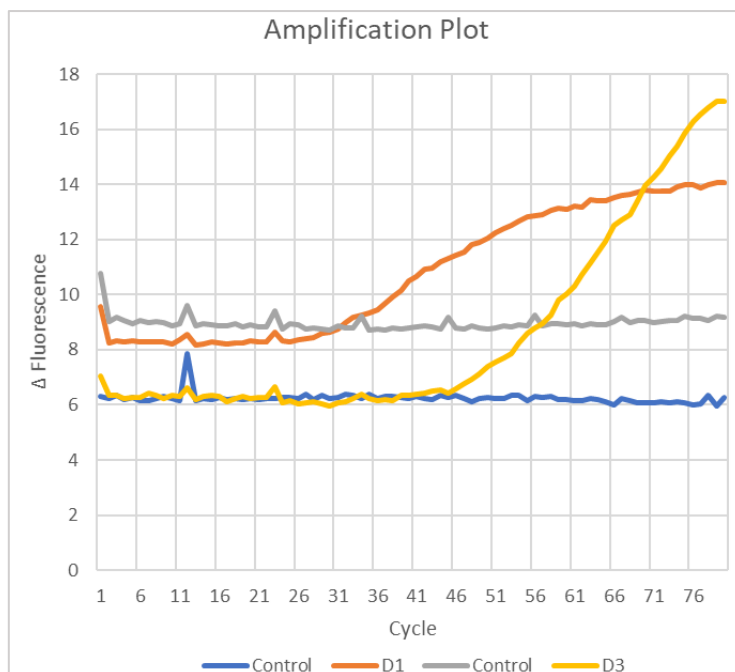
Dado que la muestra D3 tenía la concentración más baja de cDNA hasta el momento utilizada, en el ensayo anterior se optó por ejecutar el doble de ciclos térmicos, previniendo un posible inicio de amplificación más allá del ciclo 40.

Sin embargo, como se observa en la **Figura 71E**, la muestra D3 no mostró aumento alguno en su intensidad de fluorescencia. Esta condición, en general, puede deberse a dos situaciones: 1) La muestra es contaminada con DNAsas, las cuales degradan el cDNA e impiden a la enzima polimerasa sintetizar nuevas moléculas de este ácido nucleico. 2) El LOD del sistema no le permite detectar ese nivel de concentraciones de cDNA.

Aun así, la muestra D1 se amplificó con un  $C_T \approx 25$ , valor similar al obtenido en el experimento de la **Figura 70**. Además, el haber ejecutado el protocolo térmico por 80 ciclos permitió observar como la muestra D1 continuó replicándose hasta aproximadamente el ciclo 68, alcanzando la fase estacionaria de amplificación y en la cual la cantidad del producto de PCR permanece constante, pese a que la reacción se extienda por más ciclos [33].

Un segundo ensayo de 80 ciclos fue realizado para repetir las mismas condiciones que las del experimento anterior y corroborar si, efectivamente, el LOD del sistema estaba limitado a concentraciones mayores que la de la muestra D3. Los resultados se muestran en la gráfica de la **Figura 72**.



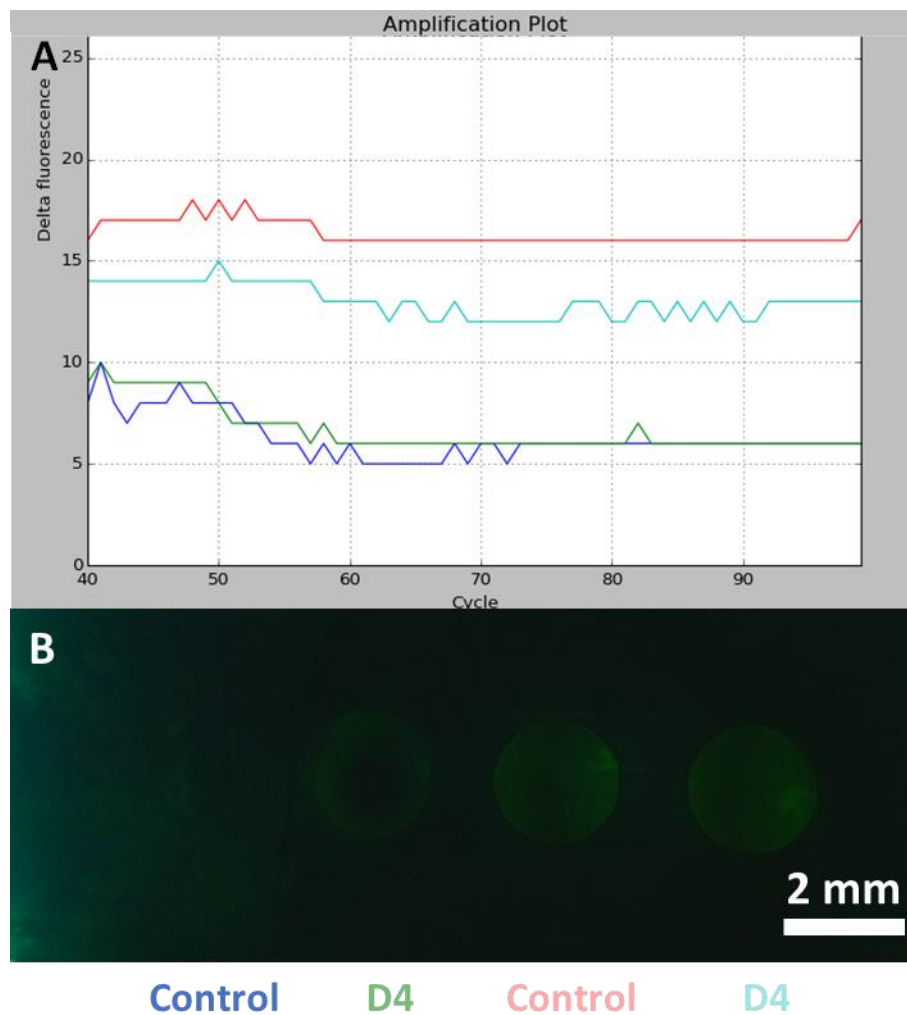


**Figura 72.** Ensayo de qPCR en termociclador portable con muestras D1 (238.9 ng/μL) y D3 (9.56 ng/μL) de cDNA, y dos controles negativos. Los valores de  $C_T$  fueron aproximadamente 35 y 50, respectivamente, para cada muestra.

A primera vista, el resultado de la gráfica de amplificación anterior muestra el comportamiento deseado, esto es, al tener dos muestras con concentraciones de cDNA diferentes era de esperarse que la más concentrada (D1) iniciara su fase de amplificación geométrica con un  $C_T$  menor a la muestra más diluida (D3). En este caso, la muestra D1 tuvo un  $C_T \approx 35$ , mientras que la muestra D3 resultó con un  $C_T \approx 50$ .

Sin embargo, se observa un problema al comparar estos resultados, en particular el de D1, con los del total de los ensayos realizados anteriormente, en los cuales el  $C_T$  para esta dilución se había alcanzado 10 ciclos atrás. Por lo tanto, la ejecución de este protocolo térmico resultó menos efectiva, ya que las temperaturas de las fases de desnaturalización y alineación/extensión parecen no haber sido alcanzadas en varios ciclos del ensayo.

Finalmente, en la **Figura 73** se muestran los resultados de un ensayo de qPCR utilizando la cuarta dilución (D4) de cDNA (1.91 ng/ $\mu$ L), los cuales no muestran amplificación de ninguna de las dos muestras contenidas en los pozos, así como tampoco de los controles negativos. Este experimento se repitió en otra ocasión, obteniéndose el mismo resultado. De modo que únicamente se muestra uno de ellos para ejemplificar que, hasta el momento y con las optimizaciones al sistema integrado en este trabajo realizadas, el LOD corresponde a concentraciones de cDNA de 9.56 ng/ $\mu$ L.



**Figura 73.** Ensayo de qPCR en termociclador portable. A) Gráfica de amplificación de dos muestras D4 (1.91 ng/ $\mu$ L) de cDNA y dos controles negativos. B) Imagen de fluorescencia de los pozos al final del ensayo (ciclo 40). No se observa la amplificación de ninguna de las muestras.

Es importante enfatizar que los resultados obtenidos para las diluciones 1, 2 y 3 pueden ser perfeccionados si se llevan a cabo más experimentos, de modo que la variabilidad observada, en particular en la mezcla para PCR con la D3, podría ser disminuida. Sin embargo, también es importante mencionar que todos los experimentos deben ser realizados en ambientes libres de contaminantes que degraden las muestras de cDNA (e.g. enzimas DNAsas). Precisamente la optimización del proceso de limpieza y tratamiento de los dispositivos microfluídicos, antes de ser utilizados, influyó notablemente en la obtención de los resultados positivos de este trabajo. Antes de llevar esto último a cabo se habían obtenido una considerable cantidad de resultados negativos, los cuales podrían afectar en la reproducibilidad y variabilidad de los experimentos futuros si no se toman en consideración los factores de contaminación ya mencionados.

Por último, los resultados de los ensayos de qPCR realizados en el termociclador portable aún no pueden ser completamente comparados con los previamente obtenidos en el termociclador comercial (**Figura 33**) debido a que en este último se detectaron hasta 6 diferentes diluciones de cDNA. Sin embargo, el ensayo mostrado en la **Figura 73** puede ser optimizado si se varían las cantidades de muestra y reactivos en las mezclas para PCR, esto es, agregando más o menos volumen de cDNA, sonda de detección, etc. De la misma manera, esto puede realizarse con las diluciones que no alcanzaron a ser probadas experimentalmente en este trabajo (D5 y D6).

## 7. CONCLUSIONES

Se diseñó y fabricó un dispositivo microfluídico integrado con válvulas y hecho a base de acrílico y PDMS que potencialmente podría ser usado para llevar a cabo ensayos de PCR en tiempo real. La caracterización de las válvulas de este dispositivo por medio de colorantes corroboró que es posible aislar muestras de hasta 6.5  $\mu\text{L}$  de manera simultánea en una o varias cámaras de reacción, el cual es un volumen suficiente para las mezclas de PCR utilizadas en los experimentos de este trabajo. Las muestras, a su vez, pudieron ser introducidas al dispositivo a presión constante de manera automatizada. Sin embargo, la intermitente presencia de burbujas dentro de los canales y cámaras del microdispositivo, aunado al incremento de temperatura propio del ensayo de qPCR, generó un aumento en la presión de vapor tal que la presión de sellado de las válvulas no fue suficiente para impedir que las muestras permanecieran aisladas. Por lo que este microdispositivo aún no pudo ser utilizado en ensayos térmicos.

Por otro lado, sí fue posible llevar a cabo la integración de un sistema compuesto por un termociclador portable previamente desarrollado [17] y un dispositivo de pozos. El termociclador fue a su vez modificado para mejorar el límite de detección que inicialmente había sido observado, así como para resolver el problema de evaporación de las muestras contenidas en el dispositivo de pozos debido a la presencia de burbujas.

Las mejoras anteriores sirvieron para optimizar el sistema integrado y permitir la detección del gen de control endógeno 18S rRNA contenido en una muestra de cDNA con una concentración de hasta 9.56 ng/ $\mu\text{L}$ . Esta detección se llevó a cabo en tiempo real dentro de los pozos al medir los cambios en la intensidad de fluorescencia de las muestras por medio de un algoritmo programado en una Raspberry, el cual permitió, a su vez, almacenar tanto los datos de fluorescencia y temperatura de la reacción a través del tiempo, como las imágenes captadas al final de cada ciclo del protocolo de qPCR.

Finalmente, al comparar los resultados de los ensayos de qPCR realizados en el sistema integrado con los inicialmente llevados a cabo en un termociclador comercial, el sistema aquí propuesto presenta algunas limitaciones en cuanto a eficiencia y límite de detección, dado que con él se detectaron 3 diluciones seriales de cDNA (concentración mínima detectada = 9.56 ng/μL), mientras que con el equipo comercial se logró observar hasta 6 diluciones (concentración mínima detectada = 0.02 ng/μL). Por otro lado, los valores de  $C_T$  para las diluciones detectadas en el sistema integrado son mayores que los correspondientes a las diluciones detectadas en los ensayos en el termociclador comercial. Sin embargo, cabe mencionar que es posible optimizar las mezclas para PCR de las tres diluciones restantes que no fue posible detectar con el sistema propuesto, por ejemplo, al aumentar los volúmenes del templado de DNA o modificando algunos de los parámetros ópticos de detección del termociclador portable (e.g. tiempo de exposición, número de ciclos, etc.). Esto no se llevó totalmente a cabo debido al tiempo limitado para llevar a cabo este trabajo.

A pesar de lo anterior, la diferencia en cuanto a la concentración mínima detectada entre ambos tipos de ensayos (termociclador comercial y sistema integrado) es de apenas 2 órdenes de magnitud, la cual corresponde a menos de una centésima parte del valor de concentración inicial de la muestra 'stock' de cDNA (1194.4 ng/μL) utilizada para llevar a cabo los experimentos. A su vez, y como era de esperarse, el volumen utilizado por ensayo para detectar una sola dilución resulta ser menor en el sistema integrado (8 μL) con respecto al termociclador comercial (60 μL), lo que representa una reducción de más del 85% en el uso muestras y reactivos. Por lo tanto, si bien el sistema integrado carece de algunas ventajas técnicas propias de la realización de ensayos de qPCR de manera convencional, es posible considerarlo como una alternativa viable para trabajar en un laboratorio con recursos limitados.

## 8. PERSPECTIVAS

En este trabajo se destacó el uso de los materiales termoplásticos para el desarrollo de aplicaciones biológicas, particularmente, el polimetilmetacrilato (acrílico o PMMA) como material base en la fabricación de dispositivos microfluídicos para realizar ensayos de PCR, y el polidimetilsiloxano (PDMS) como material complementario que, dada su flexibilidad, podía ser empleado en la construcción de válvulas.

Los problemas en los dispositivos aquí presentados, debido al proceso de maquinación de sus válvulas y a la ruptura/deformación por calor de estas u otras estructuras, pueden ser resueltos mediante el uso total o parcial de otros polímeros. Algunos de ellos muy flexibles como el poliestireno, previamente reportado para la fabricación de membranas delgadas [19], y otros como el policarbonato que, dada su mayor temperatura de transición vítrea, ha sido reportado en la fabricación de dispositivos desechables para ensayos de PCR [39]. Por lo que una posible integración de membranas resistentes de policarbonato (menos porosas que las de PDMS, pero más flexibles que las de acrílico) ayudaría al dispositivo aquí propuesto a llevar a cabo los ensayos de qPCR con una esperada ausencia de evaporación de las muestras.

Adicionalmente, el problema de burbujas generadas en las estructuras de microdispositivos para PCR como este, muy recientemente ha sido abordado mediante el uso de una capa delgada de polietileno (PE) impermeable que inhibe el transporte de masa en dirección vertical y, por tanto, minimiza la generación de burbujas hacia un dispositivo de PDMS acoplado [40]. Por lo que el uso del PE acoplado y/o integrado a las válvulas del dispositivo de acrílico de este trabajo, podría ser una solución a las burbujas producidas.

El límite de detección del sistema integrado puede ser optimizado para alcanzar límites de detección para cantidades de cDNA dos órdenes de magnitud por debajo de lo observado, e incluso para concentraciones en el

orden de  $\text{pg}/\mu\text{L}$  según lo reportado en la literatura [15] [41]. Para este propósito, un diseño electrónico con una mayor cantidad de LEDs, o con una mayor luminosidad relativa producida por el LED actualmente integrado, ayudaría a detectar concentraciones aún más bajas de moléculas fluorescentes, de la misma manera que aquí fueron observadas las muestras más diluidas de FITC después de modificar dicho circuito. La eficiencia de los ensayos de qPCR en el sistema integrado puede igualmente verse mejorada al realizar una mayor cantidad de experimentos con diluciones aún más bajas de cDNA, las cuales serían justamente más factibles de detectar mediante la implementación de las mejoras ya mencionadas.

Por último, sistemas integrados como el aquí presentado pueden extender sus alcances mediante el desarrollo de módulos microfluídicos adicionales. Por ejemplo, de implementarse este sistema para la detección de algún tipo de bacterias (utilizando los reactivos y protocolos térmicos correspondientes), sería posible plantear el esquema de un microlaboratorio de detección [19], el cual se compondría de bloques para 1) la captura de patógenos directamente de la muestra biológica de interés, 2) el lisado de los organismos capturados, 3) la extracción y purificación del DNA problema, y 4) la detección del DNA mediante técnicas de amplificación como la qPCR. Este último módulo es, precisamente, en el que este trabajo estuvo enfocado.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *et al.*, “Molecular Biology of The Cell,” 5<sup>th</sup> Edition, *Garland Science*, 1-8, 2008.
- [2] “Classic experiments: DNA as the genetic material,” *Khan Academy*, s.f., (web), 6 de octubre 2018. Disponible en: <https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/classic-experiments-dna-as-the-genetic-material>
- [3] “Beginner’s Guide to Real-time PCR,” *PrimerDesign Ltd*, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, s.f., (web), 8 de noviembre 2017. Disponible en: <http://www.genomica.uaslp.mx/Databases/qPCR05.pdf>
- [4] C. A. González, “Reacción en cadena de la polimerasa (PCR),” *Laboratorio de Botánica-Colegio Nacional de Buenos Aires*, Universidad de Buenos Aires, 2015 (web), 8 de noviembre 2017. Disponible en: <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/Dibulgeneral/PCR/PCR.htm>
- [5] A. Folch, “Introduction to BioMEMS,” 1<sup>st</sup> Edition, *CRC Press*, 97-99, 207-208, 232-233, 2013.
- [6] Y. A. Leal, J. Álvarez-Nemegyei, J. R. Velázquez, *et al.*, “Risk factors and prognosis for neonatal sepsis in southeastern Mexico: analysis of a four-year historic cohort follow-up,” *BMC Pregnancy and Childbirth*, 12(48), 1-9, 2012.
- [7] S. E. Beekmann, D. J. Diekema, G. V. Doern, *et al.*, “Effects of Rapid Detection of Bloodstream Infections on Length of Hospitalization and Hospital Charges,” *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3119-3125, 2003.
- [8] T. D. Boone, Z. H. Fan, H. H. Hooper, *et al.*, “Plastic Advances Microfluidic Devices,” *Analytical Chemistry*, 74, 78A-86A, 2002.
- [9] K. S. Park, C. H. Huang, H. Lee, *et al.*, “Rapid identification of health care-associated infections with an integrated fluorescence anisotropy system,” *Science Advances*, 2, 1-9, 2016.



- [10] R. Pal, M. Yang, M. A. Burns, *et al.*, "An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses," *Lab Chip*, 5, 1024-1032, 2005.
- [11] J. L. García-Cordero, D. Kurzbuch, A. J. Ricco, *et al.*, "Optically addressable single-use microfluidic valves by laser printer lithography," *Lab Chip*, 10, 2680-2687, 2010.
- [12] B. Zhuang, W. Gan, P. Liu, *et al.*, "Fully Automated Sample Preparation Microsystem for Genetic Testing of Hereditary Hearing Loss Using Two-Color Multiplex Allele-Specific PCR," *Analytical Chemistry*, 87, 1202-1209, 2015.
- [13] H. Tachibana, M. Saito, E. Tamiya, *et al.*, "On-chip quantitative detection of pathogen by autonomous microfluidic PCR platform," *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 725-730, 2015.
- [14] B. L. Fernández-Carballo, I. McGuinness, A. F. Sauer-Budge, *et al.*, "Low-cost, real-time, continuous flow PCR system for pathogen detection," *Biomed Microdevices*, 18: 34, 1-10, 2016.
- [15] F. Shen, W. Du, R. F. Ismagillov, *et al.*, "Nanoliter Multiplex PCR Arrays on a SlipChip," *Analytical Chemistry*, 82(11), 4606-4612, 2010.
- [16] J. Hiltunen, C. Liedert, L. P. Lee, *et al.*, "Roll-to-roll fabrication of integrated PDMS-paper microfluidics for nucleic acid amplification," *Lab Chip*, 18(11), 1552-1559, 2018.
- [17] R. A. Mendoza-Gallegos, A. Rios and J. L. Garcia-Cordero, "An Affordable and Portable Thermocycler for Real-Time PCR Made of 3D-Printed Parts and Off-the-Shelf Electronics," *Analytical Chemistry*, 90(9), 5563-5568, 2018.
- [18] X. Shi, C.-H. Chen, D. R. Meldrum, *et al.*, "Parallel RNA extraction using magnetic beads and a droplet array," *Lab Chip*, 15, 1059, 2015.
- [19] G. Spizz, L. Young, P. Zhou, *et al.*, "Rheonix CARD® Technology: An Innovative and Fully Automated Molecular Diagnostic Device," *Point Care*, 11(1), 42-51, 2012.

- [20] S. A. Mousavi Shaegh, A. Pourmand, Y. S. Zhang, *et al.*, "Rapid prototyping of whole-thermoplastic microfluidics with built-in microvalves using laser ablation and thermal fusion bonding," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255(1), 100-109, 2018.
- [21] S. A. Bustin and T. Nolan, "Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction," *Journal of Biomolecular Techniques*, 15(3), 155-166, 2004.
- [22] "What are the advantages and disadvantages of one step vs. two setp RT-PCR?" *Integrated DNA Technologies, Inc.*, s.f., (web), 7 de octubre 2018. Disponible en: <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/what-are-the-advantages-and-disadvantages-of-one-step-vs.-two-step-rt-pcr>
- [23] E. Prediger, "Starting with RNA--one-step or two-step RT-qPCR?" *Integrated DNA Technologies, Inc.*, 2016, (web), 7 de octubre 2018. Disponible en: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/one-step-two-step>
- [24] N. M. Rodriguez, W. S. Wong, C. M. Klapperich, *et al.*, "A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples," *Lab Chip*, 16, 753-763, 2016.
- [25] A. Kunze, M. Dilcher, M. Seidel, *et al.*, "On-Chip Isothermal Nucleic Acid Amplification on Flow-Based Chemiluminescence Microarray Analysis Platform for the Detection of Viruses and Bacteria," *Analytical Chemistry*, 88, 898-905, 2016.
- [26] U. F. Abdullahi, R. Naim, A. A. Baig, *et al.*, "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), An Innovation in Gene Amplification: Bridging the Gap in Molecular Diagnostics; A Review," *Indian Journal of Science and Technology*, 8(17), 1-12, 2015.
- [27] "Multiplex PCR," *PREMIER Biosoft*, s.f., (web), 8 de noviembre 2017. Disponible en: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/multiplex-pcr.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html)

- [28] P. E. Guevara-Pantoja, R. J. Jiménez-Valdés, G. A. Caballero-Robledo, *et al.*, “Pressure-actuated monolithic acrylic microfluidic valves and pumps,” *Lab Chip*, 18, 662-669, 2018.
- [29] T. Chia-Wen, “Polymer Microfluidics: Simple, Low-Cost Fabrication Process Bridging Academic Lab Research to Commercialized Production,” *Micromachines*, 7, 225, 1-11, 2016.
- [30] P. Poltronieri and Y. Hong, “Applied Plant Genomics and Biotechnology,” 1<sup>st</sup> Edition, *Woodhead Publishig*, 195-212, 2015.
- [31] “18S rRNA, the Best Internal Control,” *Thermo Fisher Scientific*, s.f. (web), 10 de octubre 2018. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/rtqcr-analysis/general-articles/using-18s-rna-as-an-internal-control-for-relative-rt-pcr.html>
- [32] Banco Nacional de ADN Carlos III, “Programa Control de Calidad de Muestras,” *Universidad de Salamanca*, s.f., (web), 13 de octubre 2018. Disponible en: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- [33] Applied Biosystems, “Introducción al PCR en tiempo real Sistema StepOne y StepOne Plus,” *Curso Teórico-Práctico de PCR Tiempo Real y sus aplicaciones*, 1-38, s.f.
- [34] Applied Biosystems, “Introducción al PCR en tiempo real Cuantificación Relativa para Expresión génica y Determinación de número de Copias,” *Curso Teórico-Práctico de PCR Tiempo Real y sus aplicaciones*, 1-15, s.f.
- [35] P. Vázquez-Vergara, E. C. Poiré, G. A. Caballero-Robledo, *et al.*, “Microfluidic flow spectrometer,” *J. Micromech. Microeng.*, 27, 077001, 1-10, 2017.
- [36] Multicomp, “High Power LED,” *Octopart*, 1-2, 2008. (web), 14 de octubre 2018. Disponible en: <https://datasheet.octopart.com/OSW-6303-Multicomp-datasheet-7127953.pdf>

- [37] "Tratamiento hidrofílico," *Thierry Plasma Science and Technology*, s.f., (web), 20 de agosto 2018. Disponible en: <https://www.thierry-corp.com/mx/plasma/conceptos-fundamentales/tratamiento-hidrofílico/>
- [38] "Vapor Pressure", *Purdue University*, s.f., (web), 17 de octubre 2018. Disponible en: <https://www.chem.purdue.edu/gchelp/liquids/vpress.html>
- [39] J. Kim, D. Byun, H. H. Bau, *et al.*, "A Disposable, Self-Contained PCR Chip," *Lab Chip*, 9(4), 606-612, 2009.
- [40] S. H. Lee, J. Song, L. P. Lee, *et al.*, "Bubble-free Rapid Microfluidic PCR," *Biosensors and Bioelectronic*, (web), 18 de agosto 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.005>
- [41] C. D. Ahrberg, B. R. Ilic, P. Neuzil, *et al.*, "Handheld real-time PCR device," *Lab Chip*, 16, 586-592, 2016.