

Plataforma microfluídica para el estudio con imagen de fluorescencia de poblaciones neuronales interconectadas mediante sinapsis

Proyecto Fin de Máster

Máster en Electrónica, Tratamiento de Señal y Comunicaciones

Realizado en:

Escuela Superior de Ingenieros, Universidad de Sevilla

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

Autor:

José Antonio Martínez López

Tutores:

Antonio Luque Estepa

Carmen Aracil Fernández

Diciembre 2012

Índice

Agradecimientos	3
1.- Introducción	4
1.1.- Descripción de la tecnología MEMS	4
1.1.1.-Procesos de fabricación	5
1.1.2.-Materiales	8
1.2.- Conceptos de Neurociencia	13
1.2.1- La transmisión sináptica	13
1.2.2.- Cultivos de neuronas primarios	16
1.2.3.- Imagen de fluorescencia	18
1.3.- Tecnología y Neurociencia: visión histórica	21
2.-Objetivos	24
3.- Plataforma microfluídica	28
3.1.- Diseño	28
3.2.- Fabricación	30
3.3.- Resultados	36
4.- Estudio de la sinapsis en cultivo de neuronas con imagen de fluorescencia	39
4.1.- Materiales y métodos	39
4.1.1.- Preparación de los cubreobjetos	39
4.1.2.- Cultivo de astrocitos	40
4.1.3.- Cultivo de neuronas	42
4.1.4.- Set-up de imagen	43
4.2.- Resultados	45
4.2.1.- Monitorización del calcio sináptico usando syGCaMP3	45
4.2.2.- Monitorización de la exo- endocitosis de vesículas sinápticas usando Vglut-pH....	46
5.- Siembra de neuronas en la plataforma microfluídica	48
5.1- Métodos	48
5.2- Resultados	49
6.- Conclusiones	54
7.- Direcciones futuras	55
8.- Bibliografía	57

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría comenzar agradeciendo toda la ayuda que he recibido a la hora de llevar a cabo este proyecto, y sin la que no hubiera sido posible su realización. Comenzando por la Escuela Superior de Ingenieros, quiero darle las gracias a mi tutora la Prof. Carmen Aracil Fernández, de quién he aprendido todo lo que sé hasta hoy sobre tecnología de microsistemas.

Por otro lado, me gustaría dar las gracias al Prof. Rafael Fernández Chacón del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) por permitirme desarrollar la parte biológica de este proyecto en su laboratorio, pudiendo hacer uso de todos los recursos disponibles al alcance. También dar las gracias a Alejandro Arroyo, M^a Carmen Rivero, la Dra. Fabiola Mavillard, Leonardo Gómez, Ángela Lavado, el Dr. Josif Mircheski y el Dr. José Luis Nieto, miembros del grupo de investigación del Prof. Rafael Fernández Chacón, por todos esos consejos y buenos momentos que pasamos en el laboratorio y fuera de él. Especial agradecimiento a M^a Carmen Rivero, por la realización de los cultivos de neuronas, a Alejandro Arroyo por el soporte técnico y a la Dra. Fabiola Mavillard por la generación de los virus modificados genéticamente. Sin ellos, este proyecto no hubiera sido posible.

Además me gustaría agradecer a Miguel Parrales y Francisco del Campo de la Escuela Superior de Ingenieros por permitirme realizar en su laboratorio los sellados entre PDMS y cristal mediante el horno de plasma, así como por sus consejos.

Por último agradecer a CIBERNED (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas) la financiación aportada para mi contratación en el laboratorio del Prof. Rafael Fernández Chacón.

1.- Introducción

En este proyecto se pretende desarrollar una **plataforma microfluídica con dos compartimentos interconectados por microcanales** haciendo uso de la tecnología MEMS, donde poder cultivar neuronas de forma que sus axones crezcan a través de estos microcanales, permitiendo que las neuronas de un compartimento se conecten con las del otro mediante sinapsis. La idea es disponer de un dispositivo con el que poder **estudiar las conexiones sinápticas** entre estas dos poblaciones de neuronas mediante el registro de imágenes de fluorescencia. Antes de explicar en profundidad el diseño y trabajo realizado es necesario tener claro ciertos conceptos sobre **tecnologías de microsistemas y Neurociencia**. En el apartado de tecnologías MEMS describiremos los materiales y procesos de fabricación y relativo a la neurociencia se hará una breve descripción de la **transmisión sináptica** y de cómo podemos estudiar su funcionamiento mediante **cultivos de neuronas** y el registro de secuencias de **imágenes de fluorescencia**. Finalmente se realizará una descripción histórica del impacto que ha tenido la tecnología en los avances científicos en neurociencia, describiendo también las tecnologías de vanguardia que marcarán las tendencias futuras.

1.1.- Descripción de la tecnología MEMS

Los **MEMS (*Micro-Electro-Mechanical Systems*)** son dispositivos en los que al menos una de sus dimensiones se caracteriza por estar en el rango de las micras y que en general pueden estar compuestos por cualquier conjunto de elementos que podamos encontrarnos en la escala macroscópica. La naturaleza de estos elementos puede ser eléctrica, magnética, óptica, térmica, mecánica y/o fluídica. Los MEMS poseen una serie de ventajas sobre los sistemas de mayor tamaño, como son la fabricación masiva a bajo coste, generación de componentes más sensibles, tamaño y peso reducido, pequeño consumo de energía, alta precisión y biocompatibilidad. Además podemos clasificar los MEMS en distintos tipos según su aplicación, aunque normalmente en la práctica un sistema MEMS puede pertenecer funcionalmente a varios tipos. Estos pueden funcionar como sensores para medir cambios en el ambiente, actuadores para proporcionar estímulos, MEMS de RF para transmitir o recibir señales de radiofrecuencia, MOEMS (*Micro-Opto-Electro-Mechanical Systems*) que incorporan elementos

ópticos para el procesamiento de la luz, MEMS para microfluidos que manipulan fluidos, como por ejemplo válvulas o bombas y BioMEMS, con aplicaciones en biología o medicina.

Tradicionalmente la microfabricación ha estado ligada a la tecnología de fabricación de semiconductores pero hoy en día el panorama está cambiando, apareciendo nuevos materiales y procesos. El diseño de cualquier dispositivo debe adecuarse a las restricciones que el material y los procesos elegidos imponen. Existe una amplia variedad de materiales como procesos de fabricación pero aquí nos centraremos en los procesos básicos más comunes, y en los materiales ampliamente utilizados.

1.1.1.-Procesos de fabricación

Todos los procesos en la fabricación de un dispositivo MEMS se debe llevar a cabo en ambientes controlados con baja concentración de contaminantes, y si es posible, que sea en una sala blanca. Existen muchos procesos de fabricación relacionados con la tecnología MEMS, pero aquí nos centraremos en los que se utilizarán en este proyecto. La **fotolitografía** es uno de los procesos que se utiliza en tecnología MEMS y consiste en la transferencia de un patrón a las distintas capas de un dispositivo. Este proceso está compuesto a su vez por los procesos de **deposición**, **exposición** y **revelado**. Los procesos de fabricación y los materiales se encuentran íntimamente ligados, y en este caso, el material que viene ligado al proceso fotolitográfico se denomina **fotorresina**, ya que gracias a su comportamiento fotosensible permite la transferencia de patrones en los microsistemas. Están compuestas por un polímero, un sensibilizador y un disolvente. El polímero cambia su estructura cuando está expuesto a la radiación, el disolvente permite que sea distribuida mediante giros para la formación de delgadas capas en la superficie de la oblea y el sensibilizador o inhibidor controla la reacción fotoquímica en la fase polimérica. Las fotorresinas se pueden clasificar como positivas o negativas. Si son positivas, la reacción fotoquímica durante la exposición debilita el polímero que lo compone, haciéndolo más soluble al revelador, de manera que se consigue el positivo del patrón. Sin embargo, cuando la fotorresina es negativa ocurre lo contrario, la exposición a la luz produce la polimerización de la fotorresina, y por tanto es más difícil de disolver.

Cuando se trabaja con resinas fotosensibles, el primer paso para transferirles la forma de la máscara es distribuir las homogéneamente sobre el sustrato. El proceso que se utiliza para ello

se conoce como **deposición o spin coating**. Se trata de una técnica aditiva, que suele venir acompañada por algún procesamiento térmico para obtener, además de la deposición del material, las propiedades deseadas del mismo y una buena adhesión al sustrato. Para mejorar la adhesión al sustrato de la fotorresina se suele realizar una preparación previa del sustrato. Consiste en utilizar un *promoter*, material que fomenta la buena adhesión de las fotorresinas con el sustrato. Según el tipo de que se trate, se deposita de la misma forma que la fotorresina, o bien se introduce el sustrato en un desecador con dicho *promoter* para que se adhiera por evaporación. Para ello se utiliza un equipo que se denomina **spin coater**. Está compuesto por una plataforma giratoria sobre la que se deposita la oblea que actúa de sustrato. Incorpora un sistema de vacío que se encarga de fijar dicho sustrato a la plataforma. También suelen incorporar un sistema de dosificación del material para controlar la cantidad que se va a depositar. Es decir, gracias a este aparato se vierte una cantidad de fotorresina sobre el sustrato, y tras dejar unos segundos de reposo en los que se extiende la fotorresina libremente sobre el sustrato, éste se fija y se procede a girar a una determinada velocidad para que debido a la fuerza centrífuga se obtenga una capa homogénea sobre el sustrato. En el *spin coater* se deben fijar los parámetros de la rampa de aceleración, la velocidad de giro y los tiempos de ambos procesos, en función del espesor que se desee. Para realizar deposiciones con alta resolución es importante haber caracterizado este proceso para la fotorresina y sustrato que se van a utilizar. El sustrato que se suele utilizar es una oblea de silicio, aunque hay otros materiales sobre los que se puede realizar, como por ejemplo las placas de circuito impreso.

Posterior a la deposición de la fotorresina es necesario llevar a cabo un calentamiento del sustrato denominado **softbake**. El espesor de la resina suele disminuir en un 25 % durante este proceso ya que la mayoría de los disolventes se evaporan. Por otro lado gracias a este calentamiento desaparece el efecto borde asociado al giro. El tiempo de calentamiento debe ajustarse de manera precisa ya que si se sobrepasa el tiempo necesario degradará la fotosensibilidad de la resina, o bien reduciendo la solubilidad del revelador, o bien destruyendo directamente una parte del sensibilizador. Para llevar a cabo este calentamiento se puede utilizar el horno o el *hotplate*. Es recomendable utilizar el *hotplate* en la mayoría de los casos ya que en el caso del horno, como se trata de un ambiente cerrado, el disolvente se evapora en peores condiciones.

Una vez que se ha finalizado la deposición mediante el *spin coater*, se cuenta con una capa homogénea de fotorresina y podemos pasar al proceso de **exposición** que consiste en exponer la fotorresina a radiación ultravioleta, realizando previamente el alineado con la máscara que se quiere transmitir y que suelen imprimirse en láminas de acetato. El propósito de la iluminación es suministrar luz con la intensidad, dirección, espectro característico e uniformidad tal que permita una transferencia prácticamente perfecta de la imagen de la máscara. En el diseño de la máscara se deben incluir marcas de alineación para realizar este proceso. Además, para conseguir la alineación de la máscara se hace uso de la alineadora que también se encarga de insolar la muestra. Una vez que la máscara está correctamente alineada con el sustrato, la fotorresina es expuesta a la luz a través de la máscara. Hay tres tipos de exposición: por contacto, proximidad o proyección. En el primer caso la máscara está en contacto directo con la fotorresina que va a ser iluminada. Debido a la cercanía la precisión que se alcanza es muy alta pero sin embargo los desechos que se quedan atrapados entre la máscara y en la oblea pueden dañar la máscara y hacer que aparezcan defectos. En el segundo caso, por proximidad es similar al primero pero se mantiene una separación de unas micras entre máscara y oblea. Esta separación disminuye los defectos de la máscara. Por último, los sistemas por proyección mantienen una separación de centímetros entre ambos, evitando completamente los desperfectos de la máscara. No obstante, para mantener una resolución alta, sólo se trabaja con una pequeña parte de la imagen. En general se pretende obtener una imagen 1:1 con respecto a la máscara, pero para otras ratios se debe hacer uso de sistemas de proyección. Para procesos con una alta resolución es conveniente realizar una fase de calibrado respecto a la exposición, ya que la elección de la dosis y tiempo de exposición es fundamental.

Inmediatamente tras la exposición es necesario realizar un calentamiento, denominado en este caso **postbake**.

El último paso del proceso litográfico es el **revelado** y es el responsable de transformar la imagen latente en la resina durante la exposición a la luz ultravioleta a una imagen activa. Durante el proceso de revelado se lleva a cabo el proceso de disolución selectiva de la fotorresina. Según sea una fotorresina positiva o negativa se verá atacada la parte iluminada o la no iluminada de la máscara. Se utilizan dos tipos de técnicas, el revelador húmedo, que es el

más utilizado, y el revelador seco, que se utiliza en algunas aplicaciones de alta resolución. El método más común consiste en un ataque húmedo mediante inmersión dentro de una cubeta. El tiempo de revelado depende del espesor de la capa, y se puede encontrar en la hoja de características del fabricante. Si las dimensiones del dispositivo son muy pequeñas se necesitará realizar esta inmersión en el revelador con ayuda de un sonicador, que agita la mezcla mediante la aplicación de ultrasonidos. Gracias a este instrumento el revelador puede entrar y salir de las cavidades micrométricas que pueda haber en el diseño. Tras el revelado es necesario un lavado y secado del dispositivo para eliminar cualquier resto posible de revelador que pueda dañar al dispositivo.

1.1.2.-Materiales

Descritos ya los procesos de fabricación nos centramos ahora en los materiales asociados a la microfabricación. Se ha comentado la relevancia histórica del silicio pero hoy en día existe una importante tendencia a la utilización de polímeros como son el **SU-8** y el **PDMS**, que son de hecho los que utilizaremos para fabricar nuestro dispositivo microfluídico.

Antes de comenzar hablando de los polímeros empezamos describiendo las características de las **placas de circuito impreso** (*Printed Circuit Board*) ya que en nuestro caso será el soporte mecánico durante la fabricación del dispositivo. Las PCB están sustituyendo al silicio en el desarrollo de microsistemas dando lugar a lo que se conocen como dispositivos PCB-MEMS. El material del que están hechas la mayoría de las placas de circuito impreso es **FR-4** (*Flame Retardant 4*). Está compuesto por un tejido entrelazado de fibra de vidrio con un *epoxy*. Las ventajas de esta tecnología son las siguientes:

- Bajo coste. En comparación con el silicio es una tecnología extremadamente barata.
- Tecnología madura.
- Prototipado rápido y fácil.
- Alta integración. Se pueden integrar tanto dispositivos microfluídicos como dispositivos electrónicos.

Una vez descrito las PCB continuamos con los **polímeros**, que son macromoléculas generalmente orgánicas, formadas por la unión de moléculas más pequeñas denominadas

monómeros. Mediante la polimerización se sintetiza un polímero a partir de sus monómeros. Los polímeros difieren en sus propiedades mecánicas, características ópticas, estabilidad en la temperatura, resistencia a productos químicos como son ácidos, alcalinos o soluciones orgánicas existiendo también polímeros biodegradables. Una posible clasificación de los polímeros se basa en la igualdad de los monómeros que lo componen. De esta forma, los homopolímeros están compuestos por monómeros del mismo tipo y por el contrario los copolímeros están compuestos por monómeros de distinto tipo.

El SU-8 surge en los laboratorios de investigación IBM Zurich en los años 90. Se trata de una fotorresina que puede ser mecanizada mediante procesos fotolitográficos tradicionales de la industria electrónica obteniendo paredes prácticamente verticales. Puesto que no son necesarias instalaciones de alto coste para su tratamiento y presenta unas características mecánicas, químicas y ópticas muy buenas, además de verse reducidos los tiempos de fabricación, el SU-8 es ampliamente utilizado en la industria de microsistemas.

El SU-8 es una resina *epoxy* negativa sensible a la radiación ultravioleta que está disuelta en un disolvente orgánico. La resina *epoxy* es el copolímero bisphenol-A/formaldehído Novolac en un disolvente orgánico, que será ciclopentanona o gamma-Butirolactona (GBL), según el caso, y junto al generador fotoácido que pertenece a la familia de sales de triaril sulfonio. La cantidad de disolvente determina la viscosidad, y por tanto el rango de espesores posibles, extendiéndose desde el centenar de nanómetros hasta el milímetro. Este material se procesa con las técnicas de litografía que han sido descritas anteriormente.

A continuación describimos las propiedades que lo han convertido en uno de los materiales fundamentales en microsistemas:

- Verticalidad en las paredes y altas relaciones de aspecto.
- Alta transparencia. Esta propiedad permite visualizar líquidos dentro de un dispositivo y la posibilidad de integrar dispositivos ópticos.
- Biocompatibilidad.
- Resistencia química.
- Deposiciones uniformes y muy bajo efecto de borde.

Este material es comercializado por **MicroChem** y en este proyecto se usará la familia **SU-8 2000**. En la figura 1 se muestra un ejemplo de fabricación con SU-8 de las paredes de un microcanal mediante el proceso de litografía, donde se observan las fases de deposición, exposición y revelado que hemos comentado anteriormente.

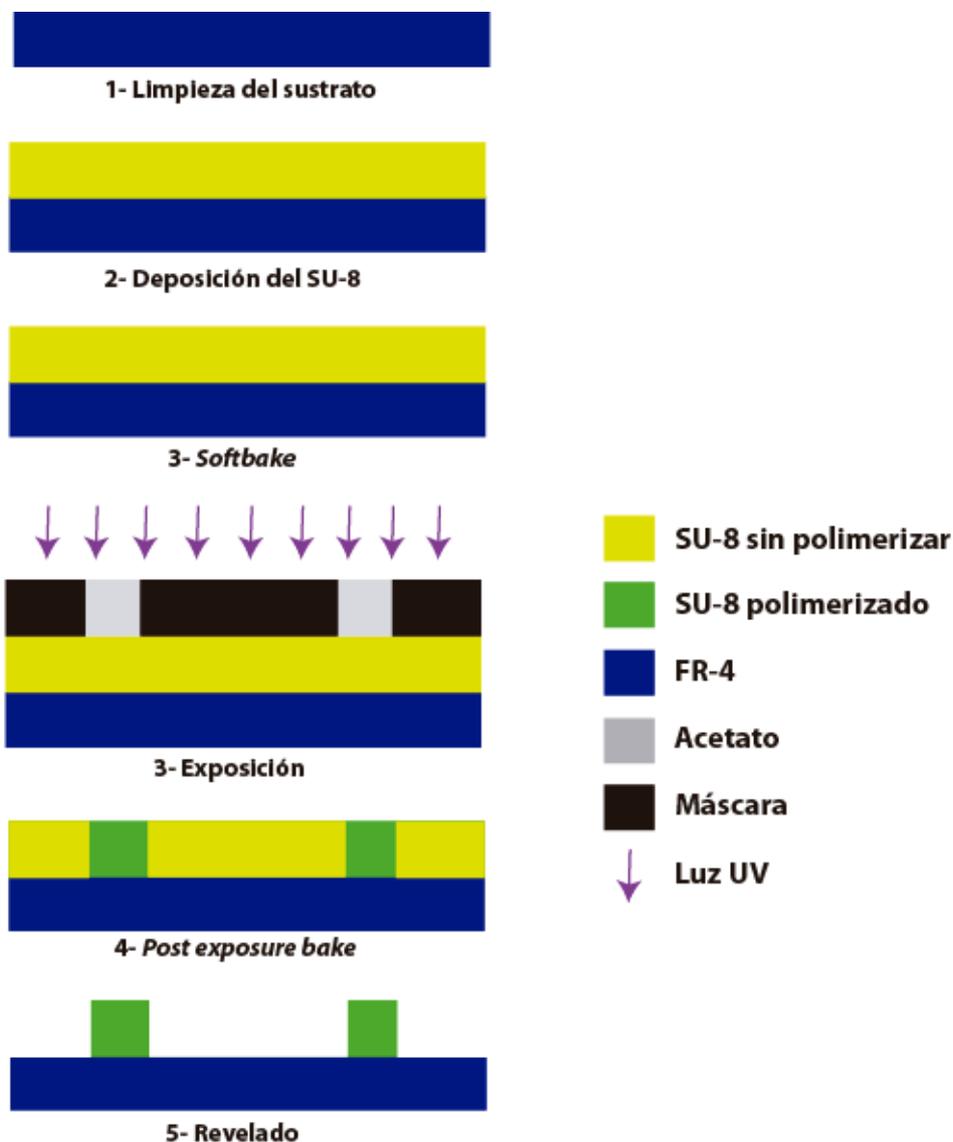


Figura 1: Proceso de fabricación con SU-8 de las paredes de un microcanal.

A continuación describimos los parámetros que proporciona el fabricante para llevar a cabo una fabricación, teniendo en cuenta de que esta información es general y que debe adaptarse a cada laboratorio. En la tabla 1 podemos ver los tiempos de *softbake*, *postbake* y revelado proporcionados por el fabricante para la familia SU-8 2000. Tanto el *softbake* como el *postbake* constan de 2 fases, una a 65 °C y otra a 95°C.

Espesor (μm)	<i>Softbake</i>		<i>Postbake</i>		<i>Revelado</i>
	Tiempo a 65°C (min)	Tiempo a 95°C (min)	Tiempo a 65°C (min)	Tiempo a 95°C (min)	Tiempo (min)
25-40	0-3	5-6	1	5-6	4-5
45-80	0-3	6-9	1-2	6-7	5-7
85-110	5	10-20	2-5	8-10	7-10
115-150	5	20-30	5	10-12	10-15
160-225	7	30-45	5	12-15	15-17

Tabla 1: Tiempos de *softbake*, *postbake* y revelado para el SU-8 2000.

Por otro lado tenemos el **PDMS** que se trata del polímero orgánico basado en silicio más utilizado en la fabricación de dispositivos microfluídicos para aplicaciones biomédicas. Entre las ventajas que presenta destaca la sencillez en la fabricación y su bajo coste. A continuación presentamos las propiedades que presenta este material:

- Transparencia. Esta propiedad permite el uso de sensores ópticos y la visualización de líquidos.
- Biocompatible.
- Químicamente inerte. El PDMS no reacciona ante la mayoría de reactivos. También puede ser oxidado por exposición al plasma, de forma que se puede atacar su superficie.
- Isotrópico y homogéneo con una buena estabilidad térmica.
- Respetuoso con el medio ambiente e ignífugo.
- Buena adhesión al silicio y vidrios.
- Compatibilidad con otros materiales y procesos de fabricación.
- Elástico.

Con el PDMS se suele usar el **moldeado**, que consiste en realizar un molde con la geometría deseada, normalmente en SU-8 mediante litografía tal y como hemos descrito anteriormente, para posteriormente rellenarlo de PDMS. Tras un tratamiento térmico se retira el molde y se obtiene la estructura PDMS, ya que existe baja adherencia entre ambos materiales. A esta técnica se le denomina **soft lithography**. Para explicar de forma sencilla este proceso

planteamos la fabricación de dos microcanales. En la figura 2 podemos ver los pasos a seguir. El primer paso consiste en fabricar un molde en SU-8 mediante litografía tal y como hemos comentado anteriormente. Para ello necesitamos un soporte donde depositar nuestro SU-8, que normalmente suele ser silicio, pero en la figura se observa un soporte de FR-4. En la figura 2 se observa que el SU-8, que sirve como molde para los microcanales no está directamente sobre el material FR-4 sino sobre una capa extra de SU-8 denominada **capa semilla**. Esta capa suele ser importante en muchas aplicaciones para mejorar la adherencia al sustrato de ciertas estructuras. Una vez que tenemos el molde en SU-8 necesitamos crear un recipiente para verter el PDMS. Para ello se suele usar papel de aluminio con el que rodeamos nuestro molde. Al mismo tiempo que se elabora el molde de SU-8 se puede ir preparando el PDMS.

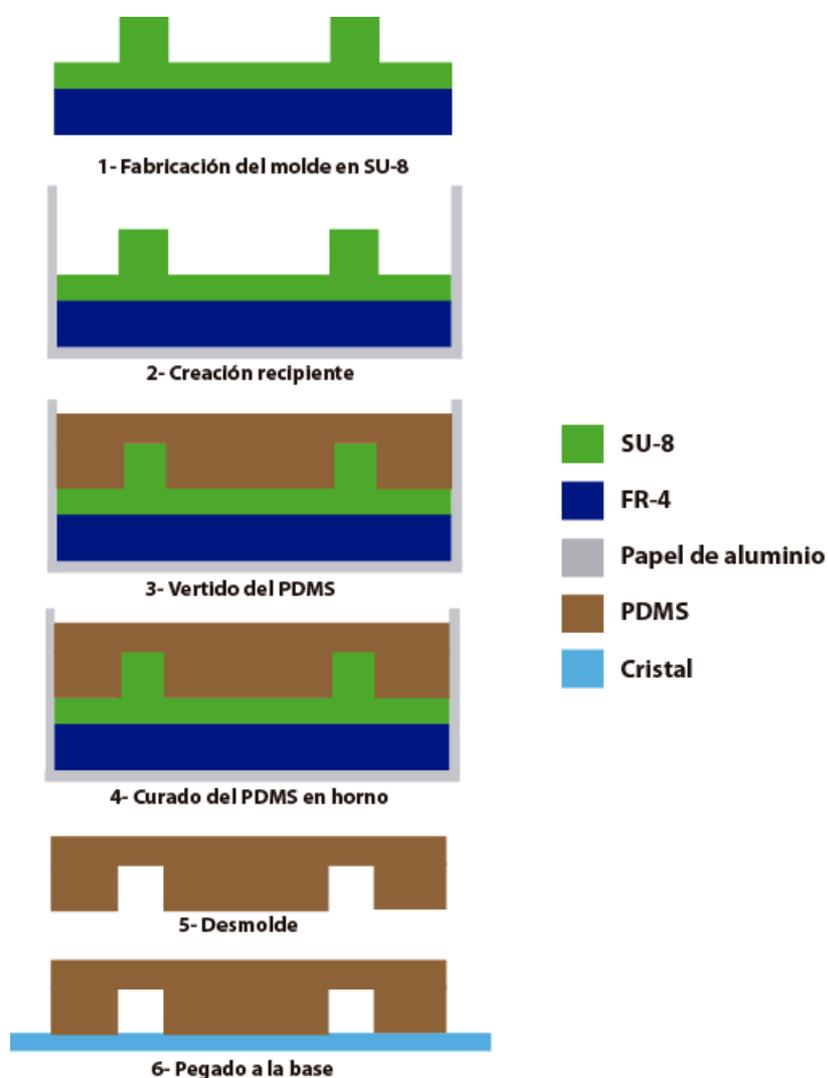


Figura 2: Sección transversal de dos microcanales fabricados mediante *soft lithography*.

El PDMS se compra en forma de dos productos: el polímero y el agente curante. La proporción de la mezcla hará que se cure más o menos rápidamente según interese, pero suele usarse normalmente una relación 10:1. Esta mezcla se debe introducir en una cámara de vacío para eliminar todas las burbujas que pueda contener. Tras verter el PDMS se realiza el curado en un horno. Al finalizar el curado el PDMS se desmolda teniendo de esta forma los microcanales grabados en el material. El último paso consistiría en pegarlo a una base, que podría ser de diferentes materiales, dependiendo de la aplicación. Para nuestro caso será de interés pegar el PDMS a un cristal a través del cual podamos observar el interior de los microcanales.

1.2.- Conceptos de Neurociencia

1.2.1- La transmisión sináptica

Las sinapsis son conexiones entre células excitables del sistema nervioso (neuronas) o con otras células como las musculares o células glandulares. La sinapsis se produce entre un par de células, la presináptica, y la postsináptica. Al espacio entre estas dos células se le denomina hendidura sináptica. A la **transmisión de información** de una célula a otra se le denomina transmisión sináptica. En las sinapsis químicas la información que recorre el axón de una neurona en forma de impulsos eléctricos se transforma en una señal química que atraviesa la hendidura sináptica. Cuando esta señal química llega a la membrana postsináptica se vuelve a convertir en una señal eléctrica. La sustancia química que atraviesa la hendidura sináptica se denomina neurotransmisor, que es almacenado y liberado en unas vesículas contenidas en la célula presináptica: las vesículas sinápticas. En el hipocampo podemos encontrar básicamente dos tipos de células, las células glutamatérgicas que liberan glutamato y las células GABAérgicas, que liberaran GABA. Estas vesículas se fusionarán con la membrana presináptica para liberar a los neurotransmisores en la hendidura sináptica en un proceso denominado exocitosis.

Las proteínas que recubren la membrana postsináptica reciben el nombre de densidad postsináptica. Aquí es donde se encuentran los receptores de neurotransmisor que convierten la señal química de la hendidura sináptica en una señal eléctrica dentro de la célula postsináptica. Por todo ello será necesario que exista un mecanismo que sintetice y reponga el neurotransmisor en las vesículas sinápticas, otro mecanismo que libere el neurotransmisor de

las vesículas ante la llegada de un **potencial de acción** (señal eléctrica que transmite la información a través del sistema nervioso), un mecanismo para producir una respuesta eléctrica ante la llegada del neurotransmisor en la célula postsináptica y un mecanismo para extraer al neurotransmisor de la hendidura sináptica. La transmisión sináptica requiere la síntesis de los neurotransmisores y que éstos estén listos para su liberación. Dependiendo del neurotransmisor en concreto así será su síntesis. Una vez que los neurotransmisores han sido sintetizados es necesario que sean captados por las vesículas sinápticas. De esta misión se encargan los transportadores, que son proteínas que se encuentran fijadas en la membrana de la vesícula. La liberación del neurotransmisor se debe a la llegada de la señal denominada potencial de acción. Esto produce la apertura de los canales de calcio regulados por voltaje. Esto hace que aumente la concentración interna de calcio debido a que en el interior celular la concentración es muy baja y en el exterior es más alta. Esta será la señal que activa la liberación del neurotransmisor de las vesículas. En el proceso de exocitosis la membrana de la vesícula se une con la membrana presináptica y permite que su contenido se vacíe en la hendidura sináptica. En presencia de un calcio elevado las proteínas de la membrana presináptica y la membrana de la vesícula alteran su conformación de forma que ambas se unen formando un poro por el cual el neurotransmisor escapa. Este poro continúa expandiéndose hasta que la vesícula se funde totalmente con la membrana celular. Posteriormente la membrana de la vesícula es recuperada mediante el proceso de endocitosis, llenándose ésta de neurotransmisor y volviéndose a repetir el ciclo. En la figura 4 mostramos un esquema de las etapas del ciclo de las vesículas sinápticas. Los neurotransmisores liberados en la hendidura sináptica se unen a **proteínas receptoras** que se encuentran fijadas en la densidad postsináptica. Esto provoca en las proteínas receptoras ciertos cambios conformacionales pudiendo provocar la apertura de un poro. En ausencia de neurotransmisor el poro se encuentra cerrado. Con el poro abierto podrán circular iones a través de él (Na^+) cambiando de esta forma la diferencia de potencial existente entre el exterior de la célula y el interior teniendo así una señal eléctrica en la célula postsináptica. El **potencial excitador postsináptico** (EPSP, *Excitatory Postsynaptic Potential*) es un incremento del potencial de membrana postsináptico (diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula postsináptica) debido al flujo de iones positivos que se mueven hacia dentro de la célula

postsináptica. Al flujo de iones que causa un EPSP se le denomina corriente excitadora postsináptica (EPSC, *Excitatory Postsynaptic Current*). Los EPSPs son aditivos, es decir, el efecto de muchos EPSPs simultáneos sobre la misma neurona pueden sumarse. Para que en la célula postsináptica se produzca una señal eléctrica que se propague por toda la célula (potencial de acción) es necesario alcanzar un cierto umbral de potencial. El potencial de acción será el encargado de activar nuevas liberaciones de neurotransmisor en las sinapsis siguientes. Para poder alcanzar el umbral necesario para que se produzca un potencial de acción es necesaria la liberación de un mínimo número de moléculas de neurotransmisor. La liberación de neurotransmisor desde la vesícula también se produce de forma espontánea sin la necesidad de ser estimulada por un potencial de acción, produciéndose de esta forma EPSPs espontáneos también llamados **potenciales miniatura (mEPSPs)**. Si en lugar de considerar potenciales consideramos corrientes tendremos **corrientes miniatura (mEPSCs)**.

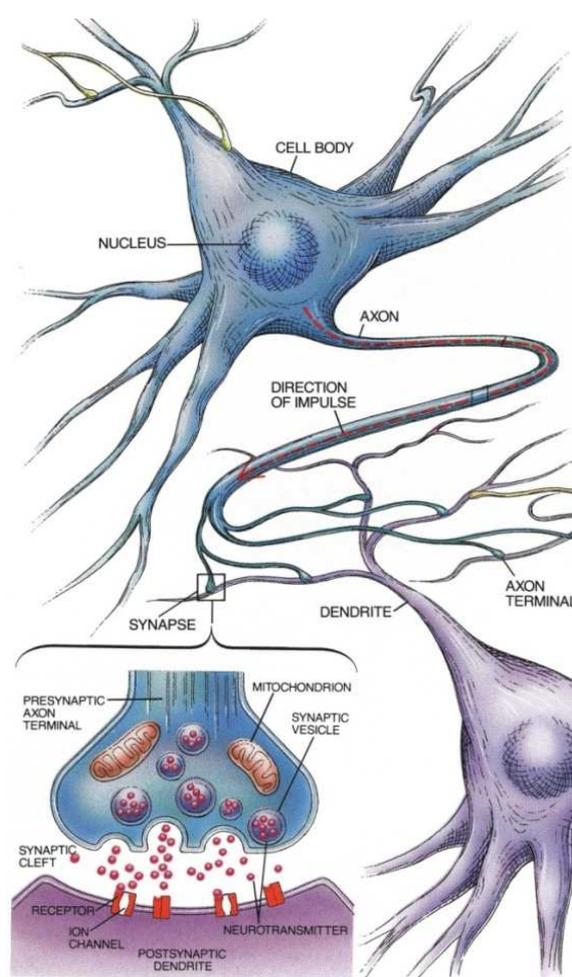


Figura 3: La transmisión sináptica. Tomado de Fischbach, 1992.

Una vez que el neurotransmisor ha interactuado con los receptores postsinápticos, debe ser eliminado de la hendidura sináptica. El principal mecanismo será la recaptación del neurotransmisor mediante la acción de unas proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana presináptica. Una vez que el neurotransmisor vuelve al interior de la célula presináptica éste puede ser eliminado o volver de nuevo al interior de una vesícula. Otras formas mediante las cuales se puede eliminar el neurotransmisor de la hendidura son por mera difusión fuera de ella o bien por eliminación enzimática en la hendidura. En general no existen dos neurotransmisores que se unan al mismo receptor, pero sí un neurotransmisor puede unirse a muchos receptores distintos.

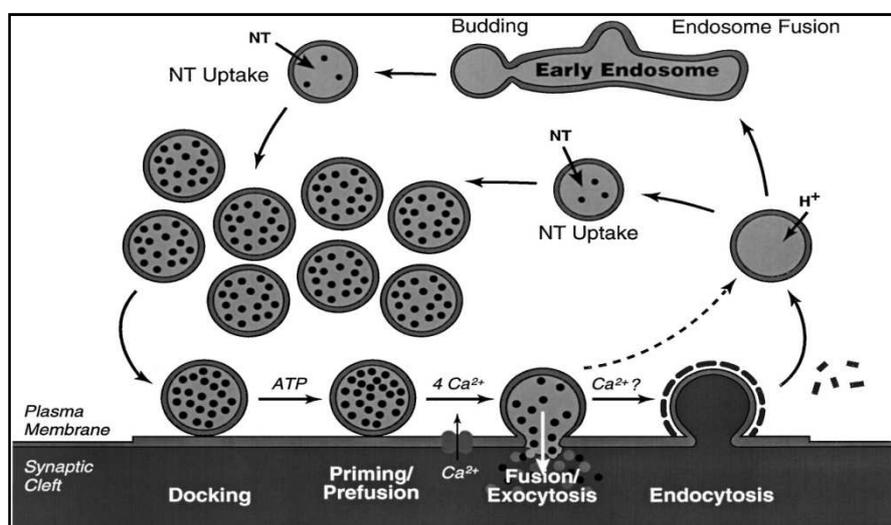


Figura 4: Ciclo de las vesículas sinápticas. Tomado de Fernández Chacón y Südhof, 1999.

1.2.2.- Cultivos de neuronas primarios

Mediante un cultivo celular podemos mantener células vivas fuera de su entorno natural bajo unas condiciones controladas. Este tipo de técnica es muy usada en el campo de la neurociencia ya que permite disponer de un modelo neuronal que tiene la gran ventaja de ser fácilmente manipulable. Los cultivos neuronales primarios se obtienen a partir de neuronas de organismos recién nacidos. Al extraer las neuronas se siembran en una placa donde crecerán y comenzarán a establecer conexiones sinápticas unas con otras. Este crecimiento se produce de forma aleatoria llegando a tener circuitos neuronales que no mantienen la estructura que podemos encontrar en un organismo vivo. Esto presenta una desventaja a la hora de estudiar

circuitos neuronales concretos. Sin embargo, para otros estudios suele ser bastante común su uso. Para el estudio de conectividad en el cerebro se suelen usar rodajas de cerebro que sí mantienen la configuración de la red neuronal.

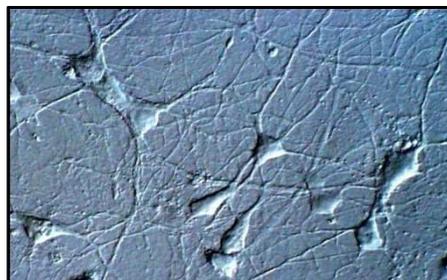


Figura 5: Cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón.

Otro de las desventajas es que hay que mantener las células en unas condiciones de esterilidad idóneas para su crecimiento evitando que se produzcan contaminaciones. Normalmente se suelen mantener en una incubadora a 37 °C y con 5% de CO₂. Además es necesario cambiar el medio donde se encuentran unas dos veces a la semana. En la figura 5 podemos ver un cultivo donde aparecen varias neuronas con sus correspondientes axones y dendritas estableciendo contactos unas con otras. Debido a la gran heterogeneidad de neuronas en el cerebro, para entender su funcionamiento los neurocientíficos clasifican las neuronas en distintos grupos. Podemos encontrarnos clasificaciones basadas en el número de neuritas, según la morfología de las arborizaciones dendríticas como por ejemplo las neuronas piramidales, basadas en las conexiones que realizan como son las neuronas sensoriales o las neuronas motoras, las clasificaciones basadas en el neurotransmisor que liberan, como pueden ser las neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas, e incluso podemos encontrar clasificaciones dependiendo del tipo de actividad eléctrica que presentan, como pueden ser neuronas de disparo rápido o disparo lento.

Hasta ahora solo hemos estado hablando de neuronas, pero en el cerebro existen otro tipo de células denominadas células gliales como son los astrocitos y oligodendrocitos. Aún poco se sabe de estas células, pero se ha demostrado que sirven de sostén a las neuronas, como por ejemplo la eliminación de tóxicos del sistema nervioso central por parte de los astrocitos o la mielinización de axones neuronales por parte de los oligodendrocitos. Cada vez más se está viendo que contribuyen de una forma más importante al procesamiento de la información en el

cerebro de lo que se consideraba hasta hace poco. Normalmente antes de sembrar las neuronas en un cultivo, se suele sembrar una monocapa de astrocitos sobre la cual sembrar las neuronas para así aumentar el tiempo de vida del cultivo.

Más adelante, en el apartado correspondiente se describe detalladamente un protocolo para la realización de cultivos de neuronas.

1.2.3.- Imagen de fluorescencia

En la actualidad, la microscopía de fluorescencia es el método más utilizado para el estudio de muestras fijadas y especímenes vivos. La fluorescencia es un fenómeno molecular por el que una sustancia que absorbe luz de una determinada longitud de onda emite fotones de mayor longitud de onda (menor energía). Durante la fase de excitación, el fluoróforo abandona su estado energético basal y alcanza un estado excitado. La fluorescencia aparece cuando el fluoróforo emite un fotón y alcanza nuevamente el estado energético basal, en cualquiera de sus estados vibracionales. Esto nos proporciona un rango de fotones de diferentes energías que genera un espectro de emisión de fluorescencia. Para capturar imágenes de fluorescencia es necesario disponer de un microscopio de fluorescencia, una cámara CCD y un sistema de adquisición de imágenes. El microscopio debe incorporar una fuente de luz como puede ser una lámpara de mercurio o de xenón que nos dan una luz con un ancho espectro, además de un juego de filtros, compuesto por un filtro de excitación, un dichroico y un filtro de emisión. Con el filtro de excitación seleccionamos la longitud de onda para excitar el fluoróforo y con el filtro de emisión recogemos la luz emitida. El dichroico nos permite reflejar hacia la muestra las longitudes de onda seleccionadas por el filtro de excitación a la vez que transmite la luz de mayor longitud de onda procedente de la emisión de la preparación. A menudo, las imágenes fluorescentes se encuentran muy degradadas debido a la luz emitida o dispersada por estructuras situadas fuera del plano de foco. La microscopía confocal es capaz de solventar este problema eliminando la luz reflejada procedente de planos fuera de foco utilizando un diafragma confocal denominado *pinhole*. La apertura del *pinhole* permite modificar la cantidad de luz que incide en los fotomultiplicadores regulando el grosor del plano focal. En los microscopios confocales no nos sirve las lámparas de fluorescencia, sino que tenemos que recurrir al uso de láseres para que la luz pueda atravesar el *pinhole*.

En el campo de la Biología existen diferentes técnicas mediante las cuales es posible marcar proteínas con fluoróforos para poder visualizarlas y cuantificarlas mediante imagen de fluorescencia. Una de estas técnicas es la inmunofluorescencia que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para el marcaje de proteínas. Para ello es necesario fijar los cultivos neuronales y permeabilizar la membrana celular para que los anticuerpos puedan entrar. Tenemos que disponer de un anticuerpo primario que marque la proteína de interés y de un anticuerpo secundario que incorpore un fluoróforo que se una al anticuerpo primario. La finalidad de este sistema es conocer las características de las proteínas de interés como son su presencia o ausencia, localización, nivel de expresión indicado por la intensidad de la señal de fluorescencia o colocalización con otras proteínas. La limitación de esta técnica es la incapacidad de realizar experimentos funcionales mientras las células estén vivas ya que es necesario fijarlas.

Para realizar experimentos funcionales en cultivos neuronales existen distintas técnicas que permiten marcar con moléculas fluorescentes proteínas, compartimentos celulares o incluso iones que se encuentran en las células como puede ser el ión Ca^{2+} . Aprovechando la capacidad infectiva de los virus, una de estas técnicas consiste en utilizar virus modificados genéticamente para internalizar ADN en las células de interés. Los virus son capaces de acceder al medio celular y liberar su ADN en el interior. Este ADN se introduce en el núcleo de la célula y se acopla al ADN propio de la célula, para así, con esta nueva información poder producir nuevas proteínas que estén ahí codificadas. La GFP o *Green Fluorescent Protein* es una proteína producida por la medusa *Aequorea Victoria* que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible cuando es excitado con luz azul. El gen, o código ADN que codifica esta proteína está aislado, tratándose de una herramienta muy importante para la Biología. Tan importante ha sido que en 2008 Martin Chalfie, Osamu Shimomura y Roger Tsien recibieron el Premio Nobel por su descubrimiento y desarrollo. Mediante vectores virales (en Biología Molecular un vector es un trozo de ADN que codifica varias proteínas) es posible generar virus modificados genéticamente que contengan el gen de la GFP de forma que cuando una célula es infectada con este virus, adoptará su material genético pudiendo producir GFP. Con estas técnicas también podemos estudiar el funcionamiento de las sinapsis de diferentes formas. Una de ellas es mediante la monitorización del calcio sináptico, ya que éste es el responsable de

producir la fusión de vesículas en el terminal sináptico para la liberación de neurotransmisor. Para ello podemos usar un indicador de calcio codificado genéticamente denominado syGCaMP3. GCaMP3 es un indicador de calcio modificado genéticamente de nueva aparición y está formado por la fusión de GFP, la calmodulina, que es una proteína que cambia su conformación con la presencia de calcio y M13 que es un péptido sintético. Para más información véase Tin y col. 2009. Estos cambios conformacionales se producen de tal forma que al incrementarse la concentración de calcio la GFP emite fluorescencia, y al disminuir deja de emitir fluorescencia. Si GCaMP3 lo unimos a una proteína sináptica denominada sinaptofisina (syGCaMP3) conseguimos que GCaMP3 se exprese junto a esta proteína en los terminales sinápticos para así poder observar el calcio presente.

Por otro lado, todas las proteínas fluorescentes presentan cierta sensibilidad al pH del medio en el que se encuentran, debido al efecto producido por los protones sobre la estructura del fluoróforo. Esta sensibilidad afecta a la longitud de onda de excitación y produce pequeñas variaciones en la emisión de fluorescencia, variaciones apenas perceptibles en el rango de valores de pH en los que nos movemos en condiciones fisiológicas. La sensibilidad al pH de la GFP es una consecuencia de la protonación o desprotonación de ciertos aminoácidos importantes que forman parte de la estructura central del fluoróforo. Unas condiciones ácidas tienden a apagar la fluorescencia de estas GFPs sensibles a pH. Existen varias proteínas denominadas **pHluorinas** derivadas de la GFP que presentan mutaciones que aumentan claramente la sensibilidad al pH dentro del rango de pHs fisiológicos. Las sondas fluorescentes genéticamente codificadas sensibles al pH se convierten en herramientas tremendamente útiles cuando son fusionadas a proteínas o a motivos proteicos específicos de ciertos orgánulos celulares. De este modo, estas proteínas de fusión permiten medir el pH de diferentes ambientes celulares. Si fusionamos las pHluorinas a la proteína de las vesículas sinápticas sinaptobrevina2 podemos disponer de una herramienta para monitorizar la **exocitosis** y **endocitosis** de vesículas sinápticas (véase Sankaranarayanan y col., 2000). A esta herramienta se le denomina **sinaptopHluorina** y aprovecha el hecho de que el pH interno de las vesículas es ácido, con valores en torno a 5.5, mientras que el pH extracelular es neutro, con valores cercanos a 7.4. En la proteína de fusión sinaptopHluorina, el dominio correspondiente a la pHluorina se sitúa en la parte interna de la vesícula sináptica, de modo

que se exponen a un rápido aumento en el valor del pH durante la exocitosis de las vesículas sinápticas. Mediante la sobre-expresión de la sinaptopHluorina en neuronas de hipocampo en cultivo ha sido posible investigar la dinámica de la exocitosis y el reciclaje de las vesículas sinápticas, profundizando en aspectos como el papel del calcio en la endocitosis o la cinética de reacidificación de las vesículas sinápticas.

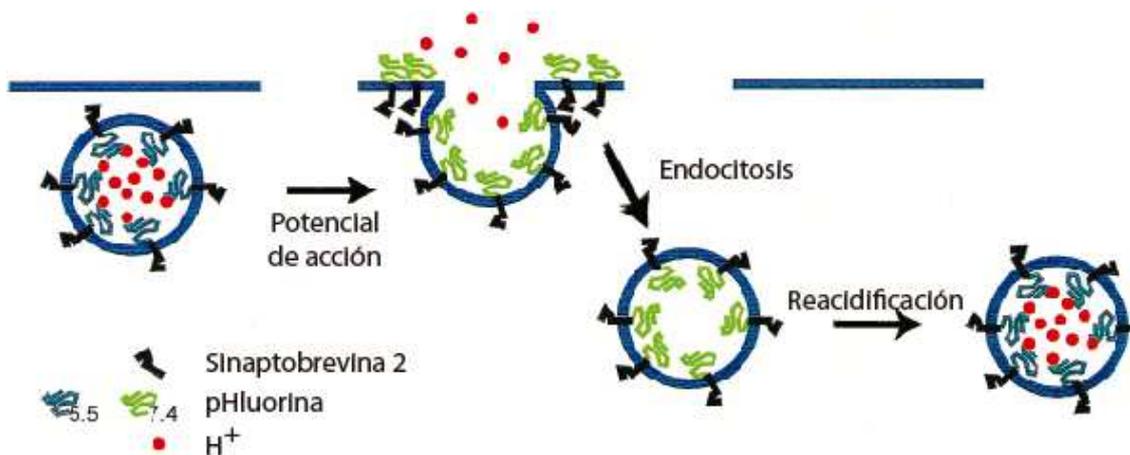


Figura 6: Funcionamiento de la sinaptopHluorina. Tomado de Sankaranarayanan y col., 2000.

En la figura 6 se muestra un esquema con el funcionamiento de la sinaptopHluorina. En estado de reposo las vesículas se encuentran internalizadas y la pHluorina se encuentra apagada puesto que está expuesta a un pH de 5.5. Al llegar potenciales de acción al terminal sináptico las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana plasmática liberando el neurotransmisor y exponiendo la pHluorina a un pH de 7.4 consiguiendo un incremento de fluorescencia. Tras la endocitosis de las vesículas se produce una reacidificación del compartimento gracias a las bombas de protones, consiguiendo apagar la sinaptopHluorina. Una variante a la sinaptopHluorina es el denominado Vglut-pHluorin o **Vglut-pH** (véase Balaji y Ryan, 2007), que tiene un funcionamiento similar, con la única variación de que está fusionado a Vglut en lugar de sinaptobrevina2. Vglut es una proteína de las vesículas sinápticas que se encarga de transportar el glutamato dentro de ellas.

1.3.- Tecnología y Neurociencia: visión histórica

A lo largo de la historia los avances científicos han ido ligado al desarrollo tecnológico pudiéndose numerar distintos hitos históricos donde nos podemos encontrar esta situación.

Centrándonos en el campo de la neurociencia, por ejemplo a finales del siglo XIX Ramón y Cajal estableció las bases de la neurociencia moderna con ayuda de la microscopía óptica. En 1963, Alan Hodgkin y Andrew Huxley recibieron el Premio Nobel por su descubrimiento sobre los mecanismos iónicos relacionados con la excitación e inhibición en las porciones periféricas y centrales de la membrana de las células nerviosas. Sus trabajos con el axón gigante de calamar pusieron de manifiesto la actividad eléctrica del sistema nervioso. Es de destacar también la concesión del Premio Nobel a Erwin Neher y Bert Sakmann en 1991 por sus trabajos sobre la función de los canales iónicos únicos en células, y que fue posible gracias al desarrollo de la técnica de *patch-clamp* desarrollada por ellos mismos y que mediante la cual se consiguieron registrar por primera vez corrientes a través de los canales iónicos de las células, véase Hamill OP y col., 1981. Hoy en día podemos encontrar instrumentación de *patch-clamp* en la mayoría de los laboratorios de electrofisiología. Relacionado con el registro de actividad eléctrica en neuronas también podemos destacar los MEAs (*Microelectrode Arrays*) que podemos considerar MEMS consistentes en una matriz de microelectrodos que sirven de interfaz entre neuronas y un circuito electrónico para el registro de actividad extracelular tanto in vitro como in vivo, permitiendo estudiar conectividad de circuitos neuronales en rodajas de cerebro.

En cuanto a la microscopía, en los últimos años se han desarrollado distintas técnicas de microscopía de fluorescencia que rompen la barrera de difracción, una limitación impuesta por el fenómeno de la difracción de la luz que no nos permite tener resoluciones espaciales más allá de aproximadamente $\lambda/(2NA)$, siendo λ la longitud de onda de la luz y NA la apertura numérica del objetivo. En la práctica esta barrera se sitúa en torno a unos 200 nm. Entre estas técnicas podemos mencionar el STED (*Stimulated Emission Depletion*), propuesta por Stefan Hell, actualmente en el Max Planck Institute for Biophysical Chemistry de Alemania y que básicamente consiste en depletar mediante emisión estimulada el borde del rayo de excitación para así poder alcanzar la superresolución, véase Hell y col., 1994. Es en los últimos años cuando están empezando a aparecer publicaciones con este tipo de tecnología. El STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) es otra técnica de superresolución que ha aparecido recientemente y que ha sido desarrollada por la profesora Xiaowei Zhuang en la Universidad de Harvard. Está basada en la reconstrucción de posiciones de moléculas únicas

marcadas con fluorescencia e identificadas estocásticamente, véase Rust y col. 2006, consiguiendo también visualizar estructuras por debajo de la barrera de la difracción, como por ejemplo las sinapsis en el sistema nervioso.

En la primera década del siglo XXI ha aparecido un nuevo campo relacionado con la neurociencia denominado optogenética, y que ha sido puesto a punto en el laboratorio de Karl Deisseroth del departamento de bioingeniería de la Universidad de Stanford. Consiste en la integración de la óptica y la genética para controlar la actividad de circuitos neuronales mediante luz en la escala de milisegundos. Mediante técnicas de biología molecular es posible conseguir que las neuronas expresen dos tipos de proteínas, la *channelrhodopsin* presente en algas verdes y que funciona como canal iónico activado por luz azul (470 nm) y la *halorhodopsin* presente en bacterias y que funciona como bomba de cloruro activada por luz ambar (617 nm). Cuando la luz incide sobre estas proteínas, se produce un trasvase de iones entre el interior y el exterior de la célula de forma que el efecto de la *channelrhodopsin* es despolarizar la neurona facilitando la generación de potenciales de acción en la célula. El papel de la *halorhodopsin* es hiperpolarizar la neurona, justamente lo contrario a la *channelrhodopsin*, lo que dificulta la generación de potenciales de acción, véase Zhang y col., 2007. La optogenética representa una técnica mucho menos invasiva para la estimulación de redes neuronales que las existentes hasta el momento, como podían ser la estimulación eléctrica o farmacológica.

2.-Objetivos

En los últimos años han aparecido varios trabajos multidisciplinares consistentes en la fabricación de dispositivos microfluídicos con aplicación en el campo de la neurobiología. En 2003 aparece un artículo de la Universidad de California, Taylor AM y col. 2003, donde se describe y caracteriza la fabricación de un dispositivo para cultivos neuronales con diversos compartimentos basado en tecnología MEMS, y que puede ser usado en numerosas aplicaciones para investigación en neurociencia. Este dispositivo está compuesto por cuatro pocillos que están conectados por dos canales principales. En la figura 7 podemos ver un esquema de este dispositivo donde se observa que cada uno de estos canales, que es lugar donde se deben situar cada una de estas poblaciones neuronales (A y B), conectan dos pocillos y además, estos dos canales principales están conectados mediante microcanales a través de los cuáles los axones y dendritas de las neuronas de un compartimento crecerán para establecer contactos sinápticos con las del otro. Los cuatro pocillos circulares sirven para proporcionar acceso para introducir las neuronas y rellenar con el medio adecuado para conseguir el crecimiento neuronal. La parte de arriba de la figura 7 muestra como sería el dispositivo en PDMS obtenido mediante *soft lithography* a partir del molde en SU-8.

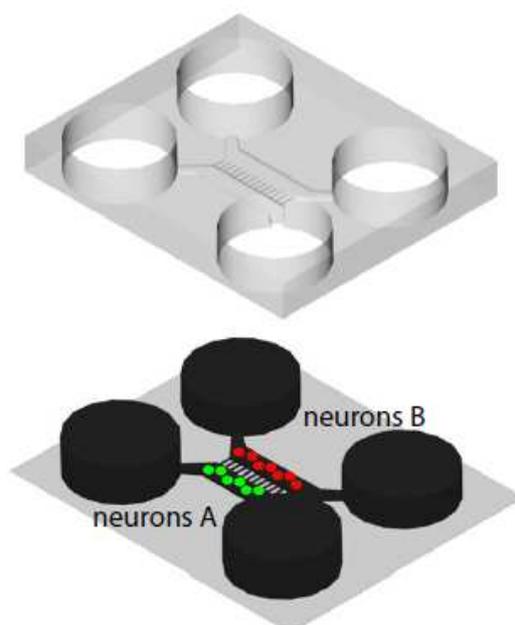


Figura 7: Esquema de la plataforma microfluídica. La figura de abajo corresponde al molde SU-8 formado por cuatro cilindros y dos canales principales que conectan dos cilindros. En estos dos canales principales deberán asentarse las dos poblaciones de neuronas (A y B) que además están conectados entre sí mediante microcanales por donde deben crecer axones y dendritas. La figura de arriba muestra el dispositivo final en PDMS obtenido mediante *soft lithography*. Aquí vemos que los cilindros se convierten en pocillos, necesarios para poder manipular el cultivo. Tomado de Taylor AM y col., 2010.

En la figura 8 se muestra el crecimiento de axones y dendritas a través de los microcanales usando imagen de fluorescencia, véase Taylor AM y col, 2010. En un dispositivo de estas características sembrado con neuronas y con dimensiones $900\ \mu\text{m} \times 7.5\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$, las neuronas de la izquierda fueron infectadas con el virus GFP-Sindbis y las neuronas de la derecha con RFP-Sindbis, lo que demuestra la posibilidad de manipular genéticamente ambas poblaciones independientemente. En estas cámaras los axones pueden crecer más allá de las $900\ \mu\text{m}$ de largo mientras que las dendritas se extienden menos de $450\ \mu\text{m}$. De esta forma se pueden identificar regiones de contacto entre axones (terminal presináptico) y dendritas (terminal postsináptico), véase Taylor AM y col, 2010.

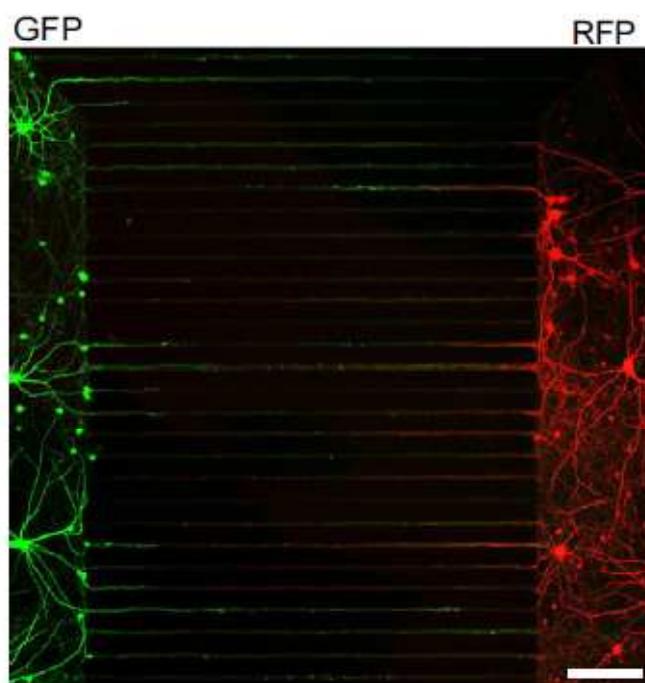


Figura 8: Imagen de fluorescencia de un cultivo de neuronas en el dispositivo microfluídico infectado con los virus GFP- y RFP-Sindbis. Podemos observar el crecimiento de axones y dendritas a través de microcanales. Barra de escala $150\ \mu\text{m}$. Tomado de Taylor AM y col., 2010.

Para comprobar si realmente se forman contactos sinápticos dentro de los microcanales se pueden realizar inmunofluorescencia para comprobar y visualizar la posición de las sinapsis. El punteado presináptico se puede determinar usando un anticuerpo anti-bassoon, una proteína presináptica, y para detectar dendritas se puede usar un anticuerpo anti-MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*) que marca la célula completamente. La figura 9 pone de manifiesto la formación de sinapsis en los microcanales ya que vemos MAP2 en verde (dendritas), bassoon

en rojo (terminal presináptico) y la colocación de ambos marcadores (se observa basoon alrededor de la dendrita). Además, los axones que se encuentran en zonas donde no hay dendritas no muestran el punteado de basoon (flechas blancas).

Este tipo de dispositivo tiene multitud de aplicaciones en neurociencia. En 2005 aparece un artículo del mismo grupo en *Nature Methods*, Taylor AM y col. 2005 donde usan este dispositivo microfluídico para aislar axones sin somas ni dendritas facilitando de esta forma el análisis bioquímico de fracciones axonales puras. También proponen esta plataforma microfluídica para modelar daño y regeneración de axones del Sistema Nervioso Central. Recientemente se ha publicado otro artículo donde usan el mismo diseño para sembrar distintos tipos celulares en cada compartimento y poder realizar un tratamiento farmacológico independiente, véase Zhang Y y col., 2012.

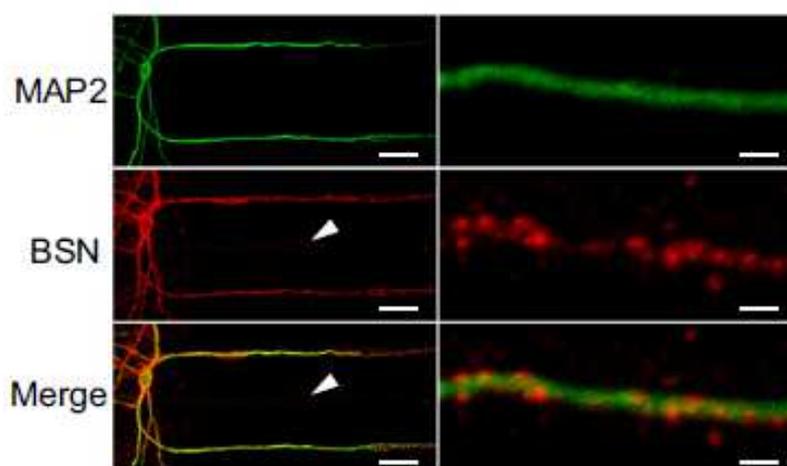


Figura 9: Inmunofluorescencia marcando Basoon (terminal presináptico) y MAP2 (dendritas). Se observa la formación de sinapsis dentro de los microcanales. Barras de escala: 21 μm para las figuras de la izquierda y 3 μm para las figuras de la derecha. Tomado de Taylor AM y col., 2010.

Como hemos visto la fabricación de dispositivos microfluídicos para la investigación en neurociencia es una tendencia relativamente nueva y que tiene una amplia proyección futura. En este proyecto se pretende fabricar una **plataforma microfluídica** basada en **tecnología MEMS** de similares características con la que **estudiar** las **conexiones sinápticas** entre dos **poblaciones de neuronas independientes** mediante el registro de imágenes de fluorescencia usando **syGCaMP3** y **pHluorinas**. Aparte de fomentar la colaboración interdisciplinar dentro de la Universidad, los objetivos específicos que se plantean en este proyecto son:

a.- Puesta a punto de un sistema para el estudio de sinapsis en cultivos primarios de neuronas mediante imagen de fluorescencia usando **syGCaMP3** y **pHluorinas**.

b.- Fabricación y puesta a punto del **dispositivo microfluídico** basado **en tecnología MEMS** para la interconexión de poblaciones de neuronas independientes usando la tecnología disponible en el laboratorio.

c.- Puesta a punto de **cultivos neuronales** dentro de la plataforma microfluídica. Comprobación de su viabilidad y el crecimiento axonal dentro de los microcanales a diferentes edades de cultivo.

d.- Puesta a punto de la **infección con virus GFP** de cultivos neuronales dentro del dispositivo microfluídico y **captura de imágenes de fluorescencia**.

3.- Plataforma microfluídica

En este apartado se describe el diseño de la plataforma microfluídica, así como el protocolo seguido para su fabricación y los resultados obtenidos.

3.1.- Diseño

El diseño que se propone en este proyecto es similar al descrito en los trabajos mencionados en el apartado anterior. En la figura 10 mostramos las dimensiones que se han elegido para nuestro diseño. Cada pocillo tiene un radio de 3.5 mm y están conectados por dos canales principales de 7 mm de largo y 2 mm de ancho. La separación de los canales principales es de 900 μm que corresponde al largo de los microcanales que conectan ambos canales principales. Además en la figura podemos ver una zona ampliada de los microcanales. Se realizaron distintos diseños con diferentes anchuras de canal en las máscaras que contienen los microcanales: 150 μm , 100 μm , 80 μm , 50 μm , 40 μm y 30 μm . Además, debido a que estos dispositivos irán montados en cubreobjetos de cristal de 30 mm apropiados para hacer imagen en un microscopio invertido, se han diseñado para que tengan un diámetro de 25 mm.

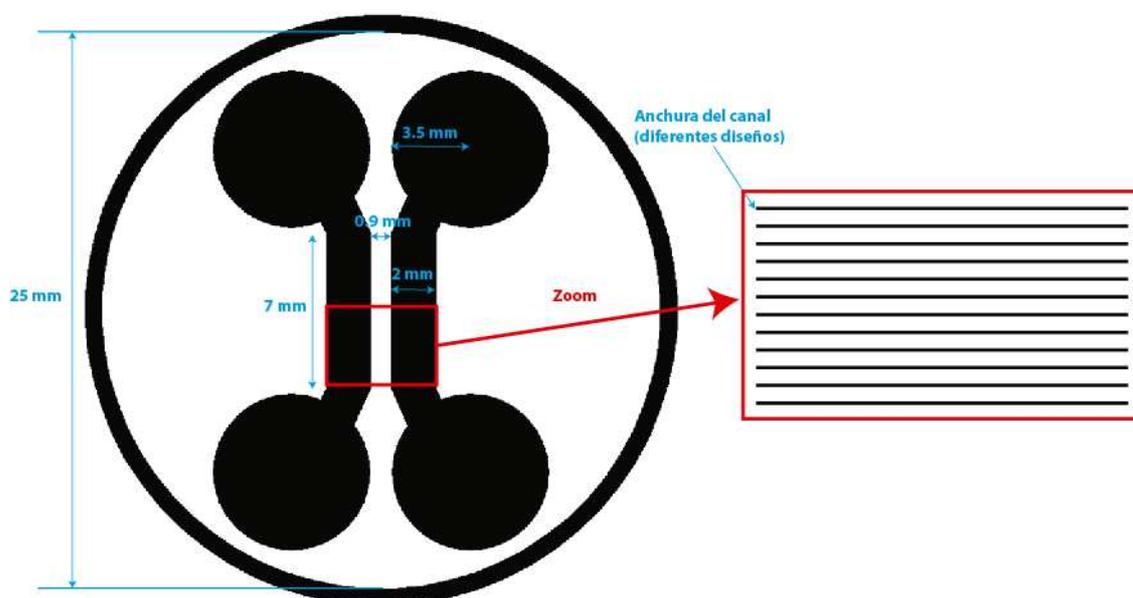


Figura 10: Dimensiones del dispositivo microfluídico.

Los esquemas mostrados en la figura 10 corresponden a las máscaras que se usarán en el proceso de fabricación, una para los pocillos y canales principales y la otra para los microcanales. Esta máscara corresponde al diseño realizado en *L-edit*, un software que se

utiliza para diseñar *layouts* de circuitos integrados y que es útil también para el diseño de máscaras en microsistemas. La máscara final será el inverso del que se muestra aquí. Además se observa que la máscara de los microcanales solapa con los canales principales (cuadro rojo) llegando a una longitud total de 5 mm. En teoría hubiera bastado con microcanales de 900 μm , justo el largo que queremos, pero en la práctica errores de alineación en las máscaras pueden llegar a ocasionar que algunos microcanales no conecten los extremos. Por ello, se ha optado por la opción más conservadora, ya que el hecho de tener canales más largos no perjudica al diseño.

Por otro lado, en la figura 11 se muestra el proceso que se ha seguido para fabricar el molde en SU-8. Se ha optado por un diseño *multilayer*, es decir, se depositan todas las capas de SU-8 necesarias y sólo se revela una sola vez. Sobre la placa PCB con sus correspondientes marcas de alineación (en el siguiente apartado de fabricación se explica cómo se realizan) se deposita el SU-8 para crear en primer lugar una capa semilla. Se decide incorporar esta capa para aumentar la adherencia de las capas posteriores. Sobre esta capa semilla se realiza una nueva deposición de SU-8, que servirá para crear los microcanales, que deberán tener una altura de unas 10 μm . Para ello se hará uso de la máscara que contiene los microcanales. Sin realizar el revelado añadimos una nueva deposición de SU-8 que nos servirá para crear los dos canales principales y los cuatro depósitos. Es necesario realizar distintas deposiciones debido a que estos compartimentos tendrán una altura distinta a los microcanales (aproximadamente 150 μm). A partir del paso 9 de la figura 11 se muestran dos cortes transversales del diseño correspondientes a la exposición con la máscara que contiene los canales principales y depósitos. Uno de ellos pasa justamente por el centro de la máscara por lo que en ese corte no se polarizará el SU-8. El otro corte que se muestra pasa por uno de los canales principales, donde la luz ultravioleta pasa a través de la máscara y por tanto polarizará al SU-8.

Hasta aquí hemos explicado el diseño que se ha elegido para fabricar el molde en SU-8. Para fabricar el dispositivo final en PDMS se sigue el proceso explicado en la introducción. Por último el PDMS se debe pegar a un cristal a través del cual poder visualizar el interior de los compartimentos. Existen dos formas de pegado del PDMS al cristal, pegado reversible y pegado irreversible, que se describirán en el siguiente apartado, donde se detallan todos los aspectos de fabricación.

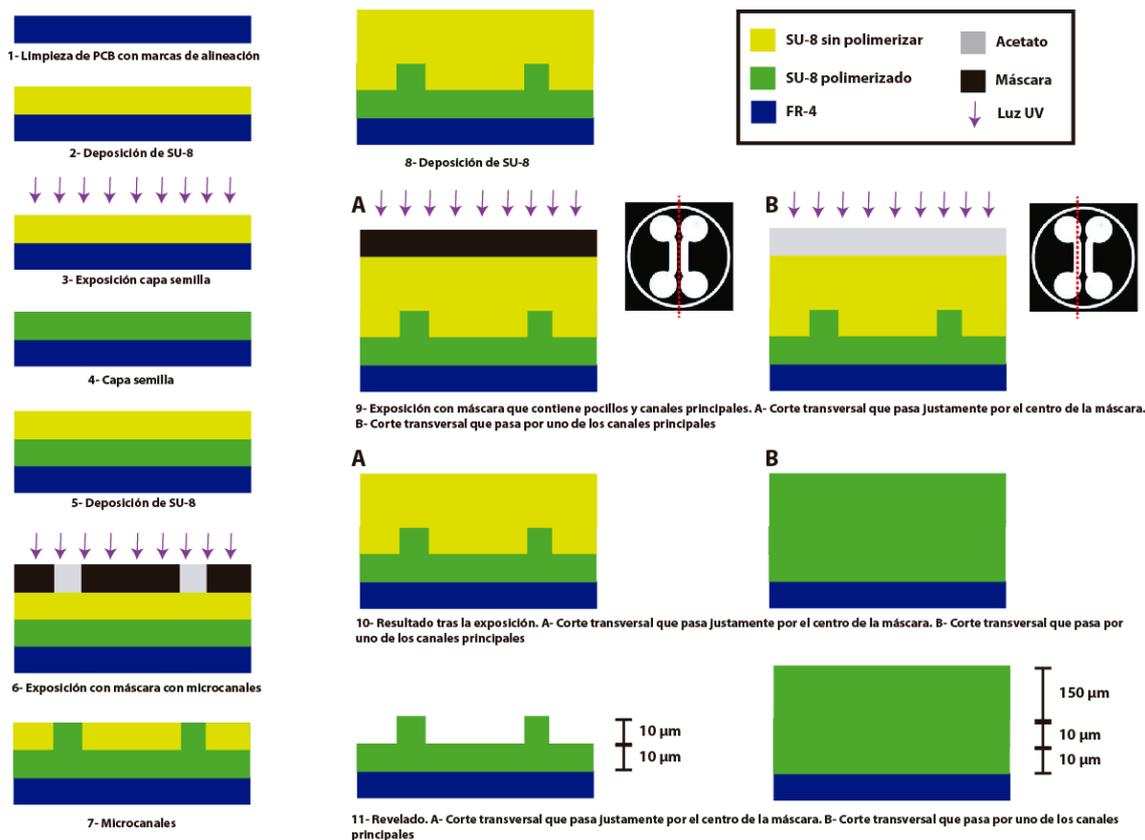


Figura 11: Cortes transversales del diseño del molde SU-8.

3.2.- Fabricación

Lo primero que debemos realizar es la fabricación de nuestras máscaras que nos servirán para el proceso de fotolitografía. Se necesitan realizar e imprimir tres máscaras: la primera necesaria para crear unas marcas de alineación que nos servirá para alinear el molde con todas las máscaras, la segunda para crear los microcanales y la tercera para crear los cuatro pocillos y los dos canales principales que conectan los pocillos y microcanales. En la figura 12 podemos ver las marcas de alineación, los microcanales, los canales principales y los pocillos durante el diseño en *L-edit*.

Puesto que vamos a usar una oblea de placa PCB de 10 cm de diámetro donde fabricaremos nuestros dispositivos, el diseño mostrado en la figura 12 lo podemos repetir para así obtener en el mismo proceso de fabricación varios de ellos. El máximo de dispositivos que caben en una oblea de 10 cm de diámetro son 9. Finalmente, en las figuras 13, 14 y 15 mostramos tres fotografías correspondientes a las tres máscaras impresas que se han usado durante el proceso de fabricación. Estas máscaras (a excepción de la máscara con las marcas de

alineación) son el negativo del diseño realizado en *L-edit*. Se observa que las máscaras de los microcanales y la de los pocillos también contienen las mismas marcas de alineación (inversas a la máscara con marcas de alineación) que serán muy útiles en el proceso de fotolitografía para la alineación en la insoladora y posterior exposición a la luz ultravioleta.

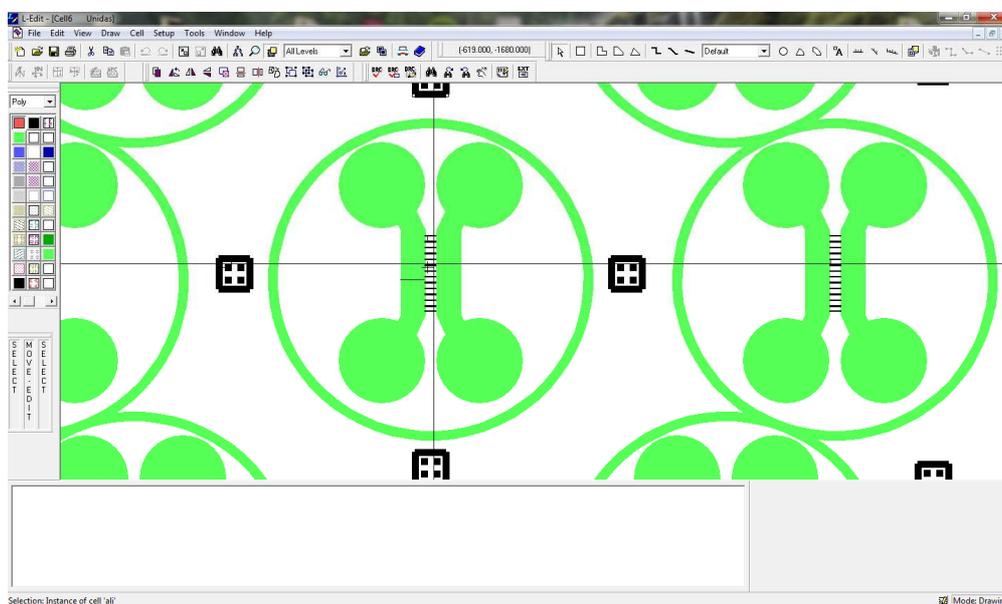


Figura 12: Diseño de las máscaras mediante el software *L-edit*.

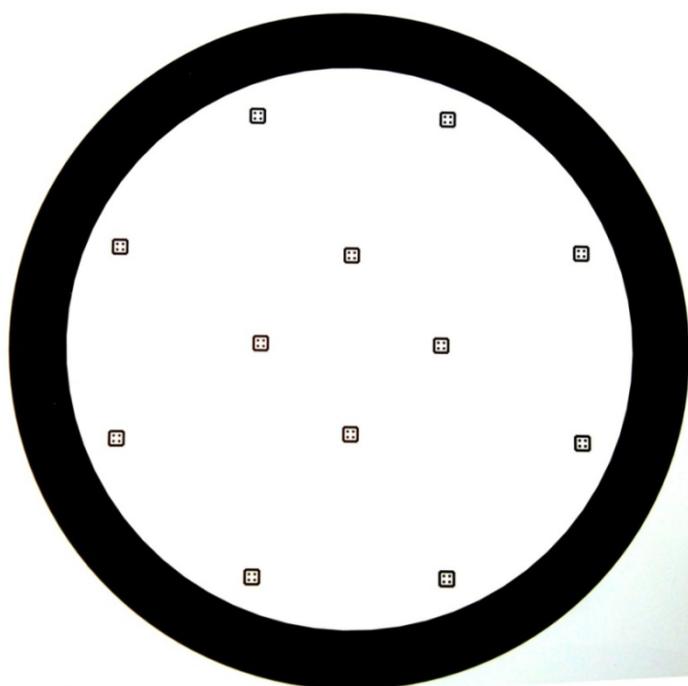


Figura 13: Fotografía de la máscara con las marcas de alineación.

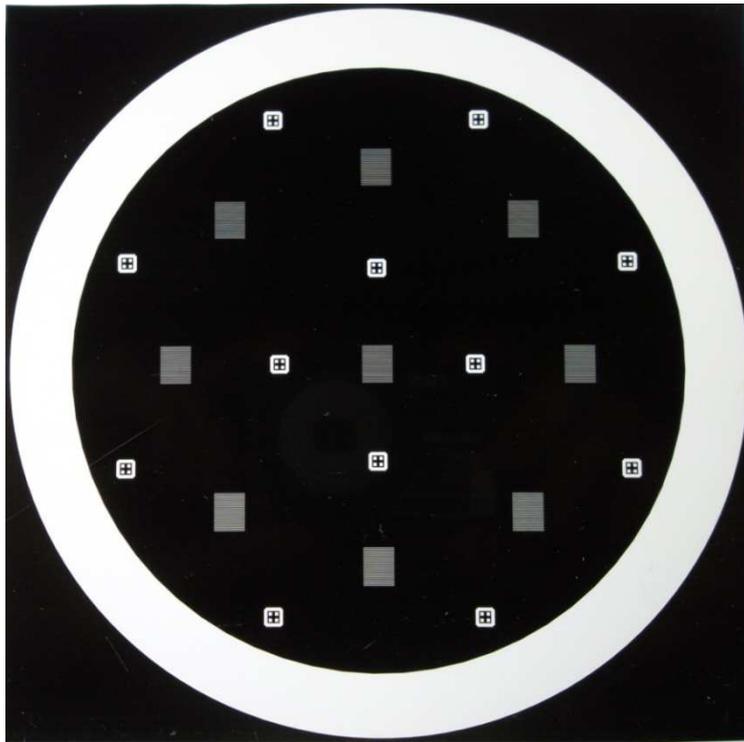


Figura 14: Fotografía de la máscara con los microcanales.

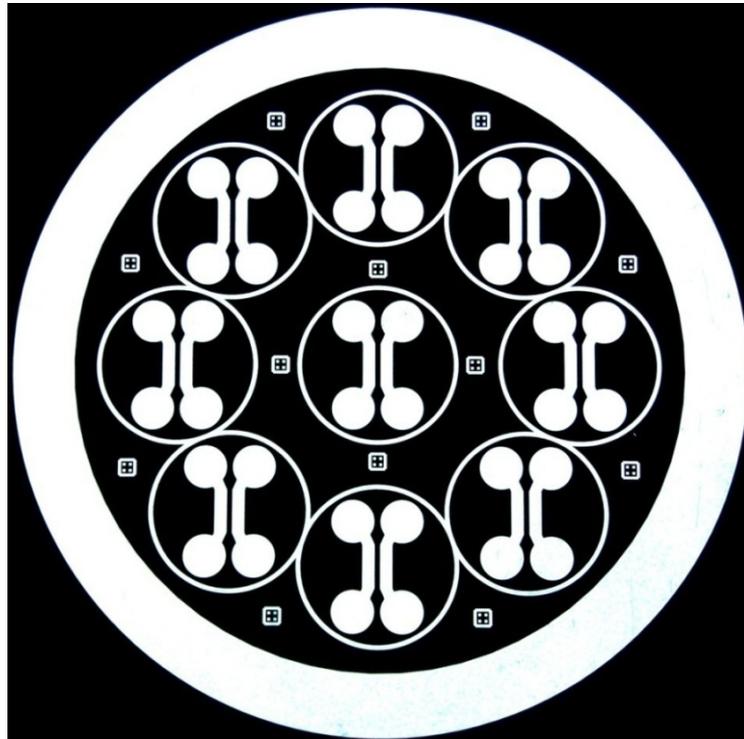


Figura 15: Fotografía de la máscara con los pocillos y canales principales.

A continuación describimos los pasos que se realizaron para la fabricación del molde en SU-8. En primer lugar se **cortaron** varias **obleas circulares de 10 cm de diámetro** a partir de una **placa PCB**, que normalmente se usan para circuitos impresos, y que nosotros la vamos a utilizar como base de nuestro molde en SU-8. Tras la deposición del SU-8 sobre la placa PCB la superficie es más irregular debido a las irregularidades que presenta el material del que está compuesto la placa PCB, lo que será un problema añadido, sobre todo cuando queramos obtener dimensiones menores. Tal y como hemos comentado, la placa PCB está compuesta por un material soporte, denominado FR4, encima del cual tenemos la capa de cobre sobre la cual tenemos otra capa de fotorresina. El siguiente paso es **limpiar la placa con acetona y quitar la pegatina protectora**. Justamente debajo encontramos la capa de fotorresina. **Usando la insoladora con la máscara que contiene las marcas de alineación exponemos la placa** con luz ultravioleta cuatro veces (diez segundos cada vez) con intervalos de descanso de al menos diez segundos entre cada vez. Después **revelamos la fotorresina** usando el revelador de placa PCB. En este caso la zona expuesta a la luz ultravioleta es la que se elimina. A continuación realizamos el **ataque ácido**, que consiste en sumergir la placa en una mezcla de agua, agua oxigenada y agua fuerte en una proporción 2:1:1 respectivamente para eliminar el cobre. Por último **limpiamos con acetona la fotorresina** que no había sido expuesta a la luz ultravioleta. Una vez que se ha llegado a este punto disponemos de la base con sus correspondientes marcas de alineación, necesarias para la colocación de las siguientes máscaras.

Realizadas las marcas de alineación se procede a la **fabricación del molde en SU-8**. En primer lugar vamos a crear una **capa semilla de SU-8** que nos servirá de soporte para el resto del molde. Para ello configuramos el **spin coater a 1500 revoluciones por minuto** y **depositamos SU-8 2005** puesto que queremos una capa semilla en torno a unas 10-15 μm de altura. Tras este paso realizamos un **softbake de 3 minutos a 65 °C y 12 minutos a 95 °C** usando el *hotplate*. A continuación enfriamos y **exponemos al ultravioleta** durante 40 s. Este paso es necesario para mantener la capa semilla. Cuando el SU-8 se expone al ultravioleta éste se mantiene tras el revelado, es decir el SU-8 se polimeriza gracias a la luz UV. Tras este paso realizamos un **post-exposure bake de 3 minutos a 65 °C y de 7 minutos a 95 °C** y enfriamos.

Una vez realizada la capa semilla procedemos a levantar la **capa** de la que se obtendrán los **microcanales**. Para ello seguimos el mismo protocolo que hemos usado para levantar la capa semilla, es decir, deposición, *softbake*, exposición y *post-exposure bake*. Puesto que queremos la misma altura que para la capa semilla usamos el **spin coater a 1500 revoluciones por minuto y SU-8 2005**. El *softbake* que hacemos también es el mismo, **3 minutos a 65 °C y 12 minutos a 95 °C**. Lo siguiente es enfriar y exponer en la insoladora usando la máscara que contiene los microcanales. En este caso **la exposición fue de 3 veces de 10 segundos con intervalos de descanso de 30 segundos**. A continuación, al igual que para la capa semilla es necesario realizar un **post-exposure bake de 3 minutos a 65 °C y de 7 minutos a 95 °C** y enfriar.

Puesto que vamos a realizar un diseño *multilayer*, no revelamos en este punto y por tanto lo que hacemos es depositar la siguiente capa, en nuestro caso la que formará los depósitos y los canales que sirven para comunicarlos. Para una altura de 150 μm depositamos en el **spin coater a 1500 revoluciones por minuto y usando SU-8 2050**. Para esta capa el *softbake* tendrá una duración mayor: **5 minutos a 65 °C y 45 minutos a 95 °C**. Tras enfriar **exponemos con la máscara que contiene los depósitos y los canales que sirven para comunicarlos**. Esta exposición con ultravioleta consiste en 4 pulsos de 10 segundos con intervalos de descanso de 40 segundos. Posteriormente se realiza el correspondiente *post-exposure bake*, en este caso de 3 minutos a 65 °C y 15 minutos a 95 °C, dejando enfriar la placa al final.

Una vez depositadas todas las capas de nuestro diseño se procede a **eliminar el SU-8 que no ha sido expuesto al ultravioleta**. Para ello sumergimos nuestra placa en el revelador SU-8 MRV600 durante aproximadamente 5 minutos.

A partir del molde es sencillo obtener las cámaras de microfluídica para el crecimiento neuronal. Primero hay que preparar el PDMS y para ello lo mezclamos con el **agente de curado** en un recipiente en **proporción 10:1** respectivamente y removemos con una varilla durante varios minutos. Para medir las cantidades necesarias de material hacemos uso de la balanza de precisión. Después hay que **eliminar las burbujas** que pueda contener el material introduciendo la mezcla en un recipiente hermético conectado a una bomba para hacer vacío durante unos 45 minutos aproximadamente. Una vez que se han eliminado las burbujas

completamente **recubrimos con papel de plata el borde** del molde formando un recipiente, **donde se vierte el PDMS**. Antes de verter, lo ideal es limpiar el molde con isopropanol dejándolo secar en el *hotplate* unos minutos. Por último **curamos en el horno a 80 °C durante 45 minutos y desmoldamos en caliente**. Lo ideal es realizar el desmolde en la dirección que ofrezca menos resistencia con los microcanales ya que son bastante delicados debido a sus pequeñas dimensiones.

Preparación oblea de soporte	Cortar obleas PCB de 10 cm de diámetro
	Limpia con acetona
	Quitar pegatina protectora
	Insolar con máscara con marcas de alineación (4 veces de 10 s con intervalos de descanso de al menos 10 s)
	Revelar fotorresina con revelador de placa PCB
	Ataque ácido (2 agua, 1 agua oxigenada, 1 agua fuerte) para eliminar el cobre
	Limpiamos con acetona para eliminar restos de fotorresina
Capa semilla	Deposición SU-8 2005 1500 revoluciones
	Softbake 3 min a 65 °C y 12 min a 95 °C
	Enfriamos
	Exposición (40 s)
	Post-exposure bake 3 min a 65 °C y 7 min a 95 °C
	Enfriamos
Capa microcanales	Deposición SU-8 2005 1500 revoluciones
	Softbake 3 min a 65 °C y 12 min a 95 °C
	Enfriamos
	Exposición (3 veces de 10 s con intervalos de descanso de 30s)
	Post-exposure bake 3 min a 65 °C y 7 min a 95 °C
	Enfriamos
Capa depósitos	Deposición SU-8 2050 1500 revoluciones
	Softbake 5 min a 65 °C y 45 min a 95 °C
	Enfriamos
	Exposición (4 veces de 10 s con intervalos de descanso de 40s)
	Post-exposure bake 3 min a 65 °C y 15 min a 95 °C
	Enfriamos
Revelado	Revelamos SU-8 que no ha sido expuesto
Fabricación cámaras	Mezclamos PDMS y agente curado (proporción 10:1 respectivamente)
	Eliminamos burbujas en vacío durante 45 min
	Limpiamos molde con isopropanol
	Vertemos mezcla sobre molde SU-8
	Curamos en el horno a 80 °C durante 45 min
	Desmoldamos en caliente

Tabla 2: Protocolo de fabricación del dispositivo.

Una vez que se ha desmoldado el PDMS se procede a cortar mediante un bisturí o cualquier elemento cortante cada uno de los dispositivos. Además es necesario atravesar mediante un

punzón circular cada uno de los cuatro pocillos de cada dispositivo para así poder tener acceso a los canales principales y microcanales. El siguiente paso consiste en la unión del cubreobjetos de cristal (*Mikroskopische Deckgläser*, ref. 01 117 004) y el PDMS, que puede ser realizado mediante una unión reversible o irreversible, dependiendo de la aplicación. Es muy importante que el PDMS esté muy limpio y para ello se hace uso de una pistola de aire a presión para eliminar cualquier resto de material o polvo. La **unión reversible** consiste simplemente en colocar el dispositivo PDMS sobre el cubreobjetos tratado, presionando suavemente para conseguir el sellado, ya que dada la naturaleza del PDMS se adhiere fácilmente a una superficie cristalina si esta está muy limpia. Hay que tener cuidado de no presionar excesivamente en la región cercana a los microcanales puestos que estos pueden quedar bloqueados. Esta unión se suele usar cuando se quiere realizar una inmunocitoquímica o no se requiere de un horno de plasma, teniendo el inconveniente de que no se consigue un perfecto sellado, con lo que pueden presentarse fugas de líquido. En la **unión irreversible** se introduce el cubreobjetos y el dispositivo PDMS con los microcanales hacia abajo en un horno **de plasma** (*Harrick Plasma*). Con el horno de plasma se consigue romper los enlaces covalentes del cristal y el PDMS mientras se aplica el plasma. El proceso que se llevó a cabo consistió en aplicar en primer lugar un vacío en la cámara del horno. Cuando la presión cae por debajo de los 3 mbar se activa el plasma durante 40 segundos. Después de este tiempo se elimina el vacío de la cámara e inmediatamente se sacan del horno y se coloca el PDMS sobre el cubreobjetos. Por último se dejan durante 1 hora a 80 °C para facilitar que se establezcan los enlaces covalentes y así mejorar el sellado.

3.3.- Resultados

En total se fabricaron tres moldes variando distintos aspectos del diseño. Tal y como hemos comentado, cada oblea PCB contiene 9 dispositivos por lo que se probaron distintos anchos de canal en cada una de ellas. La **primera oblea** se diseñó con tres anchos de canal distintos: **3 dispositivos de 150 µm**, **3 dispositivos de 100 µm** y otros **3 dispositivos de 80 µm**. La longitud de canal que se imprimió en la máscara fue de 900 µm, exactamente la longitud que buscamos. Debido a que los microcanales tenían la misma longitud que la separación de los dos canales principales, errores en la alineación produjeron que muchos de estos microcanales no conectaran los dos extremos. La solución a esto consistió en crear máscaras con una

longitud de microcanal mayor (5 mm), para así evitar que los errores de alineación produjeran la inconexión de los extremos de los canales principales.

Para el **segundo molde** que se fabricó se usó esta máscara con **microcanales de 5 mm de longitud** y las mismas anchuras de microcanal que el primer molde. En este caso se decidió probar si la inclusión de la capa semilla en el diseño era necesaria. Al realizar la fabricación del molde sin capa semilla los microcanales se encuentran directamente sobre el sustrato FR-4. Tras la fabricación se observaron al microscopio bastantes microcanales rotos, probablemente por la escasa adherencia del SU-8 al FR-4, debido a la reducida superficie de estos microcanales. En la figura 16 se observan varias fotografías del primer molde realizado, donde se comprueba que los anchos de microcanal son correctos.

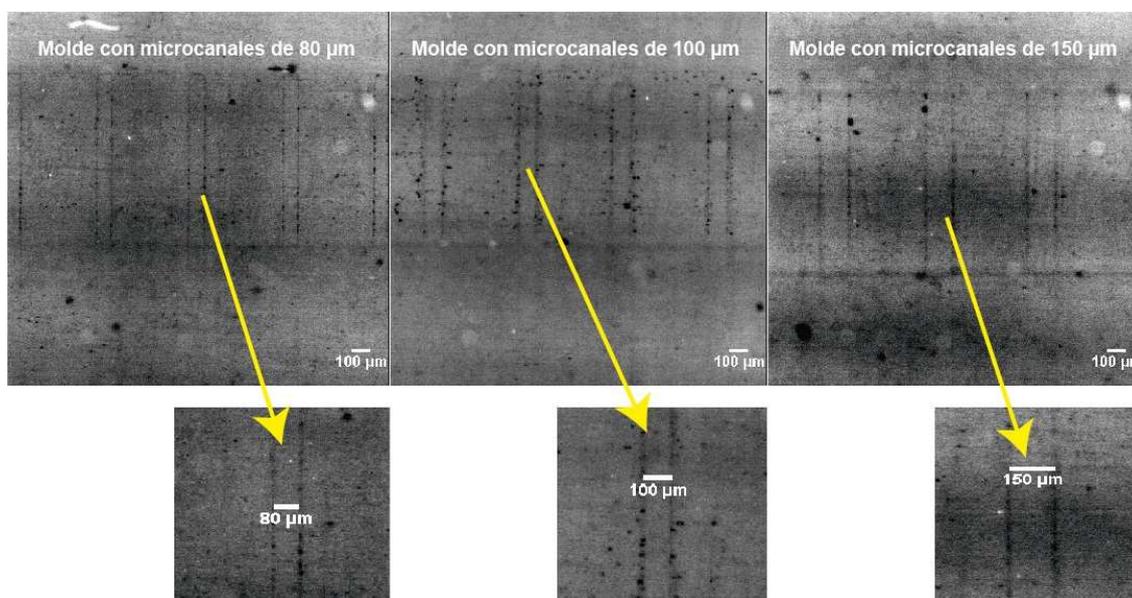


Figura 16: Imágenes del molde en SU-8 para comprobación de la anchura de los canales.

Por último se realizó una **tercera oblea**, añadiendo **capa semilla** y usando una máscara con **microcanales con anchuras de 30 µm, 40 µm y 50 µm y longitud 5 mm**. En la figura 17 podemos ver una foto de este molde con sus 9 dispositivos donde incluso se pueden observar los microcanales. Además se aprecian las marcas de alineación de cobre de la placa PCB.

En la figura 18 tenemos el resultado final, un dispositivo microfluídico en PDMS montado sobre un cubreobjetos de cristal mediante una unión irreversible usando el horno de plasma. Al desmoldar el PDMS del molde se obtiene una plancha con los 9 dispositivos y tal y como

hemos comentado, cortando el PDMS con un bisturí obtenemos cada uno de los dispositivos. Se observan también los cuatro orificios del PDMS correspondientes a los cuatro pocillos, que se consiguen atravesando el PDMS con un punzón circular y que se realiza previamente a la unión al cristal.

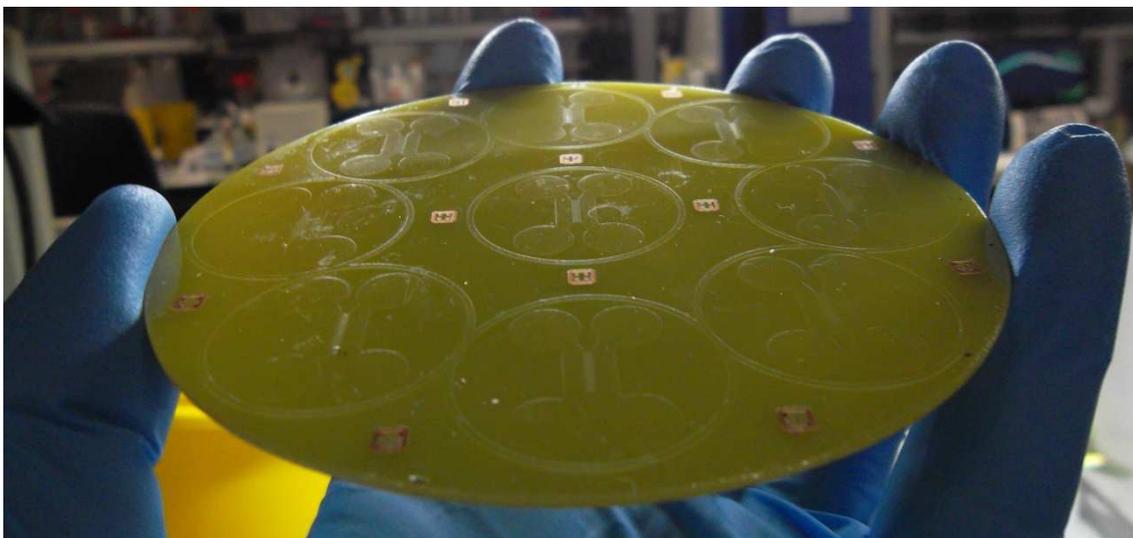


Figura 17: Molde en SU-8.

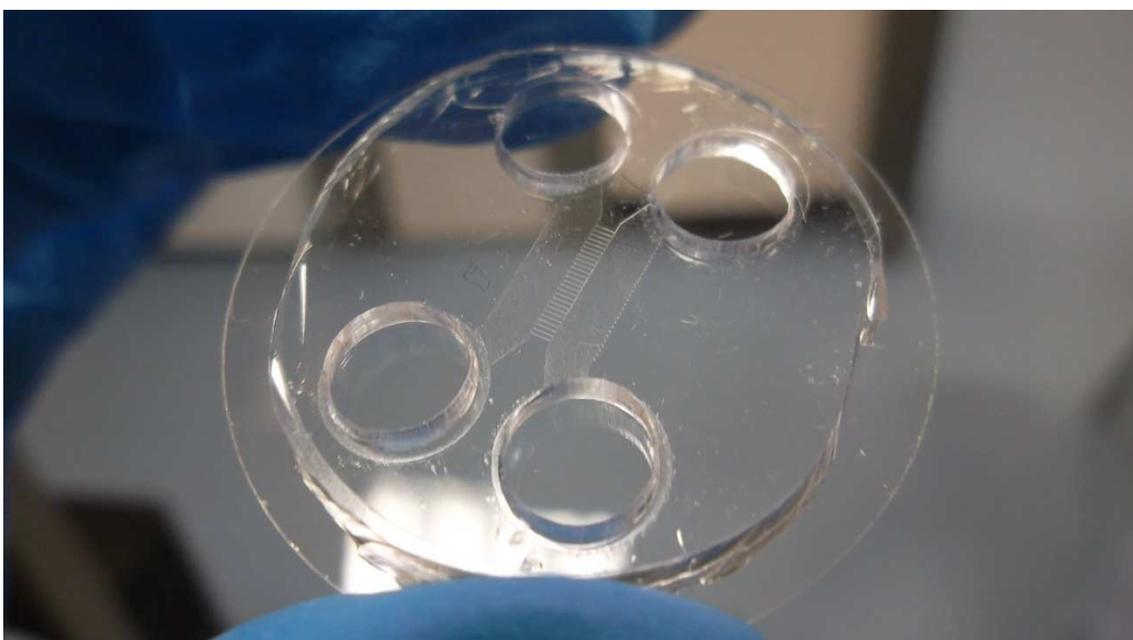


Figura 18: Unión irreversible entre PDMS y cubreobjetos.

4.- Estudio de la sinapsis en cultivo de neuronas con imagen de fluorescencia

En este apartado se va a describir el protocolo que se sigue para realizar un cultivo de neuronas. Además describiremos los componentes de un *set-up* de imagen para el estudio de sinapsis en cultivos neuronales mediante syGCaMP3 y pHLuorinas. Por último se mostraran los resultados obtenidos.

4.1.- Materiales y métodos

4.1.1.- Preparación de los cubreobjetos

Para los cultivos neuronales se usan cubreobjetos de 25 mm de diámetro. Antes de sembrar células en ellos es necesario que estén totalmente limpios y estériles. Para ello se sumergieron en un vaso de precipitados con ácido nítrico durante una noche. Después es necesario lavarlos muy bien con agua destilada varias veces y pasarlos a un vaso limpio con etanol absoluto donde se pueden dejar hasta el día que se vaya a realizar el cultivo.

El día del cultivo, y trabajando en una campana para evitar contaminaciones, los cubreobjetos se enjuagaron en una placa de vidrio con agua de cultivo y posteriormente se depositaron en placas de 6 pocillos donde se dejan que se sequen. Se preparó una alícuota en proporción 3:1:1 compuesta por 600 µl de ácido acético a 17 mM (Sigma, A-6283), 200 µl de colágeno (*Collaborative Biomedical Products*, 354236) y 200 µl de Poli-D-Lisina (Sigma, P6407) para cubrir la superficie de los cubreobjetos utilizando un bastoncillo. Finalmente es necesario dejar las placas secándose en la campana durante al menos 3 horas. También se pueden dejar toda la noche en la campana y después esterilizar con luz ultravioleta durante 20 minutos. Una vez secados los cubreobjetos se lavan con agua de cultivo.

Pre-tratamiento	Tratamiento en ácido nítrico
	Lavado con agua destilada
	Almacenamos en etanol absoluto
Tratamiento el día del cultivo	Pasamos a placa de vidrio con agua de cultivo
	Pasamos a placas de 6 pocillos donde dejamos que se sequen
	Tratamiento con ácido acético a 17mM, colágeno y Poli-D-lisina (proporción 3:1:1).
	Secado durante al menos 3 h
	Lavado con agua de cultivo

Tabla 3: Tratamiento de los cubreobjetos.

4.1.2.- Cultivo de astrocitos

El protocolo llevado a cabo es el que se utiliza en el laboratorio del Prof. Rafael Fernández-Chacón en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y realizados con la ayuda de M^a Carmen Rivero Mena, técnico de laboratorio. Los cultivos están compuestos en primer lugar por una monocapa de astrocitos sobre la que se siembran las neuronas. Por ello, en primer lugar se comienza describiendo el protocolo que se llevó a cabo para realizar el **cultivo de astrocitos**. Primero se debe preparar 3 ml de solución enzimática, ver tabla 4, burbujearla con carbógeno durante 10-20 minutos y calentar a 37 °C en el baño. Después debemos esterilizar por filtración y mantener en el baño a 37 °C hasta su uso.

Solución enzimática		
Compuesto	Cantidad	Referencia
DMEN (<i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i>)	10 ml	Gibco, 11971-025
Cisteína	2 mg	Sigma, C7755
CaCl ₂ 100 mM	0.1 ml	Fluka, 21110
EDTA 50 mM	0.1 ml	Fluka, 03677
Papaína	20-25 unidades/ml	Worthington, 3126

Tabla 4: Solución enzimática.

Medio de astrocitos		
Compuesto	Cantidad	Referencia
DMEN (<i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i>)	180 ml	PAA, E15-843
Suero fetal bovino	20 ml	Hyclone, CH30160.03
Penicilina/Estreptomicina	1 ml	Gibco, 15140-122

Tabla 5: Medio de astrocitos.

Se sacrificaron 2 ratas recién nacidas (P0-P1) por cultivo a las que se extrajo el hipocampo. Tras el sacrificio cada encéfalo se depositó en una placa de petri de 5 cm de diámetro que contenía aproximadamente 5 ml de *Hank's Balanced Salt Solution 1x* (HBSS) a 4 °C. Con el bisturí se realizó un corte coronal para escindir el cerebelo y el tronco cerebral del cerebro, y posteriormente un segundo corte para quitar los bulbos olfatorios del cerebro. Con unas pinzas finas se quitaron las meninges y por último se dividió el cerebro en dos hemisferios mediante un corte sagital. Posteriormente, con las pinzas, se extrajo de cada hemisferio el hipocampo correspondiente.

Los cuatro hipocampos (dos por cada rata) se depositaron en un tubo cónico de 15 ml con 3 ml de solución enzimática donde se incubaron 45 minutos a 37 °C en el baño con agitación. Tras la digestión enzimática se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de solución inactivante, ver tabla 6, durante 5 minutos para detener la reacción de la papaína. Se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio de astrocitos, ver tabla 5.

Solución inactivante		
Compuesto	Cantidad	Referencia
Albúmina	25 mg	Sigma, A4503
Inhibidor de tripsina	25 mg	Sigma, T9253
Medio de neuronas	10 ml	
Filtrado y almacenado a -20 °C		

Tabla 6: Solución inactivante.

El pellet resuspendido se pasó a un tubo *ependorf*, y con una micropipeta, se realizó una digestión mecánica hasta disgregar el tejido completamente (se realizaron 3 o 4 pasos consecutivos de disgregación del tejido). El contenido se pasó a un frasco de Roux de 75 mm² (Nunc, 156499) y se rellenó de medio hasta completar 15 ml. Se dejó en la incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 5 días. Conforme el frasco se fue acercando a la confluencia, se realizó un pase 1:1, con la idea de purificar el cultivo de astrocitos. Éste se mantuvo en la incubadora en las mismas condiciones de CO₂ y temperatura hasta alcanzar la confluencia (4 días aproximadamente).

El siguiente paso consistió en cultivar los astrocitos sobre los cubreobjetos de 25 mm de diámetro, en placas de 6 pocillos para constituir monocapas sobre las que sembrar las neuronas. Cada pocillo se llenó con 2 ml de medio de astrocitos, y se sembró con unas 80.000 células/pocillo. Los astrocitos se dejaron crecer durante 4-5 días hasta que se encontraron próximos a la confluencia y en ese momento se aplicó el tratamiento antimetabólico con el fin de detener su crecimiento (ver tabla 7).

Stock FUDR		
Compuesto	Cantidad	Referencia
5-Fluoro-2'-Deoxyuridina	25 mg	Sigma, F0503
Uridina	62.5 mg	Sigma, U3003
DMEN	12.5	ml
Filtrado y almacenado a -20 °C		

Tabla 7: Stock FUDR.

Se añadieron 40 μ l/pocillo y se dejó actuar el agente antimetabólico durante 24 horas como mínimo. A partir de ese momento las placas estuvieron preparadas para sembrar neuronas.

4.1.3.- Cultivo de neuronas

El protocolo seguido para el cultivo de neuronas se asemeja en gran medida al de astrocitos, diferenciándose casi exclusivamente en el medio utilizado para el mantenimiento del cultivo. En este caso las neuronas son de ratón y para la extracción del hipocampo los pasos fueron exactamente igual que para el cultivo de astrocitos.

Medio de neuronas		
Compuesto	Cantidad	Referencia
Neurobasal-A	192 ml	Gibco, 10888-022
Suplemento B27 50x	4 ml	Gibco, 17504-044
GlutaMAX stock 200mM 100x	2 ml	Gibco, 35050-038
Penicilina/estreptomina	1 ml	Gibco, 15140-122

Tabla 8: Medio para cultivo de neuronas.

Los hipocampos se introdujeron en un tubo de 15 ml con 1.5 ml de solución enzimática con papaína (para dos hipocampos de un ratón). Se mantuvieron en el baño a 37 °C, con una agitación suave durante 45 minutos. Pasado este tiempo se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió cada pellet en 500 μ l de medio de neuronas (ver tabla 8). El contenido del tubo se pasó a un tubo *ependorf*, para ser sometido a una digestión mecánica. Esta digestión mecánica, al igual que en caso de los astrocitos, se realizó con una micropipeta hasta disgregar el tejido completamente, utilizando en este caso medio de neuronas (se realizaron 3 o 4 pasos consecutivos de disgregación del tejido).

Una vez disgregadas las células, se cuentan en un hematocitómetro. Utilizando las placas de astrocitos con el agente antimetabólico ya añadido, se quitó el medio de astrocitos y a cada pocillo se le añadieron 2 ml de medio de neuronas. Este paso se realiza 2-3 horas antes de sembrar las neuronas, para que el medio se acondicione. Se sembraron 45.000 células/pocillo.

Por último, las placas se introducen en la incubadora en las condiciones estándar de 37 °C de temperatura y 5% de CO₂. Cada 3-4 días se va renovando al menos $\frac{1}{4}$ del medio de neuronas en cada pocillo. Por último, en caso de que se requiera alguna infección con virus, esto suele hacerse a partir del segundo día de la realización del cultivo.

4.1.4.- Set-up de imagen

Para el registro de imagen de fluorescencia de cultivos neuronales es necesario disponer de una infraestructura apropiada. Esta infraestructura se muestra en la figura 19, donde en la imagen de la izquierda podemos ver un microscopio invertido *Nikon Eclipse TE2000-U* dentro de una jaula de Faraday y montado sobre una mesa antivibratoria de *Newport*. Al microscopio se encuentra conectada una cámara CCD de 12 bits (*PCO Sensicam QE*). En la imagen de la derecha de la figura 19 podemos ver que en el rack se encuentran el ordenador para la adquisición de imagen, el *shutter* (*Uniblitz Model VCM-D1*), que controla los tiempos de exposición en cada ciclo de adquisición y el estimulador eléctrico (*A-M Systems Model 2100*) para estimular mediante corriente la red neuronal. También en el rack aparece en la parte superior un amplificador de *patch-clamp* (*Heka EPC10*), que para el caso que nos ocupa se puede usar como tarjeta de adquisición de datos para sincronizar la adquisición de imágenes con la estimulación eléctrica. En cuanto al juego de filtros, para el registro de la GFP se usa un filtro de excitación a 488 nm (luz azul) y un filtro de emisión a 512 nm (luz verde).

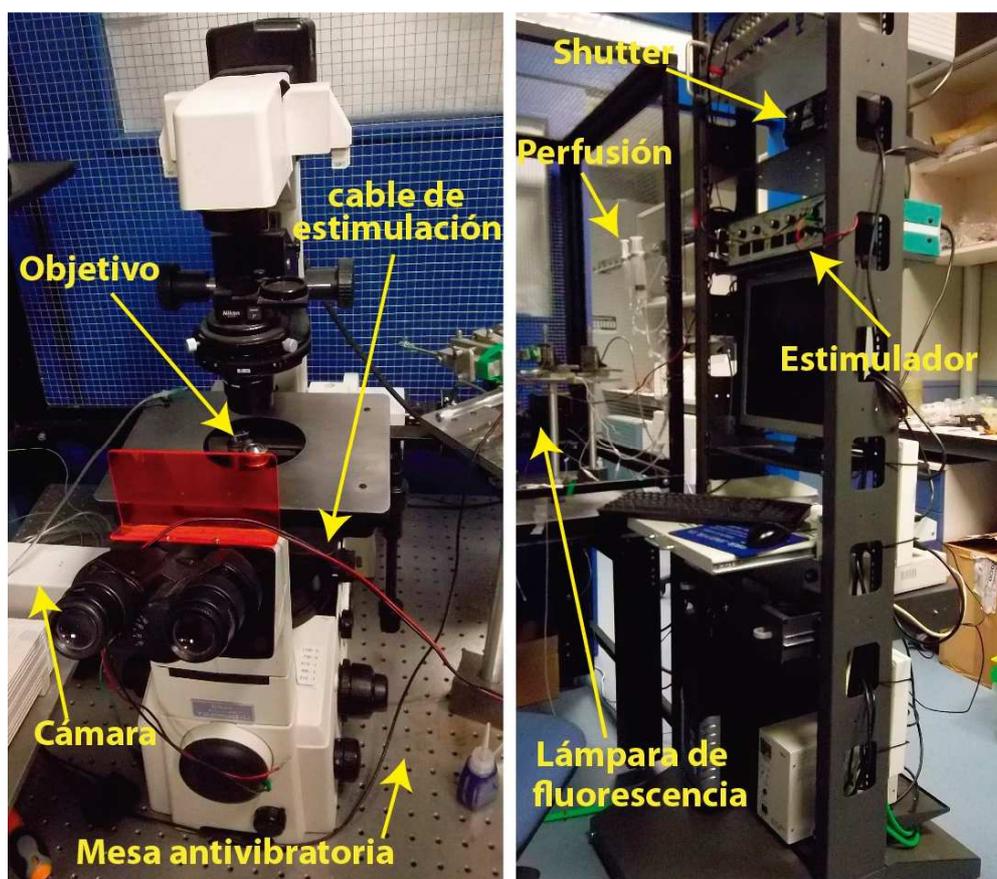


Figura 19: Set-up de imagen.

Para la estimulación con fluorescencia se usa una lámpara de mercurio (*Ushio 103D*) que está ubicada en la parte trasera del *set-up*. Además, en la jaula podemos ver un sistema de jeringas que sirve para la perfusión, ya que hay que mantener las células vivas fuera de su entorno el mayor tiempo posible, puesto que para la realización de los experimentos se deben sacar de la incubadora los cubreobjetos con las neuronas sembradas y montarlos en una cámara especial para su registro (véase figura 20). Para mantener las células vivas fuera de su entorno el mayor tiempo posible se utiliza este sistema de perfusión donde las neuronas son bañadas con un medio de registro a una velocidad de 1ml/min aproximadamente. En la figura 20 podemos ver las vías de entrada y salida de esta cámara, así como el cable que nos sirve para poder realizar estimulaciones eléctricas en los cultivos neuronales. Se dispone de un sistema de perfusión que consta de varias jeringas para poder realizar diferentes tratamientos farmacológicos dependiendo del estudio. La solución de perfusión que se ha usado en los experimentos es la siguiente: 119 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂, 2 mM de MgCl₂, 25 mM de HEPES, 30 mM de glucosa y el pH de la solución ajustado a 7.4 con NaOH. Todos los experimentos se han realizado a temperatura ambiente, aunque también cabe la posibilidad de realizarlos a temperatura fisiológica de 37 °C mediante cámaras de registro apropiadas conectadas a un controlador de temperatura. En la parte de la derecha de la figura 20 podemos observar cómo se ensambla el cristal con neuronas en la cámara para su registro.

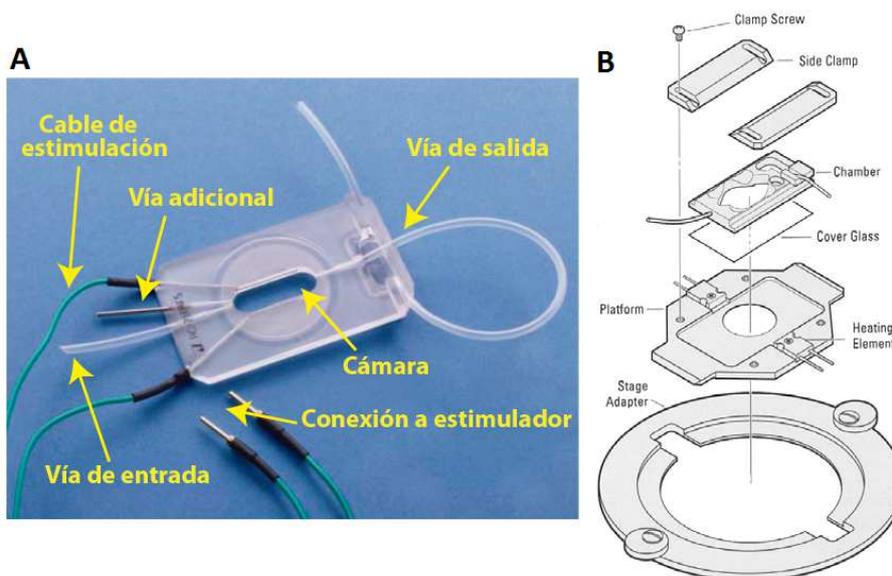


Figura 20: A. Cámara para registro de imagen con estimulación eléctrica modelo RC-21BRFS de *Warner Instruments*. B- Cámara completa con ensamblaje a los cubreobjetos. Tomado de *Warner Instruments*.

4.2.- Resultados

4.2.1.- Monitorización del calcio sináptico usando syGCaMP3

En la figura 21 podemos ver imágenes de un cultivo de neuronas de 18 DIV (días in vitro) expresando syGCaMP3 (infectado a 6 DIV) en los instantes $t=0$ y $t=6$ de una secuencia de imágenes adquiridas a 5 imágenes/s. Al aplicar un estímulo eléctrico (pulsos cuadrados bifásicos de 10 mA de amplitud y 5 ms de anchura a una frecuencia de 10 Hz durante 4s) el calcio sináptico entra en el terminal uniéndose a nuestra proteína fluorescente y emitiendo fluorescencia. Este calcio entra al terminal a través de canales de calcio presentes en la membrana celular que son dependientes de voltaje. Al cesar el estímulo el calcio se retira del terminal sináptico gracias a bombas que expulsan el calcio, reduciéndose así la señal de fluorescencia. La señal de trazo azul representa la fluorescencia de un terminal sináptico marcado con una flecha azul en la zona ampliada, representada por el cuadro amarillo.

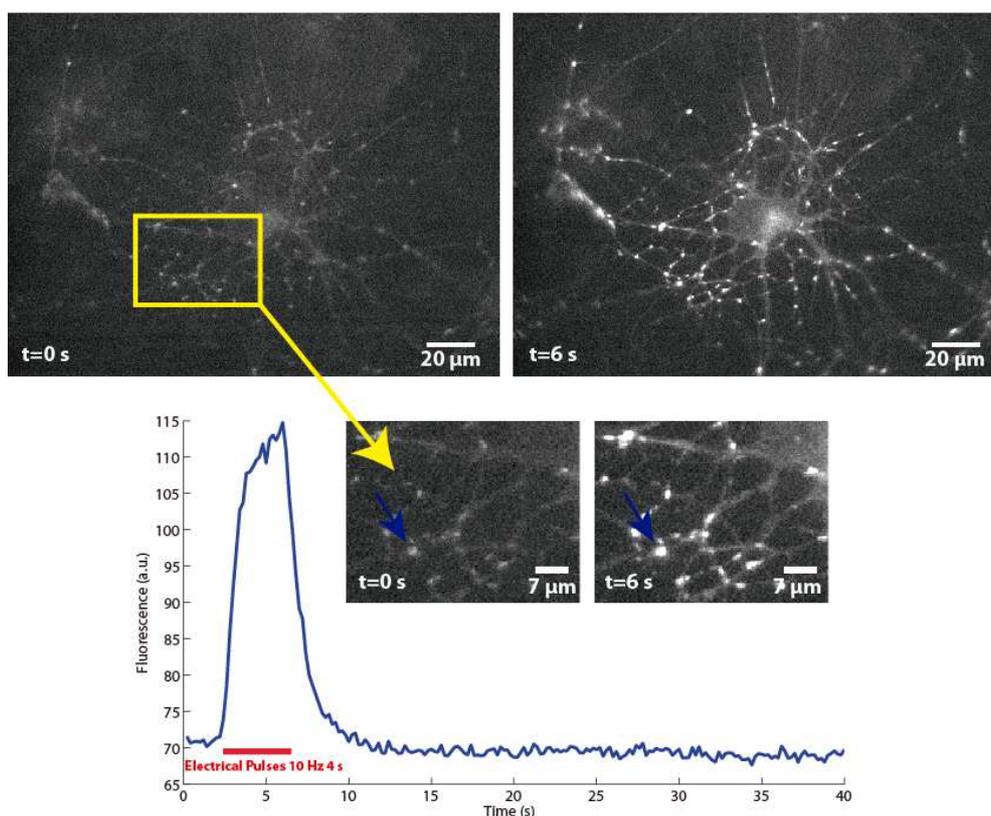


Figura 21: Imágenes de un cultivo de neuronas expresando syGCaMP3 en los instantes $t=0$ y $t=6$ de una secuencia de imágenes. Al aplicar un estímulo eléctrico el calcio sináptico entra en el terminal emitiendo fluorescencia. Al cesar el estímulo el calcio se retira del terminal sináptico y se reduce la señal de fluorescencia. La señal de trazo azul representa el curso temporal de fluorescencia del terminal sináptico marcado con una flecha azul en la zona ampliada representada por el cuadro amarillo.

4.2.2.- Monitorización de la exo- endocitosis de vesículas sinápticas usando Vglut-pH

En la figura 22 podemos observar una serie de imágenes en distintos instantes de tiempos de un cultivo de neuronas de 18 DIV infectado con Vglut-pH (infección a los 5 DIV). Al aplicar un estímulo eléctrico (pulsos cuadrados bifásicos de 10 mA de amplitud y 5 ms de anchura a una frecuencia de 10 Hz durante 10 s) se produce un incremento en la fluorescencia debido a la fusión de vesículas sinápticas con la membrana celular, ya que el Vglut-pH se expone a un pH de 7.4. Al cesar el estímulo, la fluorescencia comienza a decrecer debido al proceso de endocitosis. Las vesículas se endocitan y se reacidifican, exponiendo el Vglut-pH a un pH ácido, consiguiendo que el apagado de la fluorescencia. En el margen inferior izquierdo de la figura 22 podemos ver la evolución temporal media del conjunto de sinapsis detectadas en la secuencia de imágenes.

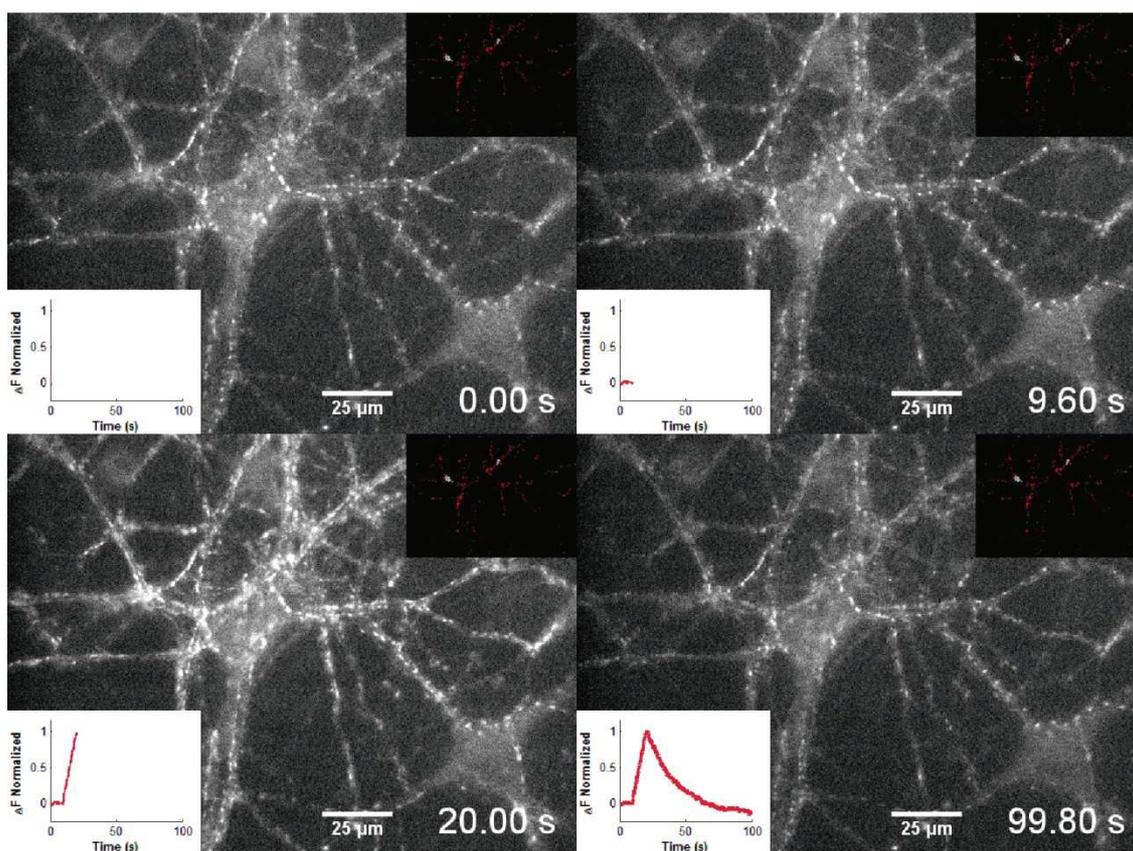


Figura 22: Secuencia de imágenes de un cultivo de neuronas expresando Vglut-pH. Se observa que durante la fase del estímulo eléctrico la fluorescencia aumenta (entre los instantes 10 y 20 s). Al cesar el estímulo la fluorescencia comienza a decrecer.

En la figura 23 se tiene el margen superior derecho de la figura 22 ampliado, que contiene las sinapsis que han sido cuantificadas. Se consideró una sinapsis cada conjunto de píxeles que supera tres veces la desviación estándar de ruido del nivel basal (nivel de fluorescencia previo al estímulo) durante la estimulación y además tiene unas dimensiones entre 1 y 10 micras cuadradas. El punteado que aparece en rojo cumple estas condiciones. El punteado que aparece en blanco corresponde a zonas que superan tres veces el nivel basal de fluorescencia cuando se estimula, pero las dimensiones son menor de una micra cuadrada o mayor que 10 micras cuadradas. En la esquina inferior izquierda se observa de nuevo la cinética de exocitosis y endocitosis media de la secuencia de imágenes (correspondiente al punteado en rojo). El nivel que se representa es ΔF normalizado, es decir el incremento de fluorescencia normalizado. Para la cuantificación de estas secuencias de imágenes se ha desarrollado un *plugin* en Java para *ImageJ*.

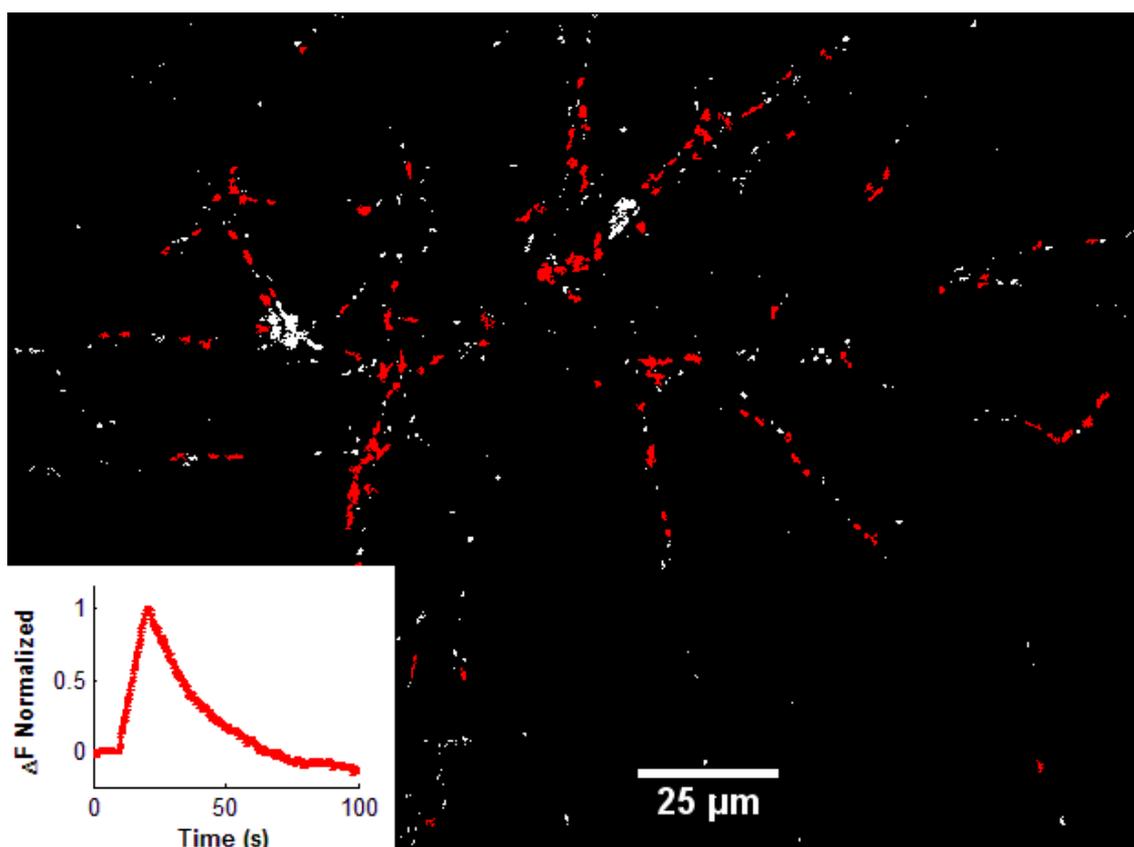


Figura 23: Cuantificación de las sinapsis en una secuencia de imágenes. Se consideró sinapsis aquello que superó 3 veces la desviación estándar de ruido de la fluorescencia basal y tuviera unas dimensiones entre 1 y 10 μm^2 (punteado marcado en rojo). El punteado blanco corresponde a zonas que supera el umbral de 3σ pero las dimensiones caen fuera del rango establecido. En la esquina inferior izquierda se observa la evolución temporal media de las sinapsis (punteado rojo).

5.- Siembra de neuronas en la plataforma microfluídica

5.1- Métodos

Hasta este momento se han visto por separado el proceso de fabricación del dispositivo microfluídico y la realización de cultivos neuronales para su estudio mediante imagen de fluorescencia, por lo que el siguiente paso consistirá en la siembra de neuronas dentro del dispositivo microfluídico. En este caso, por simplicidad solamente se sembrarán neuronas, sin realizar la siembra a priori de la monocapa de astrocitos. Tal y como hemos comentado, el primer paso en un cultivo de neuronas es el tratamiento de los cubreobjetos. Los dispositivos microfluídicos serán pegados en cubreobjetos de 30 mm de diámetro y distinguiremos dos casos: el pegado reversible y el irreversible. Como el caso reversible simplemente consiste en pegar el dispositivo PDMS sobre el cubreobjetos, el tratamiento previo a realizar es el mismo que para los cultivos previamente descritos. En el caso de la unión irreversible la mezcla con Poli-D-lisina se añade a los reservorios posteriormente. Si el medio no rellena los canales completamente, se puede usar una pipeta para forzar que la solución entre por los canales retirando e inyectando el medio varias veces. Después es necesario colocar el dispositivo en una incubadora a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente se retira la solución con Poli-D-Lisina y se lava con agua de cultivo varias veces. Con el dispositivo lleno de agua lo dejamos durante 2 horas en la incubadora a 37 °C donde se pueden dejar durante 2 o 3 días hasta su uso. Para el caso irreversible puede ser interesante introducir el dispositivo en una cámara de vacío durante 2-3 minutos para eliminar el aire que pudiera haber dentro de los canales y microcanales, para así poder rellenar mejor con los distintos líquidos.

Introducimos cubreobjetos (sin tratar) y dispositivo PDMS en horno de plasma 1-2 min
Colocar PDMS sobre cubreobjetos
Añadir mezcla con Poli-D-lisina, colágeno y acético
Colocar en incubadora a 37 °C toda la noche
Retirar mezcla
Lavar con agua de cultivo varias veces
Colocar dispositivo en incubadora lleno de agua a 37 °C durante 2 h
Enjuagar

Tabla 9: Resumen de la unión irreversible.

Para ambos casos, pegado reversible e irreversible, antes de cultivar las neuronas, llenamos los dispositivos con medio de cultivo de neuronas. Los dispositivos deben ser incubados con

medio de cultivo de neuronas durante al menos 3 horas antes de cultivar las células. Tras obtener las neuronas disgregadas en un tubo *eppendorf* siguiendo el protocolo descrito anteriormente pasamos a contar las células en un hematocitómetro, ya que necesitamos preparar un medio con neuronas de hipocampo en suspensión con una concentración aproximada de $3 \cdot 10^6$ células/ml.

Una vez que tenemos las células en suspensión a la concentración deseada tomamos nuestros dispositivos de la incubadora y aspiramos el medio que contienen en los reservorios, pero con el cuidado de no aspirar el medio que se encuentra en los canales principales que interconectan los reservorios. Inmediatamente se añade 20 μ l de células en suspensión en uno de los cuatro reservorios. Hay que tener cuidado de añadir las células cerca del canal para que así penetren bien mediante capilaridad. Tras esto colocamos los dispositivos dentro de la incubadora durante al menos 10 minutos para permitir que las células difundan completamente por los canales y que se adhieran a la superficie. El último paso consiste en añadir medio de neuronas a todos los reservorios y colocar los dispositivos en la incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂. Hay que revisar todos los días los niveles de medio debido a la evaporación y añadir en caso de que sea necesario.

5.2- Resultados

En la figura 24 se observan cuatro imágenes de neuronas penetrando dentro de un canal de 150 μ m. Con ella se comprueba la viabilidad de los cultivos de neuronas dentro de nuestro dispositivo microfluídico a 6 DIV. En los dispositivos con esta anchura de canal no se consiguió aislar los dos compartimentos tal y como se pretende. En un instante posterior a la siembra de neuronas, se observó la ruta que seguían las células y se pudo comprobar que gran cantidad de ellas pasaban a través de los microcanales. Muestra de ello se aprecia en la figura 25, donde podemos observar una neurona dentro de un microcanal, Por ello, se decidió realizar obleas con menores anchuras de microcanal.

Por otro lado, en la figura 26 se observa como la unión reversible no funciona del todo bien, ya que en algunos casos las proyecciones de las neuronas crecen bajo el PDMS.

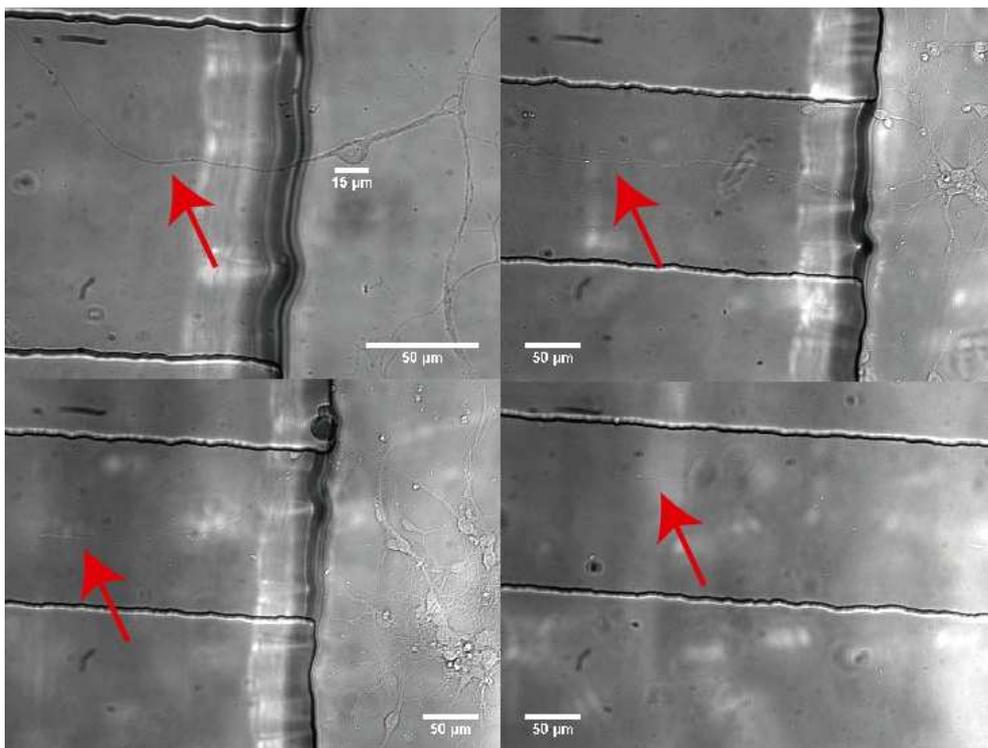


Figura 24: Canal 150 μm. Cultivo 6 DIV. Crecimiento del axón en el canal.

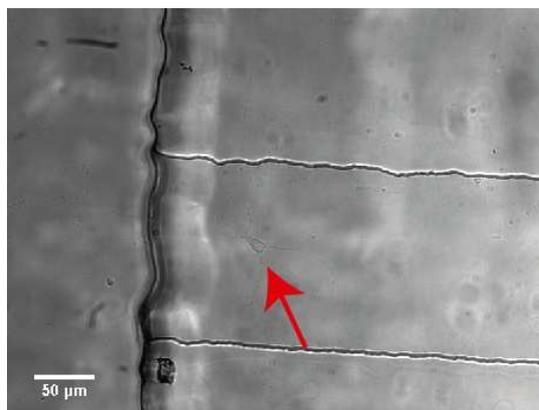


Figura 25: Neurona dentro de un microcanal de 150 μm.

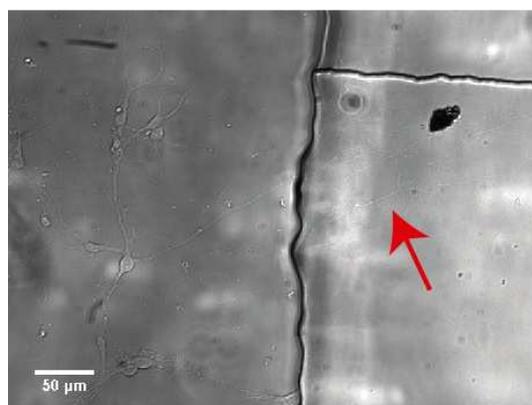


Figura 26: Crecimiento axonal bajo el PDMS.

En la figura 27 podemos ver un dispositivo con microcanales de 30 μm con una unión reversible pegada perfectamente. Se observa a 7 DIV como las neuronas crecieron en el canal principal estableciendo contactos sinápticos para formar una red. Además podemos ver el crecimiento de axones y/o dendritas dentro del microcanal.

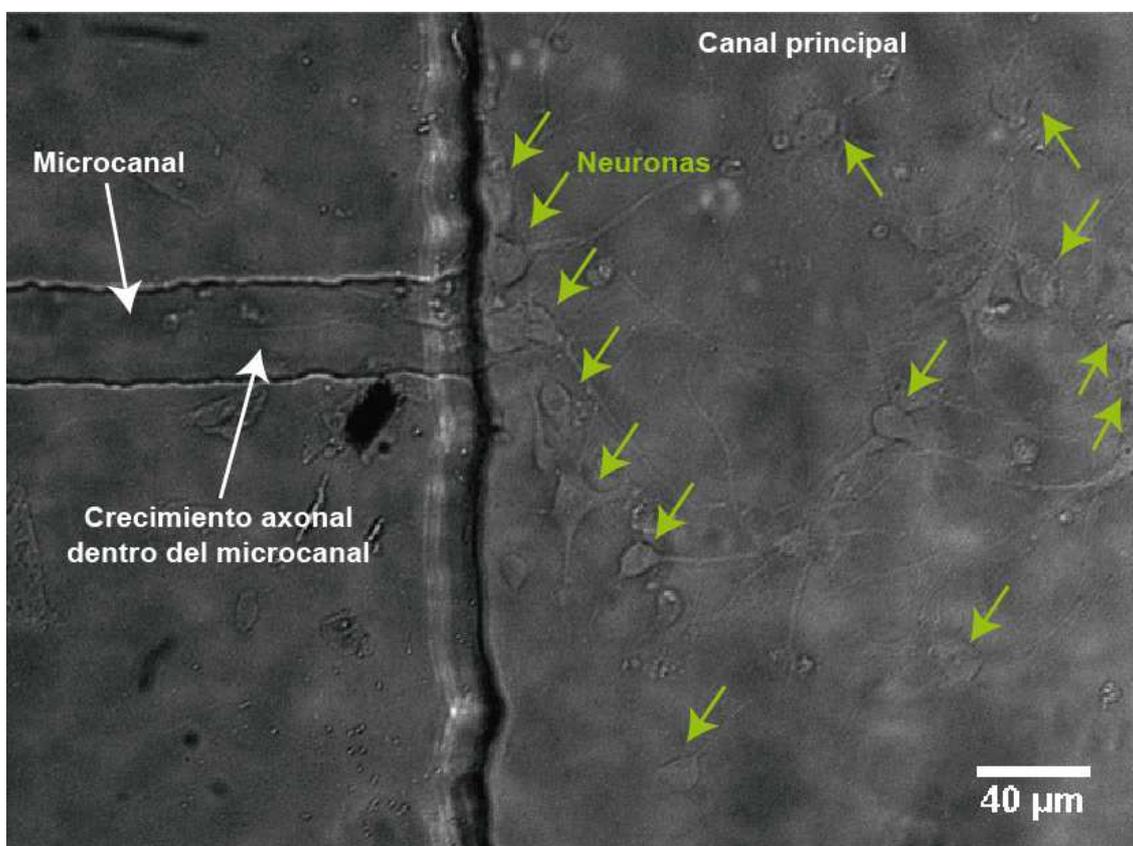


Figura 27: Pegado reversible. Cultivo 7 DIV. Objetivo 20X.

Una vez comprobada la viabilidad de las células, a continuación se muestran imágenes de otro dispositivo con neuronas a 7 DIV e infectado con un virus GFP. En la parte izquierda de la figura 28 vemos una imagen tomada en campo claro, y a la derecha la misma imagen pero tomada con fluorescencia. La infección se realizó a los 2 DIV del cultivo por lo que nos encontramos a 5 DIV tras la infección. Con este tiempo la expresión de GFP aún no es máxima (lo normal es esperar 9 DIV tras la infección), pero aún así, es posible ver fluorescencia a unos niveles aceptables. En este caso también podemos ver el crecimiento de una neurona dentro del microcanal. Un hecho notable en estas imágenes es que en fluorescencia solo podemos ver tres neuronas, mientras que en campo claro observamos muchas más. Esto es debido a que la propia construcción viral solamente ataca a ciertas neuronas.

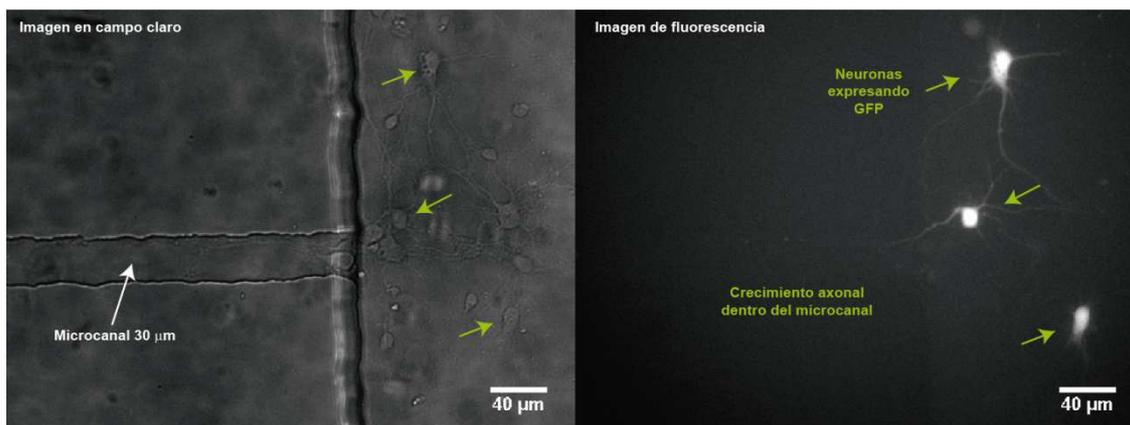


Figura 28: Pegado reversible. Cultivo 7 DIV. Infección 5 DIV. Objetivo 20X.

En la figura 29 se muestra una zona de otro dispositivo a 11 DIV. Se observan dos microcanales, uno de ellos con una neurona dentro y en el otro podemos observar axones mediante fluorescencia. Comparando ambas imágenes se aprecia en este caso que el pegado no ha funcionado perfectamente en la zona cercana al canal principal.

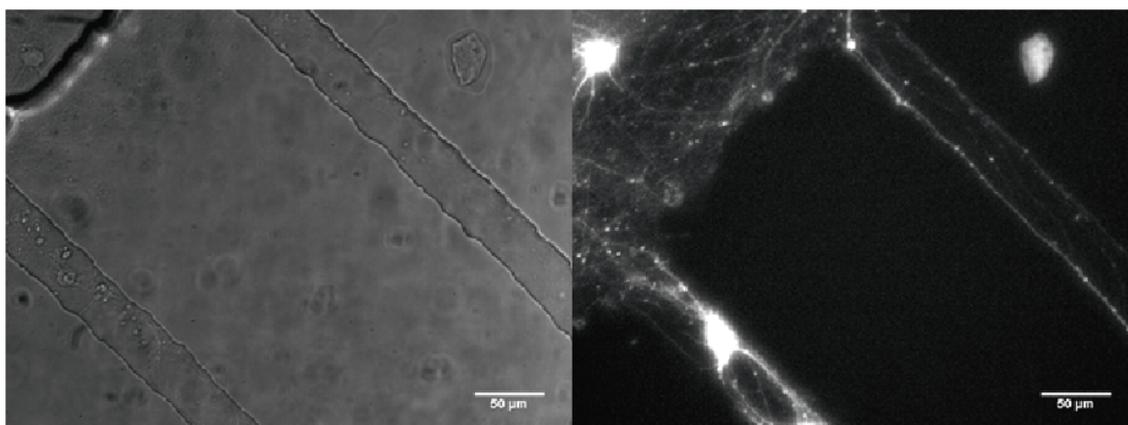


Figura 29: Pegado reversible. Cultivo 11 DIV. Infección 9 DIV. Objetivo 20X.

Por último en la figura 30 se muestra un dispositivo pegado al cristal mediante unión irreversible usando el horno de plasma. En los experimentos que se hicieron no se consiguieron observar neuronas dentro de los dispositivos. Tal y como se ha visto, el tratamiento del cristal es más complejo en este caso al tener que hacerlo con la plataforma de PDMS pegada. Una posible explicación de que no se vean neuronas puede ser que el cristal no haya quedado impregnado con la mezcla de Poli-D-lisina, probablemente porque se haya lavado en un paso posterior. Al no tener Poli-D-Lisina, las células no se quedan pegadas al cristal lo que se quedan en suspensión impidiendo su correcto crecimiento.

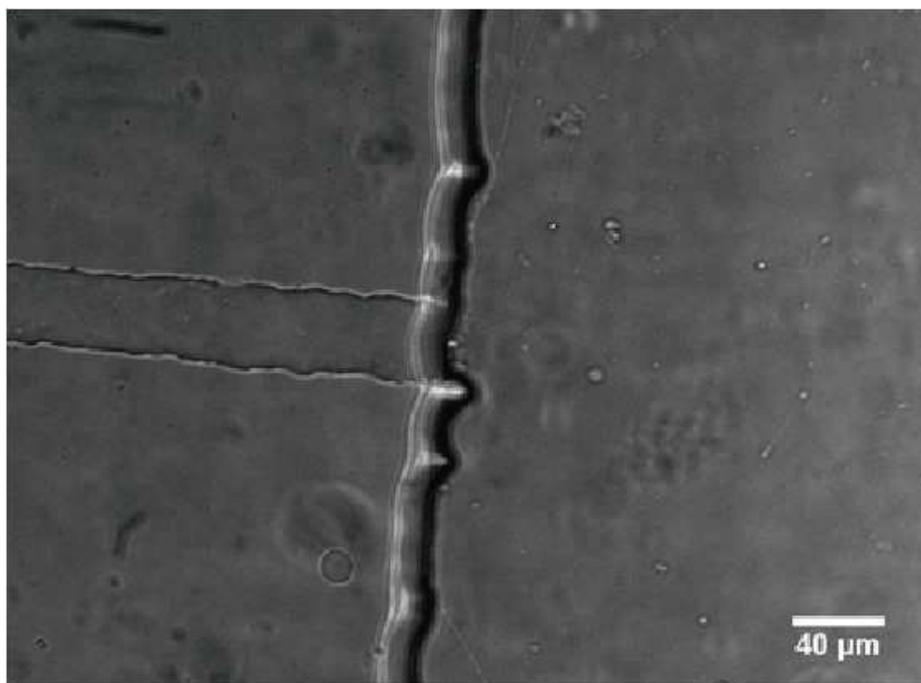


Figura 30: Pegado irreversible usando horno de plasma. Cultivo 7 DIV. No se ven neuronas, probablemente por el lavado de la Poli-D-Lisina. Objetivo 20X.

6.- Conclusiones

En este proyecto se ha desarrollado una plataforma microfluídica para la interconexión mediante sinapsis de dos poblaciones neuronales distintas y además se han puesto a punto la instrumentación y las condiciones para el estudio funcional con imagen de fluorescencia de neuronas cultivadas usando virus modificados genéticamente. Se ha conseguido mantener *in vitro* cultivos neuronales sembrados en nuestros dispositivos más allá de dos semanas. Además se ha conseguido manipular nuestro sistema mediante infecciones virales, poniendo de manifiesto la capacidad de poder estudiar las sinapsis mediante imagen de fluorescencia en los dispositivos microfluídicos.

Por otro lado, existen ciertos aspectos en los que hay que mejorar. Uno de ellos es la reducción de los anchos de canal para poder aislar completamente las dos poblaciones neuronales. Para los canales de 30 μm el aislamiento entre los dos compartimentos no funcionó al cien por cien, ya que durante el proceso de siembra algunas neuronas entraron por los canales, aunque en mucha menor medida que para canales de mayor anchura. Para conseguir esto, solo sería necesario disponer de máscaras con microcanales con anchura menor a 10 μm , por lo que no presentaría mayor problema. Otro de los aspectos a mejorar es el del pegado entre el PDMS y los cubreobjetos de cristal. Se ha comprobado que el pegado reversible funciona, pero no es una técnica que funcione en todos los casos. Para ello, se ha presentado también el pegado irreversible usando un horno de plasma. Con el sellado irreversible, el PDMS se pega al cristal prácticamente en el cien por cien de los casos, pero aparece el problema de que es más complicado llevar a cabo el protocolo de siembra de neuronas dentro de los dispositivos, sobre todo en lo que se refiere al tratamiento previo de los cristales.

7.- Direcciones futuras

Tal y como hemos comentado, el principal problema que nos hemos encontrado durante la realización de este proyecto es que no se ha conseguido aislar completamente las dos poblaciones neuronales debido a la anchura de los canales. Una dirección futura inmediata consistiría en realizar máscaras con anchura de canal por debajo de las 10 μm . Además, tal y como hemos visto, para el estudio de neuronas es muy útil realizar estímulos eléctricos, por lo que entre los trabajos futuros se encuentra la posibilidad de acoplar un sistema de estimulación eléctrica a la plataforma microfluídica ya sea de forma global para estimular la red completa o de forma local, para estimular ciertas zonas concretas.

En este trabajo se ha presentado un diseño simple de separación de dos poblaciones neuronales, por lo que otra posible tendencia futura podría ser el diseño de otras estructuras que permitiesen estudiar distintas configuraciones de red, en la que pudiera haber más de dos poblaciones neuronales, dependiendo del estudio que se quisiera realizar.

Por otro lado, la idea de utilizar sistemas microfluídicos para estudios en neurociencia es una técnica que ha aparecido en los últimos años, llegando a ser un campo aún en desarrollo si lo consideramos en combinación con otras tecnologías de reciente aparición. En el capítulo de introducción se han descrito un compendio de disciplinas que representa la vanguardia tecnológica en el campo de la neurociencia a día de hoy. Su desarrollo y mejora marcarán los nuevos conocimientos en el campo y las nuevas tendencias en los próximos años. Por ejemplo, una de las tendencias actuales para el estudio de conectividad de los circuitos neuronales en rodajas de cerebro es el uso de la optogenética junto con el registro de actividad eléctrica mediante *patch-clamp*. Mediante técnicas de biología molecular es posible expresar la *channelrhodopsin* solamente en una subpoblación neuronal concreta. Al estimular con luz, sólo será esta subpoblación de neuronas la que se activará de forma que al registrar sobre otro tipo celular o área del cerebro es posible conocer si la neurona que registramos recibe contactos sinápticos de la subpoblación que expresa *channelrhodopsin*. Con el dispositivo que se ha desarrollado en este proyecto es posible estudiar las conexiones sinápticas entre dos poblaciones de neuronas distintas. En este caso, la distinción de poblaciones neuronales se hace imponiendo barreras físicas y no mediante la genética. Una posible tendencia de futuro en

el estudio de circuitos neuronales, y que dependerá de los avances en MEMS/NEMS, podría ser la generación de configuraciones de redes neuronales específicas, ya sean artificiales o copiando redes ya conocidas en el cerebro, mediante circuitos micro- y/o nanofluídicos. Incluso especulando un poco más allá, podríamos considerar configuraciones de red a nivel celular.

Los MEMS y los NEMS están teniendo un papel cada vez más importante, con multitud de aplicaciones en diversos campos. La miniaturización de dispositivos en la escala de las micras ha llegado también a la rama de la óptica. Estos dispositivos se denominan MOEMS (Micro-Opto-Electro Mechanical Systems). En relación con esto, otra posible tendencia sería la generación de MOEMS que estimulasen o inhibiesen neuronas individualmente mediante optogenética para poder estudiar configuraciones de red específicas. A esto, se podrían añadir micro- o nanoelectrodos de registro de forma que pudiéramos conocer la actividad eléctrica de cada neurona en cada momento. Todo esto nos daría un control y conocimiento mucho más fino sobre el circuito. Si además consideramos la imagen de superresolución podríamos conocer finamente el comportamiento funcional de las sinapsis (ya que podemos distinguir el terminal presináptico del postsináptico expresando proteínas fluorescentes) dentro del contexto de un circuito neuronal específico diseñado previamente.

8.- Bibliografía

- [1] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the cell. Fifth Ed. Garland Science.
- [2] Aracil Fernández C, Microválvula polimérica con activación termoneumática altamente integrable para aplicaciones biomédicas. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla (2011).
- [3] Balaji J, Ryan TA. Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. Proc Natl Acad Sci 104(18):20576-81 (2007).
- [4] Fischbach GD. Mind and Brain. Scientific American 267(3):48-57 (1992).
- [5] García-Junco Clemente P. Estudio electrofisiológico de la transmisión sináptica en neuronas cultivadas de hipocampo de ratones carentes de *Cysteine String Protein-alpha*, (*CSP-alpha*). Tesis doctoral. Universidad de Sevilla (2008).
- [6] Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. 391(2):85-100 (1981).
- [7] Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt Lett 19(11):780-2 (1994).
- [8] Linares Clemente P, Diseño, generación y análisis de ratones transgénicos para visualizar ratones transgénicos para visualizar la exocitosis y la endocitosis en la sinapsis. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla (2008).
- [9] Park JW, Vahidi B, Taylor AM, Rhee SW, Jeon NL. Microfluidic cultura platform for neuroscience research. Nat Protoc. 1(4):2128-36 (2006).
- [10] Perdignes Sánchez A. Nuevas realizaciones de nebulizadores empleando tecnología de microsistemas con polímeros. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Sevilla (2007).
- [11] Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nature Methods 3, 793-795 (2006).
- [12] Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman JE, Ryan TA. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. Biophys J. 79(4):2199-208 (2000).
- [13] Fernández-Chacón R, Südhof TC. Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle. Annu Rev Physiol. 61:753-76 (1999).
- [14] Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nat Methods. 2(8):599-605 (2005).
- [15] Taylor AM, Dieterich DC, Ito HT, Kim SA, Schuman EM. Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. Neuron 66 (1):57-68 (2010).
- [16] Taylor AM, Rhee SW, Tu CH, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL. Microfluidic multicompartiment device for neuroscience research. Langmuir (2003).
- [17] Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL. Imaging

neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature methods* (2009).

[18] Torrejón Yuste OJ, Diseño, fabricación y caracterización de un sensor de caudal para aplicaciones PCB-MEMS. Proyecto fin de carrera. Universidad de Sevilla (2011).

[19] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature* (2006).

[20] Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446(7136):633-9 (2007).

[21] Zhang Y, Bekku Y, Dzhashvili Y, Armenti S, Meng X, Sasaki Y, Milbrandt J, Salzer JL. Assembly and Maintenance of nodes of ranvier rely on distinct sources of proteins and targeting mechanisms. *Neuron* (2012).

