

Caracterización de flujos en microchips destinados a atrapar células individuales

A. Benavente Babace, A. Ubarrechena Bengoechea, E. Pérez Lorenzo, M. Mujika Garmendia

CEIT y Tecnun (Universidad de Navarra), Manuel de Lardizábal 15, 20018 San Sebastián, España, abenavente@ceit.es

Resumen

Es cada vez más habitual el uso de la tecnología microfluídica en el estudio de células individuales para observar sus comportamientos característicos en lugar de los poblacionales. Los dispositivos microfluídicos ofrecen numerosas ventajas frente a las técnicas macroscópicas convencionales. Estos dispositivos minimizan el consumo de reactivos, incrementan la sensibilidad, poseen una alta reproducibilidad y eficiencia y permiten un control preciso y fiable de los fluidos. En este trabajo se han caracterizado dos flujos que trasiegan a través de un dispositivo microfluídico capaz de atrapar células de manera individual para un análisis 'single-cell' posterior. Esta caracterización se ha llevado a cabo tanto teóricamente, mediante simulaciones computacionales, como experimentalmente. Concretamente, se ha estudiado la ocupación específica de cada fluido en función del ratio de flujos utilizado. Este análisis demuestra una correlación alta entre los resultados simulados y los datos experimentales. Además, se observa un comportamiento exponencial entre el ratio entre flujos y la variación en la ocupación de la cámara por ambos fluidos. Esto hace que, en magnitudes de flujo similares, la ocupación de la cámara sea muy sensible mientras que para conseguir ocupaciones extremas, alrededor de un 10-20% o 80-90%, el ratio de flujos tiene que ser muy elevado. Como aplicación directa de estos datos tenemos su uso para tratamientos superficiales selectivos o atrapamiento y manipulación celular selectiva.

1. Motivación

La manipulación celular es esencial en la investigación y el desarrollo de aplicaciones para el diagnóstico clínico. En muchos ensayos biológicos, se han cultivado miles de células sin considerar que la interacción entre todas ellas puede interferir en las señales ya que las células generalmente se encuentran en contacto unas con otras. Sin embargo, es bien conocido que las células individuales, incluso aquellas idénticas en apariencia, se diferencian en numerosas características como la concentración de un metabolito crítico o en una expresión génica particular pero resulta difícil analizar células individuales sin que sean influenciadas por el resto [1] [2]. Por esa razón, los datos medios obtenidos en ensayos de poblaciones celulares a veces proporcionan información errónea.

Es por eso que existe un énfasis creciente en el desarrollo de técnicas robustas y de alto rendimiento para el análisis de células individuales. Los dispositivos microfluídicos ofrecen una plataforma versátil con múltiples ventajas para

el análisis celular debido a sus características únicas [3]. La alta precisión de la microfabricación permite recrear microambientes controlados y reproducibles para el cultivo celular que serían imposibles mediante técnicas estándar de cultivo tisular y el uso de herramientas macroscópicas. Además, debido a la pequeña escala que comprende, el flujo que a traviesa el dispositivo se caracteriza por ser un flujo laminar, en el que el fluido se mueve en láminas paralelas sin entremezclarse. Gracias a ello, el flujo laminar proporciona medios por los que las células y los fluidos pueden ser transportadas de manera relativamente predecible a través de los microcanales y con ello se consigue manipular zonas específicas de los canales sin afectar a zonas colindantes [4].

Concretamente, en este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de dos flujos que atraviesan un dispositivo microfluídico destinado a atrapar y analizar células individuales. Dicho control variará en función de si los flujos son muy bajos o altos debido a sus propiedades o aplicación específica. Gracias a esta caracterización, es posible un control microfluídico dinámico de las células y de los diferentes fluidos que atraviesen el dispositivo. Todo esto, permite controlar en tiempo real y de manera reproducible y fiable, ensayos con diferentes medicamentos simultáneamente sin alterar las condiciones de contorno y así estudiar el comportamiento de cada célula de manera individual. Además, este control también se puede emplear para aplicar diferentes tratamientos superficiales a lo largo del microdispositivo.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño y fabricación de los dispositivos microfluídicos

Para este estudio se han fabricado dispositivos con dos geometrías diferentes. Ambas geometrías difieren en el número de cámaras: una o dos (ver Figura 1). Concretamente, las microcámaras tienen unas dimensiones de $4 \times 0,5 \text{ mm}^2$ y dentro de las mismas existen arrays de estructuras que emulan trampas encargadas de atrapar células individuales. Todos los chips se han fabricado con una altura de $25 \mu\text{m}$ ($\pm 1 \mu\text{m}$). La plataforma microfluídica completa ocupa aproximadamente un área de $24 \times 16 \text{ mm}^2$.

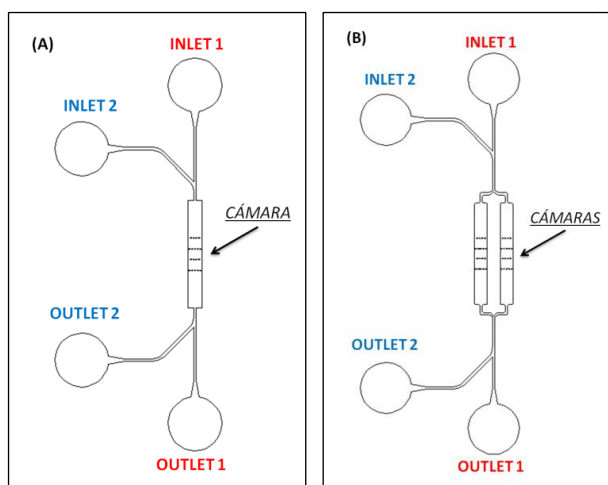


Figura 1. Tipos de chips. a) Con una cámara de captura. b) Dos cámaras de captura.

Por otro lado, los chips constan de dos canales de entrada y dos de salida. El canal de entrada derecho es recto y lo denominaremos *Inlet 1*. A este, se le incorpora un canal izquierdo que es curvado, denominado *Inlet 2* (ver Figura 1).

Los moldes para los diferentes chips microfluídicos utilizados se fabricaron mediante técnicas estándar de fotolitografía y ‘*soft-lithography*’ (litografía blanda) de una sola capa. Brevemente, se limpia una oblea de 4” en una solución de piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 1:1). Después se aclara y se cubre la oblea con una capa de $25\mu\text{m}$ de foto-resina (SU-8 2015, MicroChem Co.) para su posterior precocido, alineado e insolado. Una vez expuesta la oblea esta se vuelve a calentar antes de ser revelada. Finalmente se aclara con alcohol isopropílico.

Una vez fabricado el molde de SU-8, se transfieren las geometrías a la plataforma final fabricada en PDMS (polidimetilsiloxano) siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante – 10 partes de base por 1 de agente curante – este proceso se denomina mediante el término anglosajón ‘*casting*’. Para evitar burbujas en el dispositivo final, este se desgasifica antes de su curación.

Finalmente, se desmolda y se sella el dispositivo con una lámina de vidrio mediante un tratamiento por plasma de oxígeno (Femto®, Diener Electronic).

2.2. Reactivos

Para los estudios de control de flujo se han empleado dos tipos de fluidos, agua destilada y una mezcla de NaOH con fenoltaleína lo que le proporciona a este líquido un color rosáceo y facilita así su distinción. En todos los ensayos, el agua destilada se ha introducido por el canal derecho, o *inlet 1*, y se le denominará *fluído 1*. Por otro lado, el NaOH con fenoltaleína o, *fluído 2*, se ha introducido por el canal izquierdo o *inlet 2*.

2.3. Setup experimental

Para llevar a cabo la caracterización de los flujos, se han realizado diversos ensayos variando los flujos de entrada al microchip. Los fluidos se han introducido mediante dos bombas de jeringa (*eS-pump ESR200P*, NanoNC Co., Ltd. y *SP101i*, WPI Inc.) con el objetivo de administrarlos y controlarlos dentro del microsistema de forma automatizada y fiable. Estas bombas de jeringa están conectadas a cada una de las entradas del dispositivo microfluídico mediante unos tubos de plástico de $0,38\text{mm}$ de diámetro interior. Por otro lado, la extracción de los fluidos se lleva a cabo mediante tubos de plástico que evacúan el fluido al exterior con presión atmosférica. Finalmente, el microchip, se ha colocado en un microscopio invertido con una cámara incorporada (Nikon Eclipse TS100 y Nikon D90) que permite sacar fotografías y videos.



Figura 2. Setup experimental.

2.4. Toma de medidas y análisis de los resultados

Se han realizado diversas medidas variando ambos flujos a las entradas del dispositivo. Los rangos estudiados oscilan desde unos pocos microlitros por minutos hasta $100\mu\text{L}/\text{min}$. Por cada variación de flujo se han tomado varias fotografías (ver Figura 3) –una a los canales de entrada, otra a la/s cámara/s y por último, otra a los canales de salida.

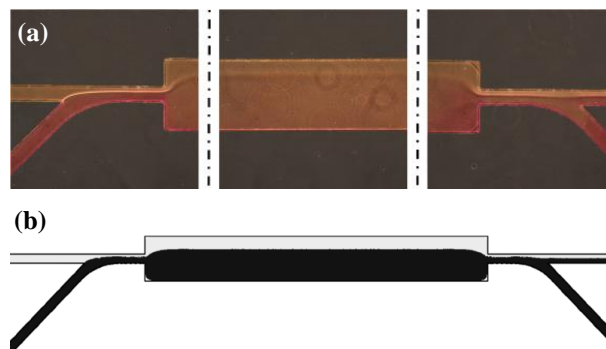


Figura 3. Flujo laminar en el dispositivo de una cámara con ocupación del 75% por el fluído 2, inferior. (a) Foto experimental. (b) Foto de la simulación en Comsol.

A partir de estas fotografías, gracias a que el flujo es laminar, se puede distinguir perfectamente la frontera o interfase que separa ambos fluidos en el interior del microchip. Para caracterizar los flujos, se ha medido la distancia que existe desde la pared izquierda de cada cámara hasta dicha interfase. Para ello se ha utilizado el programa *GNU Image Manipulation Program* (GIMP 2.8@ [5]). A partir de esta medida se obtiene el tanto por ciento [%] de la desviación del fluido 2 (el que entra por la entrada de la izquierda) sobre la anchura total de la cámara (ver Figura 4). Nótese que para los chips con dos cámaras, al menos una de ellas siempre estará al 100% de ocupación. Por lo tanto, todos los resultados, porcentajes, siempre serán con respecto a la ocupación del fluido 2 en la cámara correspondiente, la ocupación del fluido 1 será la restante.

2.5. Simulación por elementos finitos

Además de las medidas experimentales realizadas en los dispositivos de una cámara, también se ha llevado a cabo un estudio de simulación computacional en COMSOL Multiphysics (COMSOL, Inc.) para contrastar los resultados. El análisis se ha realizado tanto en chips con una sola cámara como en dispositivos con dos cámaras siguiendo el mismo procedimiento que en el caso experimental. Se han simulado diversos ratios de flujo tratando de abarcar todas las combinaciones posibles para controlar completamente la ocupación de cámara. Sin embargo, en este caso para cuantificar el porcentaje de cámara ocupado por cada fluido, en lugar de utilizar el software GIMP se ha utilizado un código propio de detección de la interfase mediante MATLAB (Mathworks, Inc.).

3. Resultados

El análisis de resultados se ha dividido en dos secciones: la primera correspondiente a los datos obtenidos para los chips con una sola cámara y la segunda para aquellos con dos cámaras.

3.1. Microdispositivos monocámara

Mediante simulación por elementos finitos se han obtenido los ratios de flujo necesarios para controlar de forma precisa la ocupación de la cámara. Este estudio se ha realizado de igual manera tanto para flujos del fluido 1 mayores que los del fluido 2 ($F1/F2 > 1$) como de manera inversa ($F2/F1 > 1$) (ver Figura 5). A partir de los resultados obtenidos se concluye que a pesar de que las entradas del dispositivo no son simétricas esto no afecta al desarrollo del fluido a lo largo del mismo. Cuando ambos flujos son iguales, el ratio es uno, la ocupación de la cámara es de exactamente un 50% para cada fluido según los datos simulados. Este efecto también se observa claramente en la simetría respecto del eje X que mantienen las curvas $F1/F2$ y $F2/F1$. Por otro lado, observamos un comportamiento asintótico en la ocupación de cámara. Los ratios o proporciones más sensibles para la manipulación de la cámara son los comprendidos entre 1 y 5 en los que la variación de la proporción de flujos produce una alteración máxima en cuanto la ocupación de la cámara. Para conseguir ocupaciones extremas de la cámara, esto es, muy bajas o muy altas, la proporción con la que hay que variar un flujo respecto del otro es muy elevada. Cabe destacar que, al trabajar con ratios, es posible conseguir una misma ocupación de cámara utilizando diferentes flujos en función del ensayo o aplicación.

Además, se observa una concordancia entre las medidas experimentales y el resultado de las simulaciones. En particular, se observa una discrepancia máxima de un 10% entre los experimentos y las simulaciones. Esta variación puede ser debida a diferentes artefactos: variación en el flujo introducido por cada bomba, error a la hora de llevar a cabo las medidas, etc. Para poder subsanar dichos errores es necesario llevar a cabo diferentes tácticas tales como la permutación de las bombas o replicar el mismo experimento, que son precisamente líneas futuras de este trabajo.

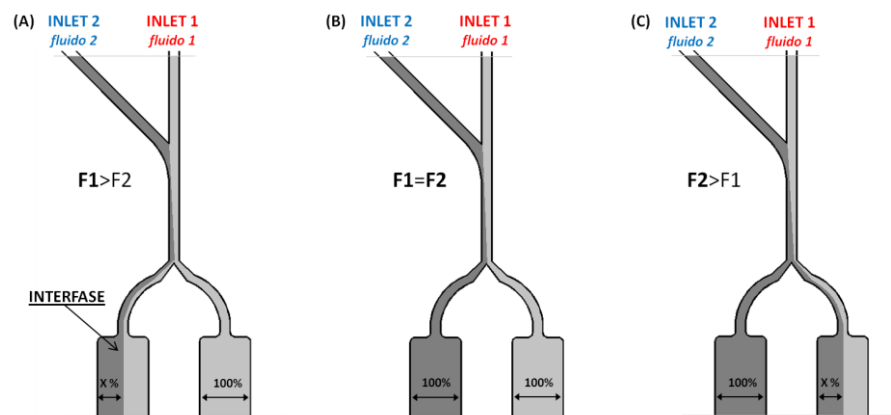


Figura 4. Ejemplos relevantes de las diferentes configuraciones de flujo en los dispositivos con dos cámaras.

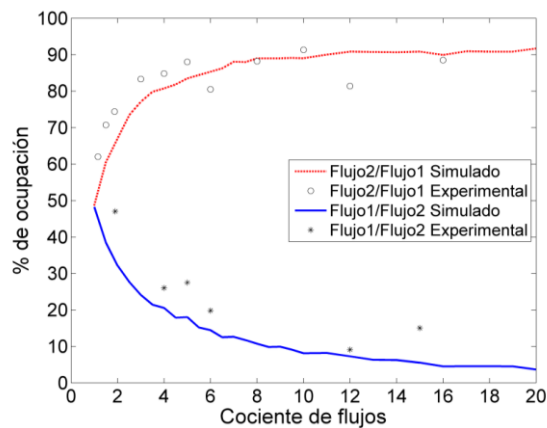


Figura 5. Porcentaje de la ocupación de cámara en función del ratio de flujos empleado.

3.2. Microdispositivos con dos cámaras

Para estos dispositivos sólo se ha llevado a cabo el estudio teórico mediante métodos numéricos en Comsol. Una vez más, se han simulado un amplio rango de ratios de flujo entre ambas entradas para obtener una caracterización que permita un control completo de la ocupación de ambas cámaras. Cabe destacar que, salvo casos excepcionales, existen sólo tres escenarios posibles (ver Figura 4) en los que al menos siempre una de las cámaras tendrá un 100% de ocupación por uno de los fluidos. La ocupación de la otra cámara es la que se representa en la Figura 6.

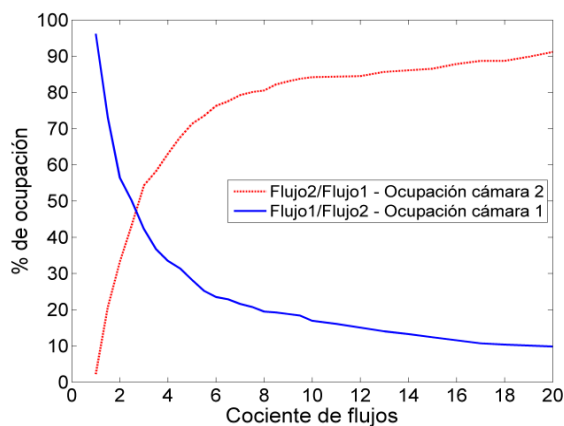


Figura 6. Porcentaje de la ocupación de las cámaras en función del ratio de flujos empleado.

El comportamiento de los fluidos en cada cámara es muy similar al observado en el caso de una cámara, en el que cuando la diferencia entre flujos es muy baja, ratios entre uno y cinco, la cámara es muy sensible a las variaciones. Y, por otro lado, a ratios muy altos, se observa un comportamiento asintótico en el que para ir ocupando con el fluido 1 la cámara 1 u ocupando la cámara 2 con el fluido 2 hay que suministrar un ratio de flujos muy alto. En este caso, nótese también un comportamiento simétrico entre cámaras, en general para un mismo ratio, la ocupación de las cámaras pasa a ser opuesta al invertir los flujos. Por lo tanto, cabe destacar que el control de

ocupaciones bajas de la cámara 2 es análogo a ocupaciones altas de la cámara 1 y es altamente sensible a variaciones en el ratio como se ha comentado con anterioridad; y viceversa, controlar ocupaciones bajas de la cámara 1 es análogo a controlar ocupaciones altas de la cámara 2 necesitando ambas situaciones una diferencia entre flujos muy alta que llega incluso a saturar.

4. Conclusiones

Se han caracterizado los flujos de entrada y salida en un dispositivo microfluídico capaz de atrapar células individuales. Concretamente se han estudiado chips con una y dos cámaras de atrapamiento. Estas plataformas microfluídicas permiten manipular dos fluidos simultáneamente. Además, gracias a que el flujo es laminar, característico de estas escalas micrométricas, el control preciso de estos fluidos permite ensayos mucho más controlados y precisos en los que cada fluido es capaz de atravesar el mismo canal por diferentes zonas sin afectar a áreas colindantes. También se ha comprobado que partiendo de los datos aquí proporcionados, podemos conseguir la misma ocupación de cámara empleando diferentes rangos de flujos, basta con mantener la misma proporción entre ellos. Sin embargo, podría ser necesario realizar un estudio para flujos mayores de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ debido a posibles efectos no contemplados en los intervalos de flujo considerados en este trabajo. El control y el comportamiento de la ocupación de cámara en función de los diferentes ratios son similares tanto en los dispositivos con una sola cámara como en los de dos.

Este trabajo abre la puerta a estudios biológicos de interés tales como el tratamiento hidrofóbico de una cámara e hidrofílico de la otra o la aplicación de diferentes tratamientos de forma independiente y simultánea a células de una misma población.

Agradecimientos

Por último agradecer al Gobierno Vasco por la beca predoctoral para formación y perfeccionamiento de personal investigador concedida a Ainara Benavente.

Referencias

- [1] Graf T, y Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells, *Cell Stem Cell*, vol. 3, pp. 480-483, 2008.
- [2] Walling M. y Shepard J. Cellular heterogeneity and live cell arrays, *Chemical Society Reviews*, vol. 40, pp. 4049-4076, 2011.
- [3] El-Ali J, Sorger PK. y Jensen KF. Cells on chips, *Nature*, pp. 403-411, 2006.
- [4] Meng L, Cai F, Zhang Z, Niu L, Jin Q, Yan F, Wu J, Wang Z. y Zheng H. Transportation of single cell and microbubbles by phase-shift introduced to standing leaky surface acoustic waves, *Biomechanics*, vol. 5, p. 044104, 2011.
- [5] The GIMP team, «GIMP - The GNU Image Manipulation Program,» 2001-2012. [En línea]. <http://www.gimp.org>