



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,
Unidad Monterrey**

Dispositivo microfluídico para la detección de proteínas
secretadas por células individuales

Tesis que presenta

Diana Fabiola Cedillo Alcántar

para obtener el grado de Maestro en Ciencias en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nuevo León

Agosto de 2016

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Dr. José Luis García Cordero por la confianza que me brindo para formar parte de su grupo de trabajo, además por todo su apoyo y guía para el desarrollo este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada y al CINVESTAV por la oportunidad de cursar esta maestría.

A mis padres que siempre me han apoyado incondicionalmente y por haberme guiado en la vida. A mis hermanos por toda su confianza y cariño.

A mis compañeros de generación y de laboratorio por todo el tiempo que pasamos juntos.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	2
TABLA DE CONTENIDO	3
ABSTRACT.....	5
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.	7
1.1 Heterogeneidad: poblaciones y células individuales	7
1.1.1 Fuentes de heterogeneidad en poblaciones isogénicas.....	8
1.1.2 Relevancia de la heterogeneidad	9
1.1.3 Importancia del análisis de células individuales.	9
1.2 Proteómica en Células individuales.....	13
1.2.1 Secreción de proteínas.....	13
1.2.2 Técnicas de análisis de citocinas.	15
1.3 Microfluídica	17
1.3.1 Fabricación de dispositivos microfluídica.	18
1.3.2 Dispositivos para captura de células individuales	20
1.3.3 Medición de secreción de proteínas con dispositivos microfluídicos	22
1.4 Justificación	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo General.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Funcionamiento de las trampas hidrodinámicas.....	27

3.2 Simulación del sistema.	30
3.3 Diseño de los dispositivos.	32
3.3.1 Diseño del dispositivo de trampas.	32
3.4 Fabricación de dispositivos.	34
3.4.1 Fabricación del molde.	34
3.4.2 Fabricación de dispositivos de PDMS.	39
3.5 Metodología de los experimentos.	41
3.5.1 Cultivo celular.	41
3.5.3 Experimentos en dispositivo con trampas.	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 Simulaciones.	44
4.2 Medidas del dispositivo.	46
4.3 Optimización de concentraciones.	49
4.4 Eficiencia de captura.	50
4.4.1 Captura de células.	50
4.4.2 Captura de perlas.	52
4.4.3 Captura de células y perlas.	54
5. CONCLUSIONES	58
6. PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	60

ABSTRACT

Heterogeneity is a universal characteristic of living organisms, making each individual in a population different or unique, even in an isogenic population. This variability generates different cellular responses such as protein secretion, which can influence the fate of the population. Several techniques exist to measure protein secretion; however, they generally rely on large ensembles of cells masking individual responses. In order to gain a deeper understanding about how cells respond to a certain stimulus, it is necessary to analyze them in an individual fashion.

The conventional techniques for the analysis of secreted proteins on individual cells have certain limitations, such as, being unable to perform protein quantitation, being incompatible with live cell assays, and limited to detect intrinsic proteins rather than secreted proteins. However, some of these limitations can be overcome with microfluidic techniques.

We developed a proof-of-concept microfluidic device for the detection of secreted proteins from individual cells, using microbeads functionalized with antibodies as a bio-sensing element. We implemented microfluidic hydrodynamic traps to capture a single cell and a single microbead. The device consists of three parallel channels that can be independently closed or opened to control fluid flow through the channels, and direct either cells or beads in their capturing sites. As result, our device is capable of single cell and microbead trapping, reaching capture efficiencies of 58% in 10 min. We also demonstrated that captured cells remain viable.

RESUMEN

La heterogeneidad es una característica universal de los organismos vivos, por lo que cada individuo en una población es único o diferente, incluso en poblaciones isogénicas. Esta variabilidad genera diferentes respuestas en la secreción de proteínas, y esto puede influir en el destino de la población. Existen varias técnicas para medir la secreción de proteínas, sin embargo, generalmente se basan en grandes conjuntos de células que enmascaran las respuestas individuales. Con el fin de tener una comprensión más profunda de cómo las células responden a un determinado estímulo, es necesario analizarlas de forma individual.

Las técnicas convencionales para medir la secreción de proteínas en células individuales tienen ciertas limitaciones, ya que no es posible cuantificar las proteínas, las células no permanecen vivas o solo detectan proteínas intrínsecas en lugar de proteínas secretadas. Sin embargo estas limitaciones se pueden superar con el uso de la microfluídica.

Aquí se presenta un dispositivo microfluídico como prueba de concepto para la detección de proteínas secretadas en células individuales, usando como biosensor microperlas funcionalizadas con anticuerpos. En el sistema microfluídico se usaron trampas hidrodinámicas para la captura de células y perlas individuales. El dispositivo consta de tres canales paralelos, a los que voluntariamente se les puede abrir o cerrar las salidas para permitir o bloquear el flujo hacia los canales y lograr dirigir a las células y perlas a sus sitios de captura. Como resultado, nuestro dispositivo es capaz de atrapar células y perlas individuales alcanzando la máxima eficiencia de captura de 58% en 10 min, además tenemos la certeza de capturar células vivas.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Heterogeneidad: poblaciones y células individuales

Una población es un grupo de individuos de la misma especie que viven en el mismo espacio y tienen una probabilidad alta de interactuar entre sí [1]. Con base en la gran cantidad de evidencia existente, se puede afirmar que cada individuo dentro de una población es diferente [2-4]. Este hecho demuestra que la heterogeneidad es una característica universal de los organismos vivos, presente desde sistemas superiores hasta el nivel celular [4-6].

En una población, cada individuo puede diferenciarse o caracterizarse por su genotipo, es decir, por la secuenciación de su DNA [7]. Estas diferencias genéticas en las poblaciones, ya sean por herencia o por factores ambientales (epigenética), generan heterogeneidad [8]; sin embargo, las poblaciones que poseen el mismo material genético, a las cuales se denomina isogénicas, también presentan variabilidad en su fenotipo (apariencia) y en su comportamiento. Por ejemplo una población isogénica de bacterias *E. coli*, sometidas a un mismo inductor presenta variaciones en el nivel de expresión de proteínas [6,9].

1.1.1 Fuentes de heterogeneidad en poblaciones isogénicas

La heterogeneidad en poblaciones clonales (isogénicas) se debe a la estocasticidad en la expresión de genes y en su actividad celular, lo cual depende de una combinación de ruido intrínseco y extrínseco [9,10]. El ruido extrínseco se refiere a la variación que surge a partir de la dinámica que regula la expresión genética, como la concentración y la ubicación de las moléculas reguladoras. El ruido intrínseco consiste en la aleatoriedad inherente debida a los eventos que controlan los procesos bioquímicos dentro de la célula, tales como la transcripción y traducción [9]. Otros factores que generan heterogeneidad en poblaciones isogénicas (Figura 1.1) son las diferencias en las condiciones ambientales (gradientes de morfógenos o la falta de control sobre el microambiente celular), las diferencias en el estado del ciclo celular y la edad celular [8,9].

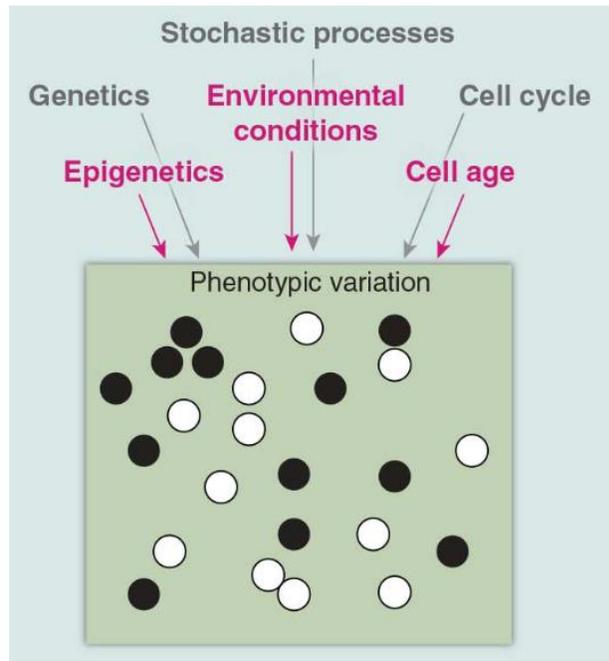


Figura 1.1. Las fuentes que provocan heterogeneidad en poblaciones celulares, tales como diferencias genéticas, procesos estocásticos, diferencias de edad y en el estado del ciclo celular, epigenética y condiciones ambientales. Tomado de [8]

1.1.2 Relevancia de la heterogeneidad

Una célula debe adaptarse a las condiciones cambiantes de su microambiente, como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes o la presencia de toxinas [11,12]. Para garantizar la supervivencia de la población ante los cambios ambientales, cada célula debe responder mediante sus redes de regulación interna, por lo que la heterogeneidad puede ser benéfica, o incluso necesaria, para una población celular [10]. Las fuentes que generan heterogeneidad pueden ser favorables para la supervivencia de la población, por ejemplo, evidencias demuestran que la aleatoriedad en las fluctuaciones del ambiente celular benefician el crecimiento y la longevidad celular [12, 13]. Ahora bien, la heterogeneidad también puede ser una desventaja, ya que en estudios se ha demostrado que el ruido en la expresión de genes es perjudicial para la supervivencia de células eucariotas [14].

La heterogeneidad tiene consecuencias importantes que contribuyen a la diversidad de la respuesta celular. Algunos ejemplos destacados de variabilidad se presentan en las respuestas de las células del sistema inmune al combatir infecciones [15], en la supervivencia de subgrupos en una población isogénica de bacterias o virus tras someterse a algún tratamiento [16, 17], o en el aceleramiento de la progresión de tumores al existir mutaciones en grupos de células que favorecen su crecimiento y proliferación [18]. Si una población celular no se comporta o responde de manera uniforme, los diagnósticos, tratamientos y terapias se vuelven menos exactos [19]. Por eso es importante poder estudiar las diversas respuestas y comportamientos celulares en forma individual.

1.1.3 Importancia del análisis de células individuales.

El análisis de células individuales es relevante en la medición de la heterogeneidad porque permite conocer las diferentes respuestas de una población celular isogénica [8]. Al analizar las células en grupo, se obtiene

como resultado el promedio de su comportamiento, lo cual oculta las respuestas individuales existentes debido a la heterogeneidad [20, 21]. Por ejemplo, al estudiar una población celular y presentar los resultados en una distribución normal, las células en los extremos de la distribución tendrán un comportamiento diferente del resto de la población (Figura 1.2). Del mismo modo, pueden existir pequeñas subpoblaciones con una respuesta distinta a la del promedio de la población o incluso poblaciones que presenten un comportamiento bimodal, en las cuales la media no representaría el comportamiento de la mayoría de las células [22]. Por lo tanto, para poder conocer más a fondo el comportamiento celular y las posibles subpoblaciones, es necesario analizar cada célula de manera individual.

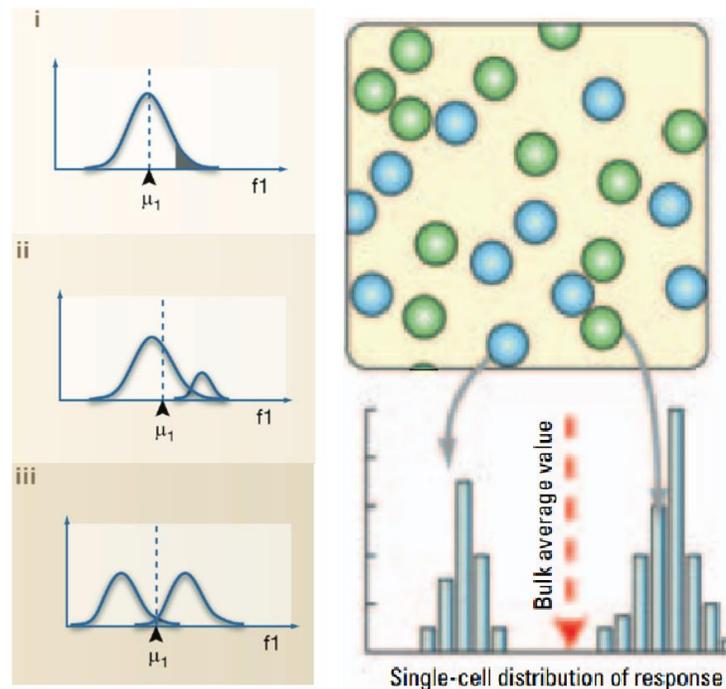


Figura 1.2. Posibles distribuciones del comportamiento de una población celular, donde células pueden tener diferentes comportamientos, como las células en los extremos de la distribución, subpoblaciones pequeñas, o comportamientos bimodales donde el promedio no representa la respuesta de ninguna célula.

Tomadas de [22, 25]

Evidencias han demostrado que el promedio poblacional no siempre representa la respuesta real de las células individuales. En un estudio donde una población isogénica de células Jurkat T se trató con siRNA para silenciar el gen GAPDH, se encontraron dos subpoblaciones, una en la cual se silenció completamente el gen y otra en la que hubo un silenciamiento medio. El resultado promedio de 50 células no fue representativo de ninguna célula individual (Figura 1.3a) [23]. En otro estudio sobre una población isogénica de células embrionarias (células HEK293) se evaluó la activación de la proteína ERK en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y se observó una respuesta bimodal (Figura 1.3b), la cual se pudo determinar al analizar individualmente cada célula [24].

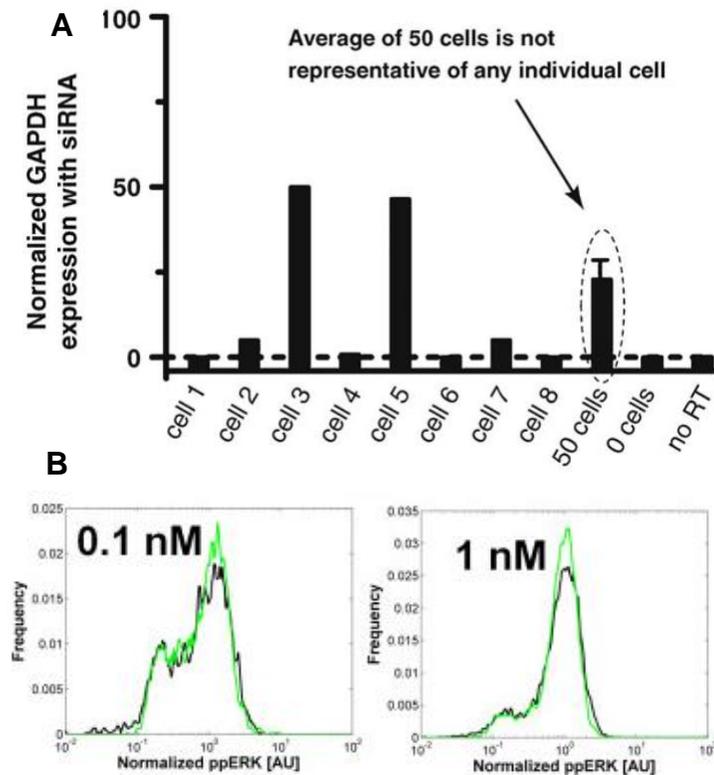


Figura 1.3. Poblaciones presentando comportamiento bimodal. A) Dos subpoblaciones encontradas en células Jurkat al silenciar un gen, donde el promedio no representa la respuesta de ninguna célula. B) Comportamiento bimodal en la expresión de una proteínas al inducir estímulos a células HEK293. Tomadas de [23, 24]

Por otra parte, la dinámica de los procesos celulares permite tener un conocimiento más detallado de la función celular. La dinámica describe el cambio de cualquier variable cuantitativa a lo largo del tiempo. No obstante, también puede ser inadecuado medir el promedio de la dinámica en una población de células [25]. Por ejemplo, al medir el promedio de la dinámica de la concentración de la proteína p53 (Figura 1.4) en respuesta a un estímulo se observa un comportamiento oscilatorio amortiguado, en cambio al analizar la dinámica de la concentración de p53 en células individuales se observan diferentes comportamientos de pulsos no amortiguados [26].

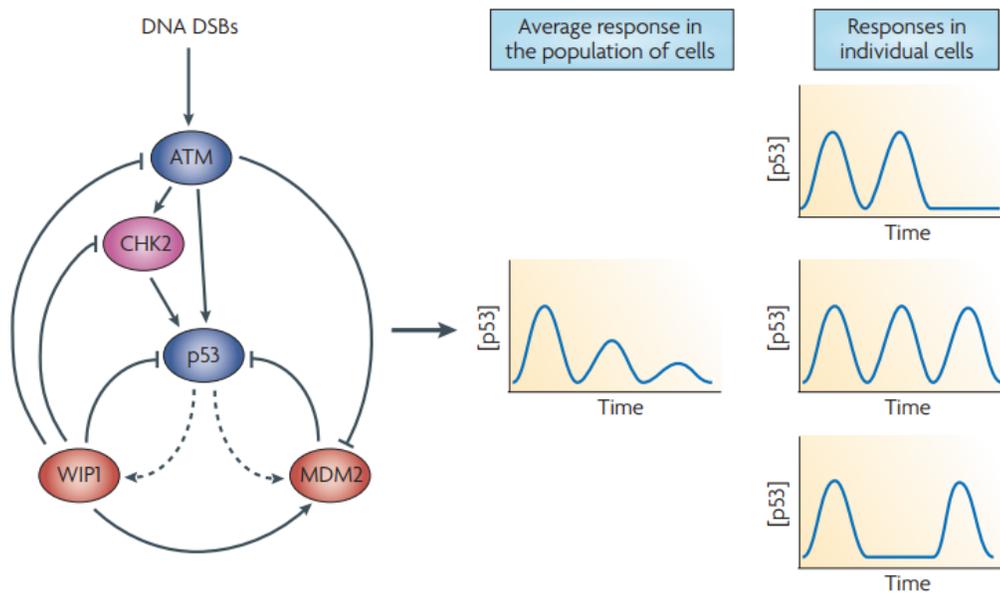


Figura 1 4. Comparación de información obtenida en un enfoque poblacional y en un enfoque individual de la dinámica de activación de la proteína p53. El enfoque poblacional muestra resultados oscilatorios amortiguados en contraste con enfoques individuales que presenta pulsos no amortiguados. Tomada de [26]

1.2 Proteómica en Células individuales.

La proteómica se encarga del estudio a gran escala de la estructura y función de las proteínas [27]. Las proteínas son esenciales para todos los procesos celulares, ya que la mayoría proveen estructura a las células, participan en el transporte de moléculas a través de las membranas celulares, controlan el crecimiento celular, catalizan procesos bioquímicos, regulan de la transducción de señales y participan en la comunicación celular [28-32]. Es por esto que la caracterización de la cantidad y actividad de las proteínas funcionales es fundamental para la comprensión de los mecanismos moleculares de los procesos celulares, incluyendo a los implicados en la progresión de enfermedades, así como en la diferenciación, migración y destino celular [21]. La medición de DNA y RNA puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa sobre los productos génicos como las proteínas, sin embargo no siempre existe una correlación entre los genes y la producción de proteínas, debido a esto, lo ideal es la medición directa de proteínas [27]. Existen numerosos métodos de análisis de proteínas [21], sin embargo muchas de esas técnicas requieren un número elevado de células para el análisis, lo que resulta en una medición promediada de la población. Como se mencionó antes, las células son de naturaleza heterogénea y los datos del promedio de la población pueden enmascarar los mecanismos moleculares subyacentes [26], por lo que son preferibles los datos de células individuales.

1.2.1 Secreción de proteínas.

Un grupo de proteínas llamadas citocinas desempeñan un papel en la comunicación intercelular y median las interacciones complejas entre células. Las citocinas son proteínas reguladoras de bajo peso molecular o glucoproteínas liberadas por células secretoras en respuesta a diversos

estímulos. Estas proteínas ayudan a regular el desarrollo de células inmunitarias efectoras [33,35].

Las citocinas se unen a receptores específicos en la membrana de las células blanco e inician vías de transducción de señales que alteran la expresión génica en dichas células. Una citocina puede (1) unirse a receptores en la membrana de la misma célula que la secreta y ejercer una acción autocrina, (2) puede también adherirse a receptores en una célula blanco cercana a la célula productora y llevar a cabo una comunicación paracrina, o en unos cuantos casos, (3) unirse a células blanco en partes distantes del cuerpo y ejercer una acción endocrina (Figura 1.5). Las citocinas regulan la intensidad y duración de la respuesta inmunitaria al estimular o inhibir la activación, proliferación y diferenciación de diversas células, así como controlar la secreción de anticuerpos u otras citocinas [36].

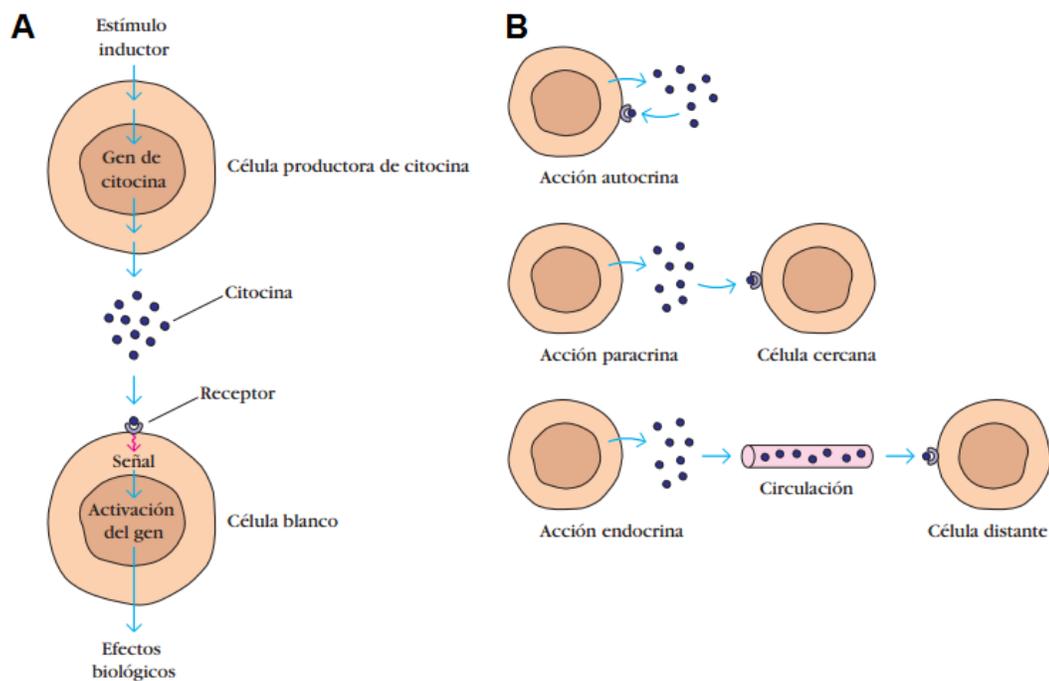


Figura 1.5. Comunicación celular por medio de la secreción de citocinas. A) Proceso de la secreción de citocinas y como sucede la comunicación, B) Diferentes tipos de comunicación, autocrina, paracrina y endocrina. Tomado de [33]

Una de las maneras en las que se puede clasificar a las citocinas es a través de su papel durante una infección, ya que cuando unas citocinas promueven la inflamación estas se denominan citocinas pro-inflamatorias. Algunos ejemplos de este tipo de citocinas son el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina 1 (IL-1) [37]. Por otro lado, también existen citocinas que suprimen la actividad de las citocinas pro-inflamatorias y estas se denominan citocinas anti-inflamatorias, como las interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13 [38]. Para que la defensa contra un agente patógeno se inicie de manera eficaz es necesaria la participación de citocinas con función pro-inflamatoria. La respuesta pro-inflamatoria inicial está controlada por moléculas anti-inflamatorias. En condiciones fisiológicas, todas estas proteínas ejercen una función inmunomoduladora y, por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. [39]

La respuesta celular ante un agente patógeno puede analizarse al medir las citocinas secretadas. Los agentes patógenos pueden ser bacterias, virus u hongos, aunque también se puede estudiar la respuesta con otras moléculas como LPS (lipopolisacárido), el cual está presente en la membrana de algunas bacterias [40, 41]. Por otra parte, el análisis de citocinas es de suma importancia en el diagnóstico de enfermedades ya que en varios padecimientos se han encontrado defectos en las redes reguladoras que rigen la síntesis de citocinas, lo que resulta en una expresión excesiva o disminuida de este tipo de proteínas, por ejemplo en enfermedades como la sepsis o en los tipos de cáncer linfóide y mielóide [42,43].

1.2.2 Técnicas de análisis de citocinas.

Un inmunoensayo es un conjunto de técnicas analíticas que utilizan la interacción antígeno-anticuerpo para determinar la presencia y concentración de la proteína de interés (antígeno) [44]. Con la obtención de anticuerpos

específicos para las citocinas más importantes se permitió el desarrollo de técnicas para la cuantificación y detección de citocinas [33].

Uno de los métodos más usados para la medición de citocinas es el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) [45]. En este método una muestra que contiene la citocina de interés se deposita en una placa de pozos para ELISA. Cabe destacar que la muestra es el sobrenadante de una población celular previamente estimulada y cultivada. En los pozos se encuentran inmovilizados los anticuerpos de captura específicos para la citocina, después se añade un segundo anticuerpo específico conjugado con una enzima, lo cual forma un inmunoensayo tipo sándwich con la citocina capturada. Al añadirse un sustrato la reacción catalizada por la enzima genera como resultado un cambio de color en el medio, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de citocina unida al anticuerpo de captura, en el cual se compara con la densidad óptica de este color producido por la muestra con los valores observados en una curva estándar [33]. En esta técnica se obtiene como resultado el promedio de todas las proteínas secretadas de la población celular.

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos (ELISpot) es otro método de detección de proteínas que se basa en el mismo fundamento que la técnica ELISA, este ensayo permite detectar las proteínas secretadas en células individuales pero no es capaz de cuantificar las proteínas. En esta técnica se inmovilizan las células de interés en una placa usando anticuerpos de captura en la superficie contra marcadores específicos de la membrana celular. La superficie de la placa también está recubierta con anticuerpos de captura específicos contra las proteínas secretadas. Cuando las células unidas secretan proteínas, se emplean anticuerpos secundarios marcados que se unen a las proteínas capturadas y proporcionan una lectura. Al correlacionar espacialmente las manchas con la ubicación de las células, se registra la fracción de células que secretan activamente la proteína de interés [46].

Con la aparición de los láseres, los detectores de fotones y la electrónica de alta velocidad, se desarrolló la citometría de flujo de fluorescencia (FFC) y la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Por otro lado, los avances en la espectrometría de masas permitieron el desarrollo de la citometría de masa. Estas herramientas han permitido la clasificación de fenotipos celulares basados en mediciones de marcadores de membrana y proteínas intracelulares. Estas técnicas permiten la medición multiplexada de proteínas en células individuales. Para detectar y cuantificar las citocinas, primero se añaden a las células inhibidores que bloquean la secreción, luego se fijan y se permea la membrana para introducir anticuerpos específicos marcados con un fluoróforo o un isótopo para posteriormente analizar las células de manera individual [37, 47-49].

1.3 Microfluídica

La microfluídica es la ciencia y tecnología que manipula pequeñas cantidades de fluidos (nanolitros y picolitros) utilizando canales con dimensiones micrométricas. [50]. Con el uso de técnicas de microfabricación versátiles se elaboran dispositivos microfluídicos, los cuales poseen ventajas importantes sobre las plataformas convencionales, tales como alta resolución y sensibilidad en la separación y detección de muestras, menor consumo de muestra y reactivos, bajo costo de fabricación, así como una considerable disminución de tiempo en los ensayos analíticos [51].

Las primeras aplicaciones de los dispositivos microfluídicos fueron principalmente en el análisis de moléculas [52], sin embargo la microfluídica ha expandido rápidamente sus aplicaciones más allá del nivel molecular. El tamaño de los canales en los dispositivos microfluídicos generalmente se encuentra dentro del rango de micrómetros, por lo que son proporcionales a las dimensiones de las células y su microambiente. Por lo tanto, los dispositivos microfluídicos se han convertido en una plataforma ideal para la

manipulación y el análisis de células [54-59]. Cabe destacar que los materiales usados en las técnicas de fabricación, como la litografía suave, emplean materiales biocompatibles y transparentes que los hace idóneos para realizar ensayos biológicos [60].

1.3.1 Fabricación de dispositivos microfluídica.

Existen diferentes técnicas para la fabricación de dispositivos microfluídicos, tales como micromaquinado, impresión en 3D y litografía suave. Para aplicaciones biológicas, la litografía suave es la técnica más usada, ya que emplea un polímero llamado PDMS (polidimetilsiloxano), cuyas características de biocompatibilidad y transparencia lo hacen idóneo para ensayos biológicos. Además se puede moldear a estructuras con dimensiones de hasta 0.1 μm , se polimeriza rápido y es capaz de crear enlaces covalentes con otras superficies tratadas [61].

La litografía suave se basa en la fabricación de un molde mediante la técnica de fotolitografía, la cual se utiliza ampliamente en la industria de los semiconductores [62]. Para la fabricación (Figura 1.6), primero se realiza un diseño en un software CAD, posteriormente se recubre una oblea de silicio con una foto-resina, la cual consiste en un polímero fotosensible que al incidirse por un haz UV cambia sus propiedades físicas y químicas [63]. El molde puede exponerse en un equipo llamado Micro Pattern Generator, el cual traza el diseño del dispositivo con un láser de luz UV para después retirar las partes no expuestas utilizando un revelador. Una vez que se tiene el molde, se le vierte una mezcla de PDMS con un agente curador y se deja polimerizar para que tome la forma del molde. Finalmente, se retira el polímero del molde y se adhiere a un portaobjetos tratando la superficie del PDMS y la del vidrio con plasma de oxígeno, lo cual provoca que se generen enlaces covalentes al entrar en contacto las dos superficies [64].

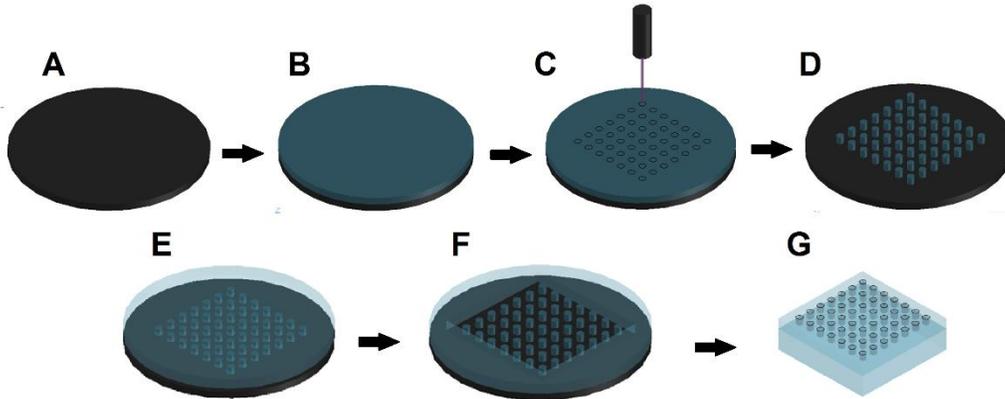


Figura 1.6. Proceso de fabricación por litografía suave. A) Oblea de silicio. B) Oblea de silicio recubierta con una fotorresina. C) Exposición al laser de luz UV de la máscara con los canales microfluídicos impresos. D) Molde después del revelado. E) Molde recubierto con PDMS. F) Se retira el dispositivo de PDMS del molde, F) Se pega el dispositivo a un portaobjetos.

La técnica de litografía suave multicapa permite la unión de dos o más capas de PDMS. Una de las ventajas del ensamblaje de múltiples capas es permitir la creación de microválvulas [65]. Las válvulas de Quake son las microválvulas neumáticas más usadas (Figura 1.7). Estas consisten en una doble capa de PDMS, donde el líquido fluye en el interior de los canales de la capa inferior (capa de flujo) mientras que los canales de la capa superior (capa de control) se llenan con líquido; las dos capas están separadas por una membrana delgada. La válvula se activa cuando se inyecta aire presurizado a un canal de la capa superior y este comprime los canales de la capa de fluido, permitiendo el control del fluido [66]. Para que las válvulas funcionen, los canales de la capa de flujo deben tener un perfil redondeado. Esto se logra fabricando el molde de la capa de flujo con una resina positiva. Esta resina se somete a un proceso denominado reflujado, el cual consiste en calentar el molde a una temperatura que supere la transición de fase de la resina, provocando que los canales se redondeen [67].

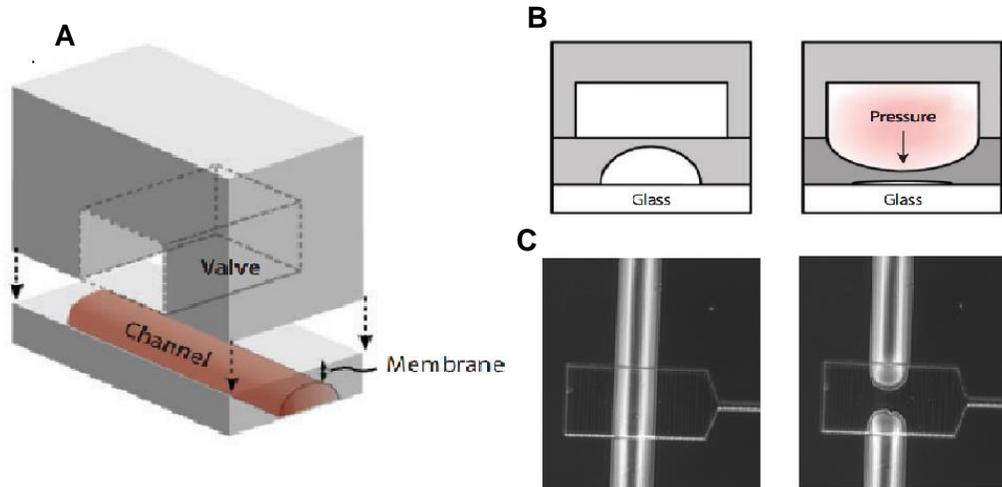


Figura 1.7. Válvulas de Quake A) Representación en 3D de cómo se alinean la capa de control y de flujo para formar válvulas, B) Representación de como cierran las válvulas con una vista lateral en 2D y C) Micrografía en contraste de fases del funcionamiento de las válvula se muestra un canal abierto y otro cerrado. Tomado de [66,78]

1.3.2 Dispositivos para captura de células individuales

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosos dispositivos para el análisis de células individuales. Estos dispositivos microfluídicos se han aplicado en la investigación de genes, proteínas, citotoxicidad, diferenciación, entre otras, para esto se han utilizado diversas técnicas de captura celular como pozos y trampas [68].

Un método común para aislar células individuales es a través de límites físicos utilizando micropozos, con los cuales se espera disminuir el tiempo del análisis gracias a sus tamaños y volúmenes más pequeños. Por ejemplo, se han construido dispositivos con micropozos (Figura 1.8) para capturar células individuales en pozos de 100 μm , las cuales se transfirieron posteriormente a pozos de 300 μm con el fin de estudiar su diferenciación, proliferación y formación de colonias [69].

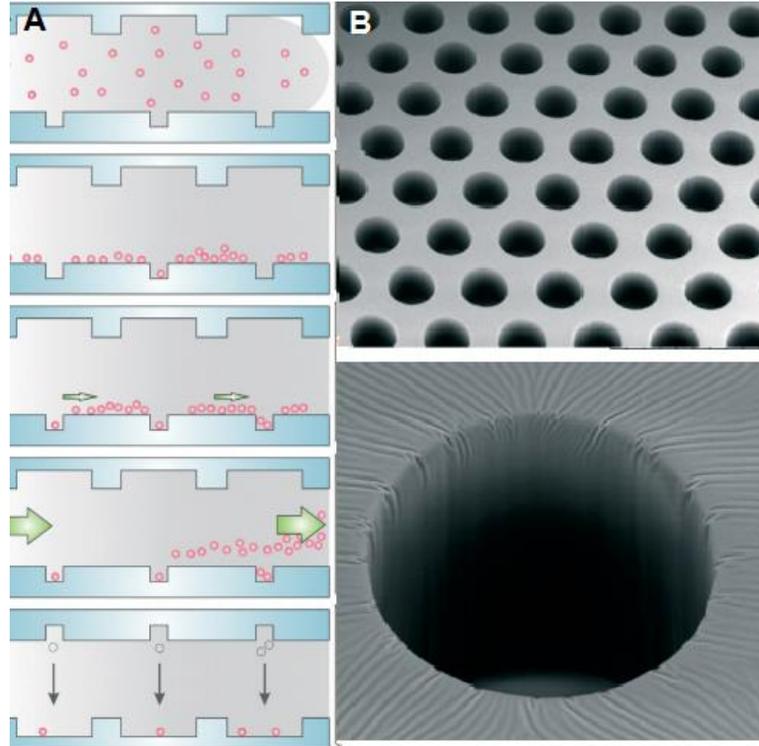


Figura 1.8. Dispositivo de micropozos para el análisis de células individuales, A) representación del funcionamiento el dispositivo y B) micrografías de los pozos implementados en el dispositivo. Tomado de [69]

Del mismo modo que los micropozos, el uso de trampas para la captura de células individuales mantiene a las células en lugares fijos permitiendo el suministro de nutrientes o reactivos y facilitando su análisis durante periodos largos de tiempo, lo que permite realizar estudios temporales. Por ejemplo, se han utilizado trampas hidrodinámicas (Figura 1.9) para medir la heterogeneidad en el comportamiento oscilatorio del calcio en células genéticamente idénticas, además se midió la cinética de la respuesta celular ante estímulos químicos [70].

Además de trampas hidrodinámicas y pozos, existen diversos métodos para aislar células individuales como trampas magnéticas, ópticas o mecánicas [71-73], así como gotas o microestampado de superficies para

captura con anticuerpos. Estas técnicas se han usado para numerosos estudios, sin embargo son contadas las técnicas utilizadas para estudiar la secreción de proteínas.

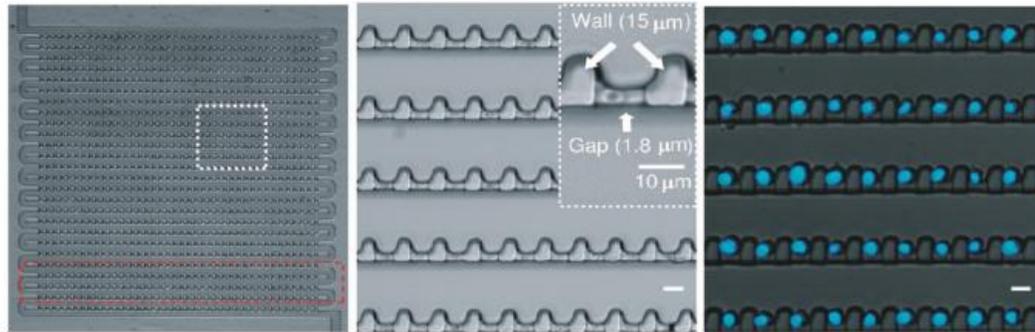


Figura 1.9. Dispositivo microfluídico con trampas hidrodinámicas para la captura de células individuales. Tomada de [70]

1.3.3 Medición de secreción de proteínas con dispositivos microfluídicos

Aunque hay diferentes parámetros que pueden medirse en una sola célula, la variabilidad en los niveles de proteínas funcionales secretadas por la célula tiene un alto impacto biológico. Por tal razón se han desarrollado dispositivos microfluídicos para medir la secreción en células individuales, los cuales poseen diversas ventajas sobre las técnicas convencionales. Las principales ventajas son que las células permanecen viables durante el análisis y no se les suministra inhibidores de secreción como en las técnicas de citometría de flujo. Además, es posible cuantificar las proteínas, a diferencia del ELISpot, y los ensayos son, generalmente, de menor duración debido a los pequeños volúmenes empleados. A continuación se mencionan algunos ejemplos de dispositivos que se han utilizado para medir la secreción de proteínas en células individuales [68].

En un micropozo cerrado fue posible obtener la tasa de secreción de IL6 de una población de células J774.1 (Figura 1.10). En la pared superior del pozo se inmovilizaron las proteínas secretadas mediante anticuerpos de captura, por su parte la detección de las proteínas se realizó empleando anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo. Después de un tiempo específico de incubación se midió la intensidad de fluorescencia para obtener la distribución poblacional de la tasa de secreción [74].

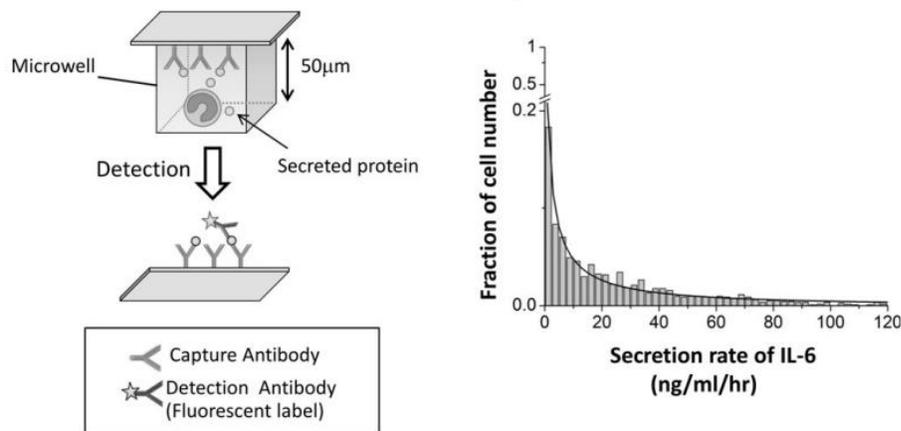


Figura 1.10. Representación del dispositivo microfluídico para determinar la tasas de secreción en células individuales. Representación de pozos cerrados para aislar células individuales y grafica de la tasa de secreción de IL-6. Tomada de [74]

Asimismo, se ha logrado multiplexar la medición de la secreción de proteínas en células individuales usando un *código de barras* en un dispositivo microfluídico (Figura 1.11a). En la superficie del dispositivo se inmovilizó DNA monocatenario conjugado con diferentes anticuerpos de captura. Alineando una capa de PDMS, la suspensión celular se hizo fluir por los canales y las células se aislaron al activar válvulas que forman microcámaras [75].

También se ha implementado el uso de microperlas funcionalizadas con anticuerpos de captura, ya que su reducida área permite la detección de un bajo nivel de proteínas. Por ejemplo, se utilizaron para medir la dinámica de

secreción de interferón gamma en células del sistema inmune (Figura 1.11b). Las células se capturaron empleando anticuerpos específicos para marcadores de membrana y se aislaron junto con las perlas en compartimentos cerrados [76].

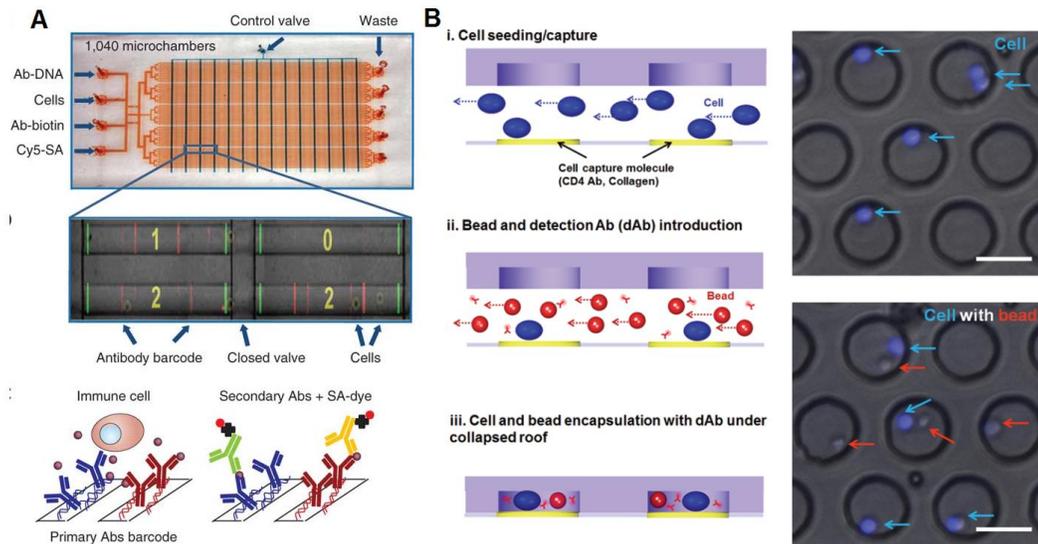


Figura 1.14. Dispositivos para la medición de la secreción de proteínas en células individuales. A) Dispositivo con un código de barras de DNA monocatenario conjugado con anticuerpos de captura. B) Dispositivo con microperlas funcionalidades con anticuerpos de captura. Tomada de [75, 76]

1.4 Justificación

Como se ha mencionado, la heterogeneidad está presente en los sistemas biológicos, y esto puede implicar diferentes comportamientos y respuestas dentro de las poblaciones celulares. Para poder elucidar mejor la comunicación celular, la reacción de las células ante agentes patógenos o algunas enfermedades, se debe analizar las proteínas secretadas. Sin embargo no es suficiente analizar la producción de proteínas a nivel poblaciones en donde se obtiene el promedio de la respuesta, ya que esto puede enmascarar información relevante. Para tener un conocimiento más certero del comportamiento celular es de suma importancia poder manipular y analizar células individuales. Aunque en la actualidad ya existen técnicas para el análisis de proteínas secretadas por células individuales, las cuales han aportado información relevante, aun se debe buscar la forma de mejorar este tipo de análisis. Como ya se mencionó, la microfluídica ha logrado mejorar estos análisis al no interferir con la secreción y al lograr realizar análisis cuantitativos. Sin embargo estas aún se puede mejorar o simplificar.

En el presente trabajo, se implementó y se caracterizó un dispositivo microfluídico basado en trampas hidrodinámicas y microperlas. El cual otorga diversas ventajas para que en un futuro el dispositivo se pueda implementar para realizar análisis cuantitativos de secreción de proteínas en células individuales. Nuestro propósito es mejorar la comprensión de las variaciones funcionales de las células y por tanto de la génesis de la heterogeneidad de una población celular.

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo General

Fabricar un dispositivo microfluídico con trampas hidrodinámicas capaz de capturar células y microperlas de forma individual, con la finalidad de poder ser usado en un futuro para medir la secreción de proteínas en células individuales.

2.2 Objetivos específicos

1. Diseño de un microdispositivo para capturar células y perlas individuales, usando trampas hidrodinámicas,
2. Fabricación del dispositivo usando técnicas de fotolitografía multicapa y de litografía suave
3. Caracterización del dispositivo, para encontrar los parámetros adecuados para operar el sistema.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Funcionamiento de las trampas hidrodinámicas.

En este trabajo se implementaron trampas hidrodinámicas en un dispositivo microfluídico para manipular las trayectorias de células y perlas con el fin de lograr inmovilizarlas en sitios específicos. El sistema consiste en tres canales paralelos, en el canal central se localizan trampas a lo largo de sus bordes laterales. Estas trampas están unidas a los canales laterales por medio de canales de conexión, los cuales son más estrechos y de menor altura (Figura 3.1), con el fin de permitir el paso del flujo a los canales laterales, pero evitar que las células y las perlas los atreviesen.

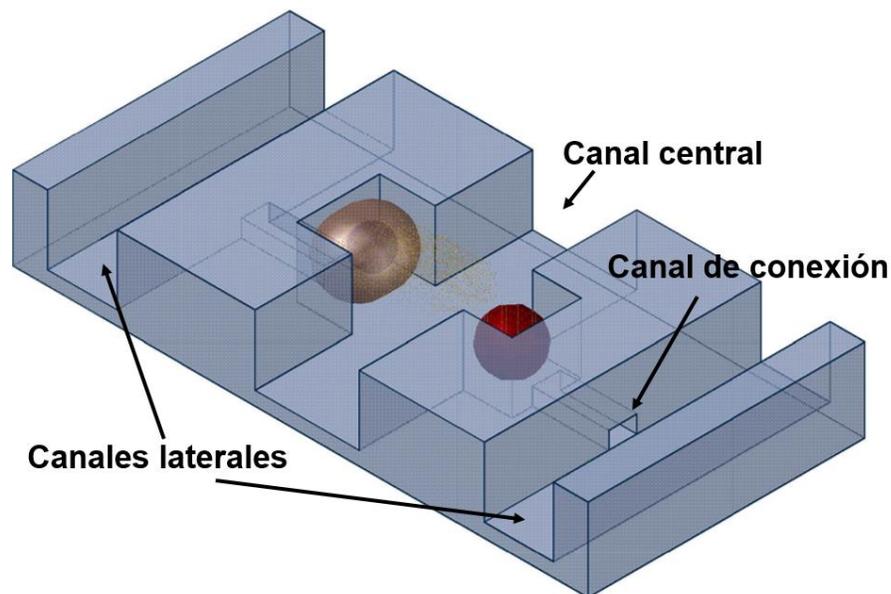


Figura 3.1. Esquema en 3D del sistema, tres canales paralelos, el canal central tiene trampas en ambos bordes para captura de células y perlas, las trampas están unidas a los canales laterales por medio de canales de conexión más estrechos y de menor altura

Si al canal central se le inyecta un fluido por la entrada izquierda, y las entradas y salidas de los canales laterales permanecen cerradas (Figura 3.2a), la trayectoria de flujo sería de izquierda a derecha. En cambio, si se abre la salida de un canal lateral, el flujo también se direcciona hacia ese canal lateral. Si después se introduce una suspensión celular por el canal central, la trayectoria de las células será hacia la salida del canal central y hacia las trampas (Figura 3.2b). Cuando una célula ocupe una trampa, ésta ocluye el canal de conexión evitando el paso del flujo, por lo tanto, ya no se direccionan más células hacia esa trampa. Sucede lo mismo si se introduce una suspensión de perlas, pero en esta ocasión abriendo la salida del canal lateral restante (Figura 3.2c).

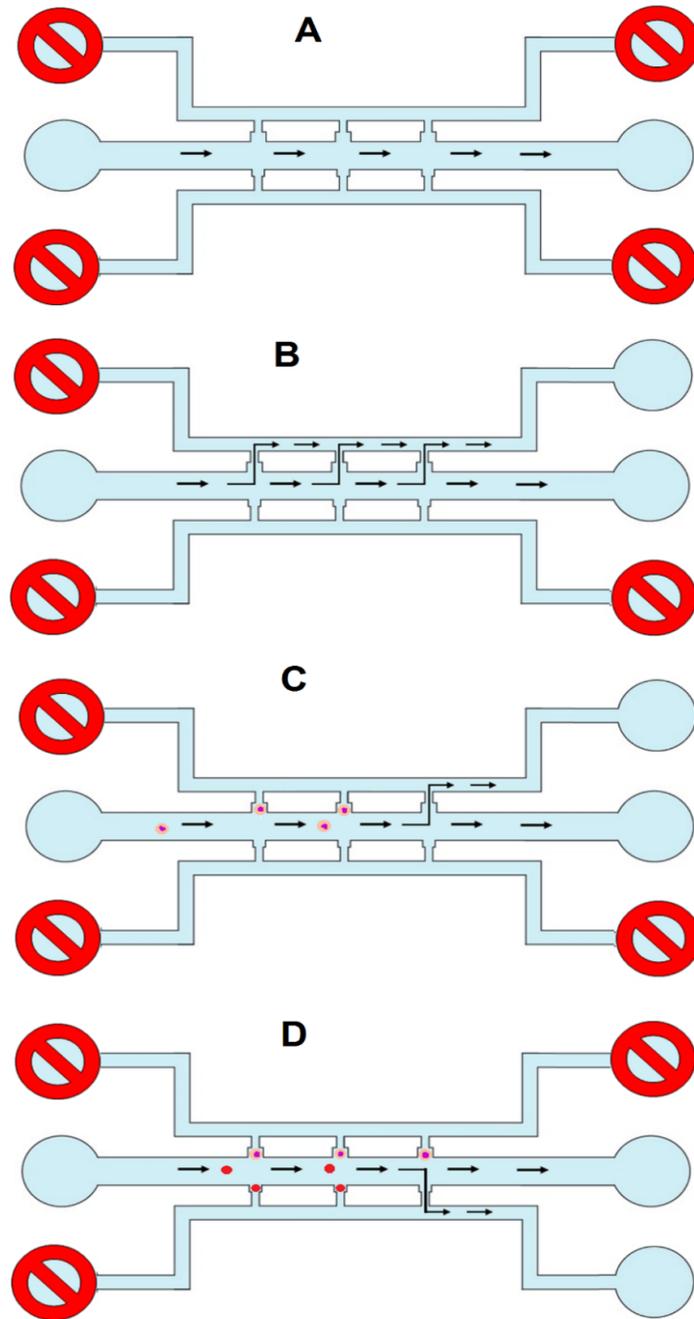
La ley de Hagen-Poiseuille describe el principio del funcionamiento del sistema, la ecuación simplificada se expresa como:

$$Q = \frac{\Delta P}{R_H}$$

Donde, Q es el flujo volumétrico, R_H es la resistencia hidráulica del canal y ΔP es la diferencia de presión en el canal. Al cerrar la salida y entrada de un canal lateral, su resistencia hidráulica se vuelve infinita:

$$Q = \frac{\Delta P}{\infty} = 0$$

por lo tanto, el flujo volumétrico es 0 o nulo en ese canal. Esto genera que las líneas de flujo no se dirijan hacia ese canal y así solo se inmovilizan las perlas o las células en un solo borde del canal.



3.2 Esquema del funcionamiento de las trampas. A) Canales laterales cerrados, el flujo solo va de izquierda a derecha, B) Canal lateral superior derecho abierto, el flujo también se dirige hacia ese canal. C) Se introduce la suspensión de células y estas se capturan en las trampas. D) Se cierra el canal lateral y se abre el canal opuesto para la captura de perlas.

3.2 Simulación del sistema.

Se realizó un análisis de elemento finito en COMSOL Multiphysics 5.2. El funcionamiento de las trampas hidrodinámicas se simuló usando un modelo 2D, el cual se diseñó en el software Autodesk AutoCAD 2014 y se guardó con extensión .DXF para después ser importado a COMSOL. Se empleó el módulo de flujo laminar para simular el sistema, el cual aplica las ecuaciones de Navier-Stokes para fluidos incompresibles y se asumieron condiciones de no deslizamiento por las paredes. Los parámetros establecidos en el software fueron: la viscosidad y densidad del agua ($0,890 \times 10^{-3}$ Ns/m² y 1.000 kg/m³), la presión de entrada del agua se fijó a 0.5 psi y la presión de salida a 0 psi.

El sistema simulado consiste en tres canales paralelos, donde el canal central posee dos trampas en cada borde lateral y las trampas están conectadas a los canales laterales por medio de canales estrechos. Las trampas de un borde lateral corresponden para las células, mientras que las trampas del lado restante son para las perlas. En el programa se indicó que la entrada y salida del canal central permanecerían abiertas, y para los canales laterales se simularon los siguientes tres casos:

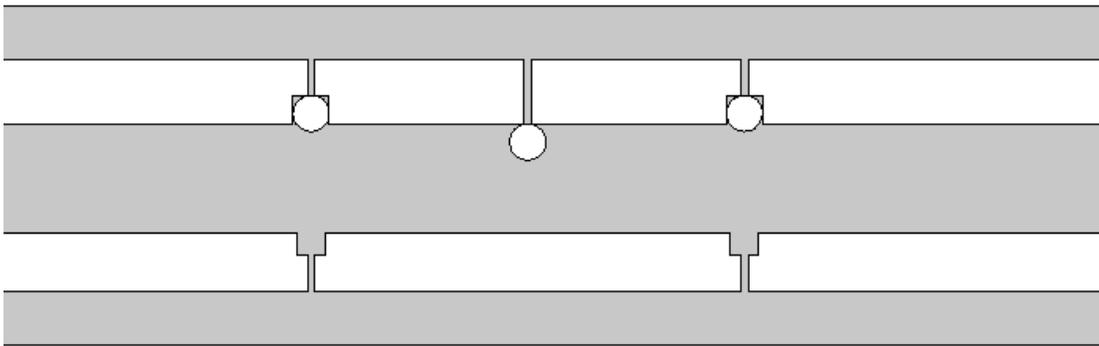
- 1) Entradas y salidas cerradas en los canales laterales.
- 2) Salida abierta del canal lateral conectado a las trampas para células.
- 3) Salida abierta del canal lateral conectado a las trampas para perlas.

También se realizó una simulación del estrés de corte; para esto al diseño se le agregó tres círculos con diámetro de 10 μ m para representar a las células. Dos de los círculos están localizados en las trampas y el otro está en el borde del canal, con el fin de determinar el estrés ejercido sobre las células en dos diferentes situaciones (Figura 3.3). Para simular el estrés de corte se realizó un post procesamiento de los resultados del campo de velocidad,

después se programó en el software la ecuación del estrés de corte y se generó una gráfica 2D. La ecuación usada fue:

$$\tau = \gamma * \mu$$

Donde τ es el estrés de corte, γ es la velocidad de corte (*shear rate*) que es la diferencia de velocidades con respecto a la diferencia de alturas, y μ es la viscosidad, cabe destacar que esta fórmula solo aplica para fluidos newtonianos.



3.3 Diseño realizado para las simulaciones de estrés de corte, se incluyeron tres círculos que representan las células en dos casos diferentes.

3.3 Diseño de los dispositivos.

Los diseños de los dispositivos se realizaron en el software Autodesk AutoCAD 2014, los cuales se guardaron con extensión .DXF y se convirtieron a .GDS usando KLayout 0.23.10 con el propósito de que los diseños sean compatibles con el equipo usado para fabricar los moldes.

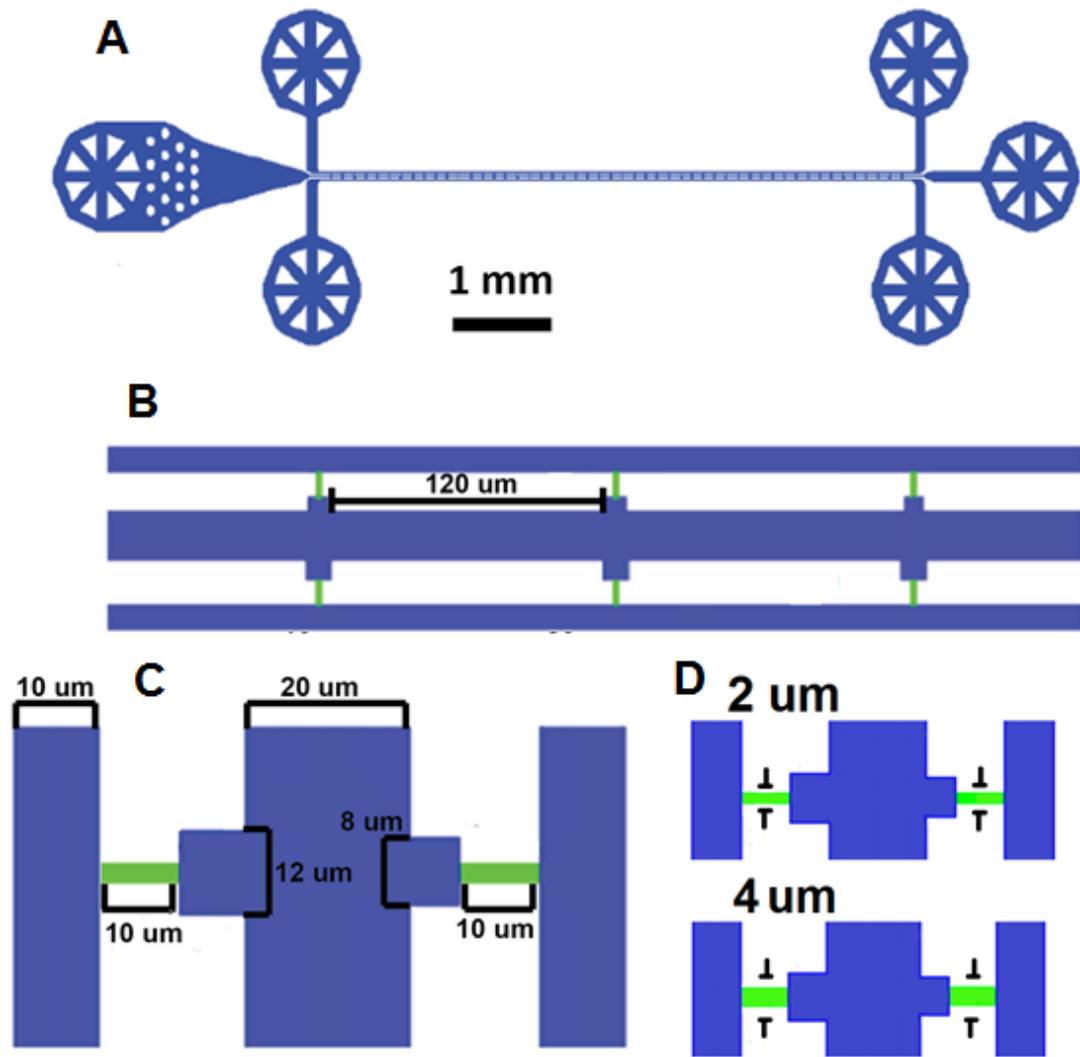
3.3.1 Diseño del dispositivo de trampas.

El objetivo de este dispositivo es caracterizar las dimensiones ideales de las estructuras que forman las trampas hidrodinámicas, con el fin de obtener la mayor eficiencia de captura de células y perlas. Por ende, se realizaron dos diseños con las mismas estructuras, pero de diferentes dimensiones.

Los dos diseños están formados por tres canales en paralelo separados por $10\ \mu\text{m}$, el canal central tiene un ancho de $20\ \mu\text{m}$ y los canales laterales de $10\ \mu\text{m}$. A lo largo del canal central se encuentran 100 trampas con geometría rectangular, éstas se distribuyeron en 50 trampas por cada lado del canal con una separación de $120\ \mu\text{m}$ (Figura 3.4). Las trampas destinadas para las células miden $10\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$ y las medidas de las trampas para las perlas son $8\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$.

También se caracterizaron las dimensiones de los canales estrechos, por lo tanto, se realizaron dos diseños con diferentes anchos, uno de $2\ \mu\text{m}$ y el otro de $4\ \mu\text{m}$.

El dispositivo cuenta con un filtro para evitar la entrada de aglomeraciones de perlas y células. El filtro tiene estructuras circulares que fungirán como restricciones para evitar el paso de partículas mayores de $50\ \mu\text{m}$, con el fin de evitar ocluir el canal.



3.4. Diseño realizado con sus respectivas medidas, A) Diseño completo del dispositivo, B) los tres canales paralelos con trampas separadas por 120 μm , C) Ancho de los canales paralelos, largo de los canales de conexión y ancho de las trampas, D) los dos diseños realizados, con canales de conexión de diferente ancho.

3.4 Fabricación de dispositivos.

Para la fabricación de los moldes se empleó la técnica de fotolitografía y se usó el equipo micro-generador de patrones. El proceso de fabricación se realizó dentro de un cuarto limpio para lograr tener un bajo nivel de contaminación por partículas dentro de los dispositivos.

Los moldes se realizaron sobre una oblea de silicio de 10 cm de diámetro (Desert Silicon Inc. Tempe, AZ, USA), a las obleas se les da un tratamiento con plasma de oxígeno por 10 minutos usando un *Plasma cleaner* (Zepto, Diener Electronic). Este tratamiento se realiza con el fin de limpiar la superficie del material por medio de bombardeo con iones, donde la luz ultravioleta generada en el plasma rompe y levanta la mayoría de los adhesivos orgánicos y los contaminantes superficiales, que son después extraídos mediante un sistema de vacío. Al terminar el tratamiento, la oblea se coloca inmediatamente sobre un *spin coater* (SCS 6800 Spin Coater Series, Specialty Spin Coater Systems). Al equipo se le programa un protocolo, el cual puede consistir en varios pasos, donde a cada paso se le introducen tres parámetros, la velocidad de giro en revoluciones por minuto (rpm), el tiempo de duración y la rampa (es decir el tiempo que toma en alcanzar la velocidad programada). Los parámetros y pasos dependen de la foto-resina y de la altura que se desea alcanzar.

3.4.1 Fabricación del molde.

Para la capa de flujo se usaron tres capas de foto-resina para fabricar el molde, esto con la finalidad de obtener tres diferentes alturas en un mismo molde. La primera capa es para realizar las marcas de alineación, la segunda para los canales de conexión y la tercera para el resto de las estructuras (canales paralelos, filtro, entradas y salidas).

Para la fabricación las marcas de alineación, se siguió el protocolo establecido para obtener estructuras con altura de 22 μm . Primero, a la oblea se le realiza un tratamiento con plasma de oxígenos por 10 minutos, posteriormente se colocó en el *spin coater* y se vierte la resina GM1060 (Gersteltec Sarl, Pully, Lausanne, Switzerland). Al equipo se le programan los siguientes parámetros de para obtener una altura de 22 μm :

Paso 1.

Rampa: 10 segundos,

Duración: 40 segundos,

Velocidad: 1000 rpm.

Paso 2.

Rampa: 10 segundos,

Duración: 0 segundos,

Velocidad: 0 rpm.

La oblea se deja en relajación por una hora. Y después se realiza un proceso llamado *pre-cocido*, el cual sirve para evaporar solventes. El proceso es el siguiente:

- i) Se coloca sobre una plancha (PC-420D, Corning) a 50 °C y se aumenta 5°C cada 2 minutos hasta llegar a 65°C.
- ii) Se mantiene a 65°C durante 10 min.
- iii) Se aumenta la temperatura a 70 °C y cada 2 minutos se aumenta 5°C hasta llegar a 95°C.
- iv) Se mantiene a 95°C durante 30 min.

Una vez realizado el *pre-cocido*, el siguiente paso es la exposición de la foto-resina a luz UV. Se usó el equipo *micro pattern generator* (μPG 101, Heidelberg), el cual tiene un láser con una longitud de onda de 377 nm, con

este equipo se puede alcanzar una resolución de 0.9 μm . El μPG está conectado a una computadora con su propio software, en él se carga el diseño del dispositivo con extensión .GDS. El láser incide sobre la foto-resina trazando el diseño, al incidir la luz UV sobre la resina se empieza con el proceso de polimerización. El μPG permite elegir la cantidad de energía (10 a 70 mW) y el porcentaje de energía (5 a 100%). Los parámetros usados para la exposición de las tres capas del molde son de 70mW al 100%.

Al terminar la exposición, se realiza con un proceso llamado post-cocido, para llevarlo a cabo se siguen los mismos pasos que en el pre-cocido. La finalidad de este proceso es aumentar la adhesión, permitir la rápida polimerización e incrementar la resistencia a solventes.

El siguiente paso es revelar los moldes. Para las foto-resinas negativas se utiliza PGMEA (Propylene glycol monomethyl ether acetate, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) como agente revelador. Se sumerge la oblea en PGMEA hasta que la foto-resina no expuesta se disuelva y las estructuras polimerizadas se distingan. Se enjuaga con alcohol isopropílico (IPA) (Isopropyl alcohol, SigmaAldrich Co., St. Louis, MO, USA) para detener la reacción y se revisa con un estereomicroscopio (Stemi DV4, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Turingia, Germany) para asegura que no queden restos de resina. Este proceso es igual para las tres capas de resina, si es necesario, se repite en las capas de mayor altura hasta que las estructuras estén completamente reveladas.

El último paso es aumentar la resistencia mecánica y química de las estructuras, para esto se realiza un proceso llamado *hard-bake*, el cual consiste en calentar el molde por dos horas a 135°C, cabe destacar que el *hard-bake* es igual para las tres capas de resina.

Después de terminar las marcas de alineación se prosigue con la fabricación de los canales de conexión. Al molde con las marcas se le da un tratamiento de 10 minutos con plasma de oxígeno. A continuación, se recubre

con la foto-resina SU-8 2002, la cual permite fabricar estructuras con alturas de 2 a 3 μm . Para obtener canales de 3 μm de altura, al *spin coater* se le programan los siguientes parámetros:

Paso 1.

Rampa: 5 segundos

Duración: 5 segundos

Velocidad: 500 rpm

Paso 2.

Rampa: 1.6 segundos

Duración: 35 segundos

Velocidad: 1000 rpm

Paso 3.

Rampa: 1.6 segundos

Duración: 0 segundos

Velocidad: 0 rpm

Después, se deja relajar la foto-resina por una hora para que esta quede uniforme y lisa. Transcurrido el tiempo, se realiza el pre-cocido de la siguiente manera:

- i) Se calienta a 55°C por un minuto.
- ii) Se aumenta a 65°C y así se mantiene por 5 min.
- iii) Se aumenta la temperatura 10 °C cada minuto hasta llegar a 95°C.
- iv) Se mantiene a 95°C durante 10 min.

El molde se enfría a temperatura ambiente para después exponer la foto-resina a la luz UV en la maquina uPG, a la cual se le ajustan los

parámetros como centro, ángulo de rotación y energía. El centro y al ángulo de rotación se establecen usando las marcas de alineación fabricadas, la energía necesaria para fabricar las estructuras es de 70mW al 100%. Posterior a la exposición, la foto-resina es sometida al post-cocido, que consiste en calentar la oblea de la misma forma que en el pre-cocido. Por último, se revela y se realiza el hardbake.

Después de fabricar las marcas de alineación y los canales de conexión, el molde se recubre con una tercera capa de foto-resina GM1060 para realizar las estructuras faltantes. Debido a que las estructuras son de la misma altura que las marcas de alineación, el proceso de fabricación es igual al usado en la primera capa.

Una vez que se ha obtenido el molde, el siguiente paso es colocarlo dentro de un contenedor cerrado para realizarle un tratamiento de 30 minutos con clorotrimetilsilano (Chlorotrimethylsilane, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). En el contenedor se vierten 300 μ L de clorotrimetilsilano que, al evaporarse, las moléculas se adhieren a la superficie de la oblea y éstas eviten la unión del PDMS a las estructuras, logrando desprender los dispositivos sin dañar al molde. En la figura 3.5 se esquematiza todo el proceso de fabricación.

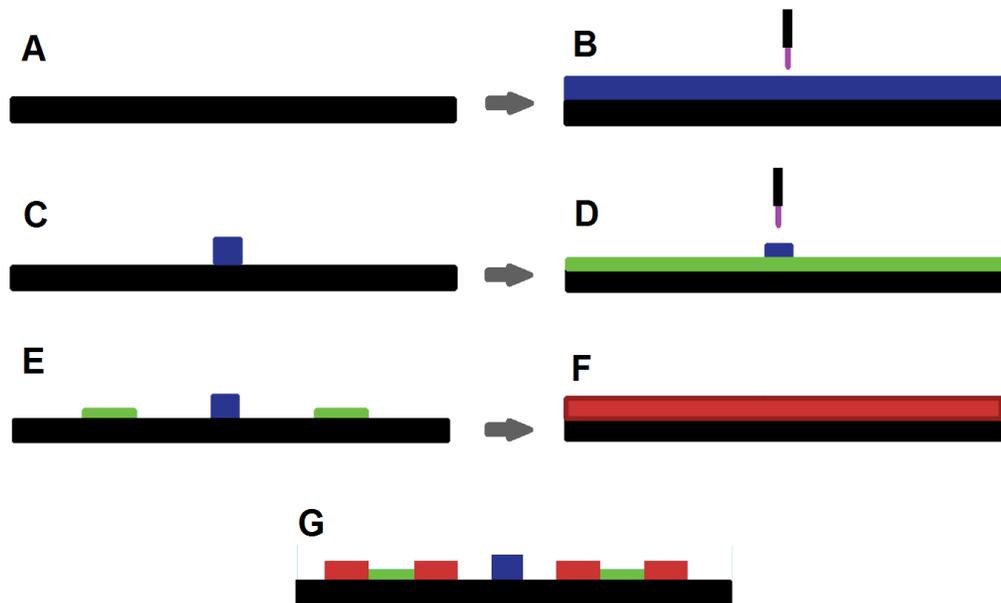


Figura 3.5. Proceso de fabricación del molde resumido. A) Oblea de silicio virgen. B) Se recubre con una foto-resina para obtener una altura de 22 μm y se expone a la luz UV. C) Se revela el molde y se tienen las marcas de alineación. D) Se recubre con una foto-resina para tener una altura de 3 μm y se expone a la luz UV. E) Se revela y se obtiene los canales de conexión y las marcas. F) Se recubre con la última capa de resina y se expone a la luz UV. D) Se revela y se tienen los canales paralelos con altura de 22 μm .

3.4.2 Fabricación de dispositivos de PDMS.

Después de obtener los moldes, el siguiente paso es la obtención de réplicas del dispositivo como se ilustra en la figura 3.6. Las réplicas se realizan con un polímero llamado PDMS (polidimetil siloxano), el cual se obtuvo de un kit que consiste del pre-polímero y el catalizador o agente curador (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA). Para la fabricación de los dispositivos se usa una proporción 10:1.

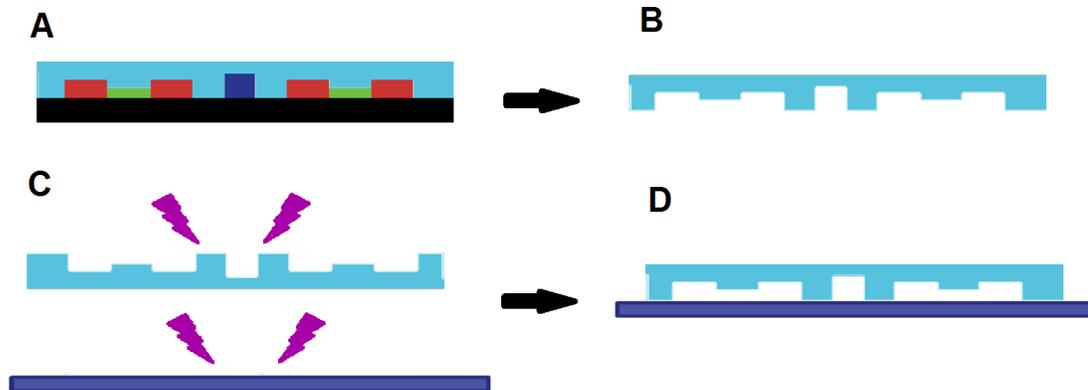


Figura 3.6 Proceso de fabricación de dispositivos de PDMS. A) Se recubre el molde con una mezcla de pre-polímero y agente curador. B) Se deja polimerizar en el horno y después se desprende con cuidado del molde. C) Se da un tratamiento con plasma de oxígeno. D) se juntan las superficies para pegar el dispositivo en el portaobjetos,

La fabricación de las réplicas de PDMS consiste en los siguientes pasos:

1. Se coloca el molde en una caja Petri
2. Se prepara la mezcla de pre-polímero y catalizador. Se pesan 40 gr de PDMS y 4 gr de agente curados y se mezclan usando una centrifuga planetaria (AR-100, Thinky USA Inc., Laguna Hills, CA, USA).
3. Se vierte la mezcla sobre el molde y se degasifica colocándolo en una cámara de vacío por 10 minutos.
4. Se introduce al horno (UF55, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany) por una hora a 80°C para que se polimerice el PDMS.
5. Se desprende el PDMS del molde, se recortan los dispositivos y se realizan las perforaciones de las entradas y salidas usando una prensa (MP10-UNV, SCHMIDT Technology Corporation, Cranberry Twp., PA, USA).

Una vez que se tiene los dispositivos de PDMS, se realiza el sellado. El proceso consiste en introducir el dispositivo y un portaobjetos al *plasma cleaner* para dar un tratamiento a las superficies con plasma de oxigeno por

90 segundos. Después de terminar, inmediatamente se ponen en contacto la superficie de los canales con el portaobjetos. Cabe mencionar que el sellado es químicamente irreversible, ya que el plasma de oxígeno forma grupos de silano (Si-OH) en la superficie del PDMS y grupos hidroxilos (-OH) en el vidrio. Al poner en contacto las superficies los grupos polares generan un enlace covalente -O-Si-O provocando la unión irreversible [77].

3.5 Metodología de los experimentos.

Para caracterizar el dispositivo se usaron perlas de poliestireno de 6 μm de diámetro (Polybead Carboxylate Red Dyed Microspheres 6.00 μm) y monocitos de la línea celular THP-1 adquiridos del laboratorio de la Dra. Gertrud Lund (Cinvestav, Irapuato) y del Dr. Vianney Ortiz Navarrete (Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav)

3.5.1 Cultivo celular.

Las células THP-1 se crecieron en medio RPMI 1614 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA) suplementado con 4.5 mg/mL de glucosa (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 2mM de Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA), 10mM de HEPES (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA), 1mM de Piruvato de sodio (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA), 50 μm /mL de penicilina-estreptomina (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA) y 10% de suero fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA)

Las células se mantuvieron congeladas a -80°C en viales de 1 mL hasta su uso. El proceso para descongelar las células consiste en colocarlas en un baño maría a 37°C , después se pasaron a un tubo de 15 mL y se agregó 7 mL de medio de crecimiento. Para eliminar las células muertas y residuos celulares, la suspensión se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos,

posteriormente se decantó y el pellet se re-suspendió en 1 mL de medio. La suspensión se transfirió a una caja de cultivo T25 con 7 mL de medio de crecimiento suplementado y se incubó a 37°C a 5% CO₂. El medio se reemplazó cada 2 días durante una semana.

Los pases se realizaban de 3 a 4 días, que es cuando la suspensión alcanzaba el 80% de confluencia. Con una pipeta serológica, las células fueron re-suspendidas en el medio de la caja de cultivo, enseguida se tomó 1 mL de la suspensión celular y se transfirieron a una caja de cultivo con 7 mL de medio de crecimiento fresco. El resto de las células se tiñeron con el marcador de viabilidad Fluorescein diacetato (FDA) para usarlas en los experimentos.

3.5.3 Experimentos en dispositivo con trampas.

Para introducir las soluciones a los dispositivos, se usó un compresor de aire (Sprayit SP94002) conectado a un tablero de control, el cual incluye reguladores para controlar la presión, manómetros para visualizar la presión inyectada y válvulas externas para cerrar y abrir la entrada de aire. Las válvulas se conectan a las entradas de los dispositivos por medio de tubos Tygon, que contienen las soluciones (Figura 3.7).

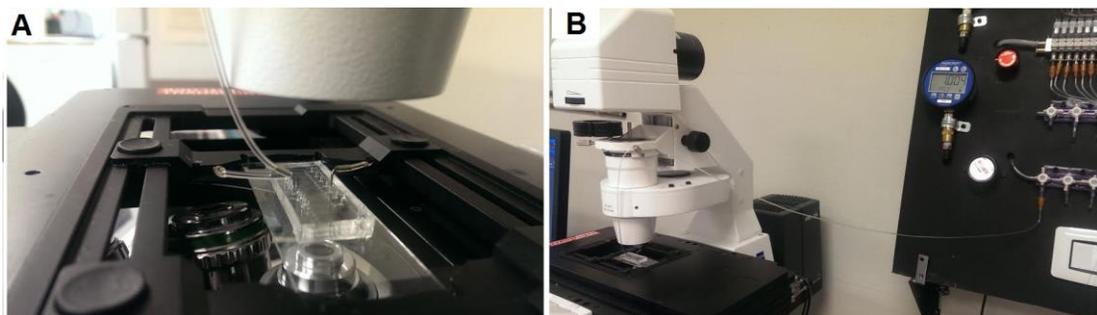


Figura 3.7 Fotografías del diseño experimental. A) Se muestra el dispositivo sobre el microscopio, con una manguera conectada a la entrada de un canal central y dos tapones cerrando las salidas de un canal lateral. B) Se muestra el microscopio, el tablero de control y un dispositivo conectado.

Los canales del dispositivo se llenaron con Plurónico al 2% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) para bloquear la superficie y evitar la adhesión de las microperlas. Para llenar todos los canales, la solución se inyectó por la entrada del canal central a 3 psi por 5 minutos, en seguida se lavó con buffer de fosfato 1x (PBS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) por 5 minutos a 3 psi.

Para los experimentos con perlas, a los dispositivos no se les perforó la entrada y salida del canal lateral conectado a las trampas para las células. La suspensión de perlas se diluyó en Plurónico al 2% para obtener a una concentración de 1×10^6 perlas/mL. Las perlas fueron agitadas por un minuto para separarlas y evitar aglomeraciones, inmediatamente después se inyectaron al dispositivo por la entrada del canal central. A los dispositivos usados para los experimentos con células no se les perforó la entrada y salida del canal lateral que está conectado a las trampas para las perlas. Por la entrada del canal central, se inyectó la suspensión celular a 1×10^6 células/mL. Para los experimentos con perlas y células, se usaron dispositivos con todas las entradas y salidas perforadas. Se usaron tapones para cerrar la salida y entrada del canal lateral conectado a las trampas para células, después se inyectó la suspensión de perlas por la salida del canal central, en seguida se lavó con PBS-1X por 3 minutos. Una vez que se atraparon las perlas, se abrió la entrada y salida del canal opuesto y se inyectó la suspensión celular.

Las imágenes de los experimentos se obtuvieron con un microscopio invertido de epifluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH), Con el software del microscopio se crea un mosaico para tomar la imagen completa de dispositivo, además se generó un *time-lapse* para tomar micrografías cada minuto durante 15 minutos. Las imágenes se tomaron en campo claro y para las imágenes de fluorescencia, se usó un filtro (Filter set 38 HE, Carl Zeiss) para observar la fluorescencia del marcador de viabilidad celular.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Simulaciones.

Para comprobar el funcionamiento del dispositivo microfluídico, se simuló el flujo en un sistema más sencillo, pero con las mismas características que las trampas implementadas en este trabajo. El diseño simulado consta de tres canales paralelos conectados por medio de canales estrechos, los cuales están localizados junto a las trampas, el diseño solo cuenta con 2 trampas en cada borde del canal central. Se simularon tres casos diferentes, los cuales corresponden a la forma de operación del dispositivo para la captura de células y perlas.

En el primero caso la pared izquierda y derecha del canal central se establecieron como entrada y salida respectivamente, mientras que las demás paredes se mantuvieron cerradas. En la figura 4.1a se muestra el campo de velocidades del flujo, se puede observar que la velocidad en el canal central es mayor que en los canales laterales, los cuales presentan una velocidad cercana al 0.

En el segundo y tercer caso, se estableció la entrada y salida del canal central como en la primera simulación, pero además en la segunda simulación se agregó la salida del canal lateral superior, simulando la captura de células. Para la tercera simulación se realizó lo mismo, pero ahora se indicó la salida del canal lateral inferior, lo que corresponde para la captura de perlas. Como podemos observar de las simulaciones, al abrir la salida de un canal lateral, en efecto se establece un flujo hacia este y en el canal lateral opuesto el flujo es mínimo, por lo tanto el sistema permite la manipulación de flujo hacia las direcciones deseadas. También se puede observar que en las trampas conectadas a los canales laterales cerrados, tienen la velocidad del flujo cercana al cero. Por lo tanto las simulaciones sugieren que el flujo no va mover

a las perlas y las células capturadas, ya que la velocidad será muy lenta, eso se comprueba experimentalmente en las siguientes secciones.

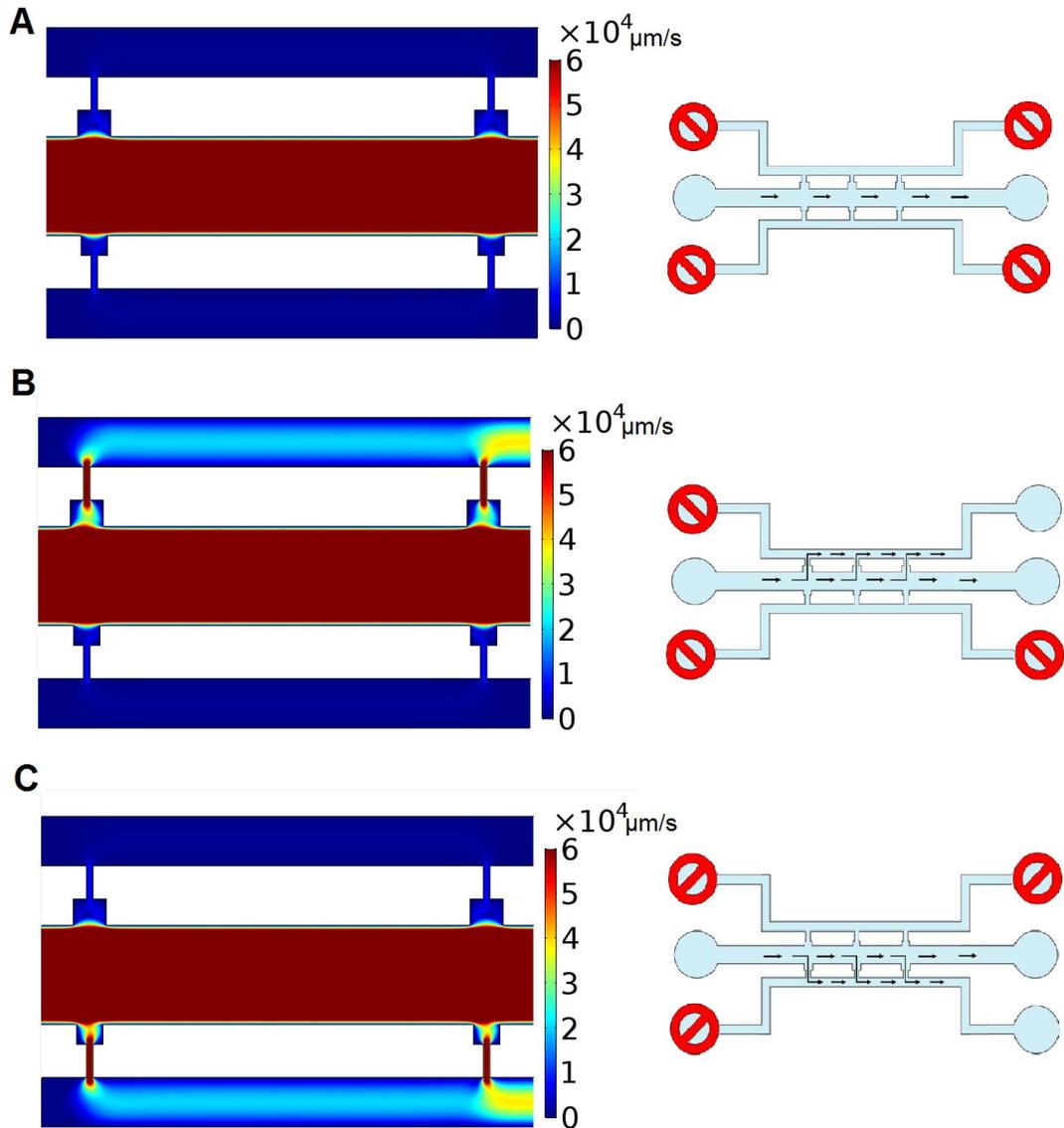


Figura 4.1 Simulaciones de las tres posibles formas de operar el dispositivo, escala en micrómetros por segundo. A) Todas las salidas de los canales laterales están cerradas. B) La salida del canal lateral superior es abierta. C) La salida el canal lateral inferior es abierta.

La forma de las trampas donde se inmovilizan las células y las perlas ayuda a que no se salgan de la trampa, ya que las paredes de las trampas evitan que el flujo las mueva y como se observó en las simulaciones anteriores el flujo dentro de la trampa es cercano al cero. Además de lo mencionado, la forma de las trampas también protege a las células de no sufrir un estrés de corte grande. Se puede visualizar en la figura 4.2 la simulación del estrés de corte sobre tres círculos que representan las células. Los círculos dentro de las trampas sufren una presión no mayor de 250 Pa y solo sobre un área muy reducida de la célula. En contraste, la célula que se encuentre en el borde de la pared y no dentro de una trampa está sujeta a un mayor estrés de corte (450 Pa) y abarca una sección más grande de la célula.

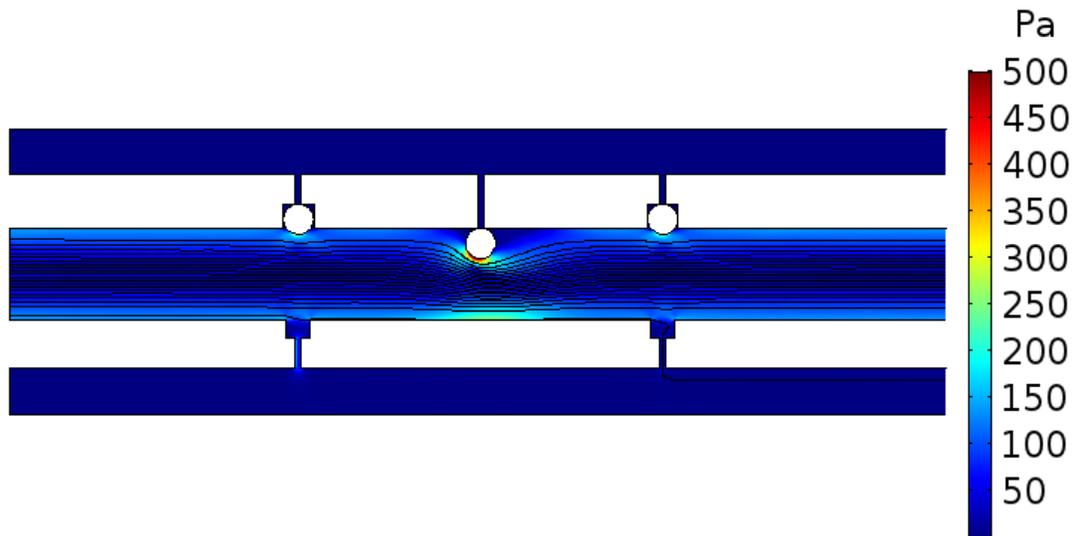


Figura 4.2 Simulación del estrés de corte sobre tres círculos que representan las células, el círculo que no está dentro de la trampa sufre mayor estrés de corte. La escala se encuentra en Pascales.

4.2 Medidas del dispositivo.

Después de fabricar las primeras réplicas de PDMS, se tomaron mosaicos del dispositivo completo para visualizar que no hubiera defectos de fabricación (figura 4.3a). También se tomaron las medidas de las estructuras

para revisar que sean las adecuadas para el correcto funcionamiento del dispositivo.

Para medir la altura de los canales se realizó un corte transversal en diferentes secciones del dispositivo. En la figura 4.3b se muestra la altura de los tres canales paralelos, denotando que el resultado fue el esperado, ya que se usó el protocolo para obtener alturas de 22 μm . Por otra parte, para conocer la altura de los canales de conexión, se realizó un corte sobre una marca de alineación fabricada en la misma capa, esto debido a que es complejo realizar cortes sobre estructuras con dimensiones pequeñas. La altura obtenida se muestra en la figura 4.3c, la cual es la adecuada para evitar el paso de células y perlas a los canales laterales.

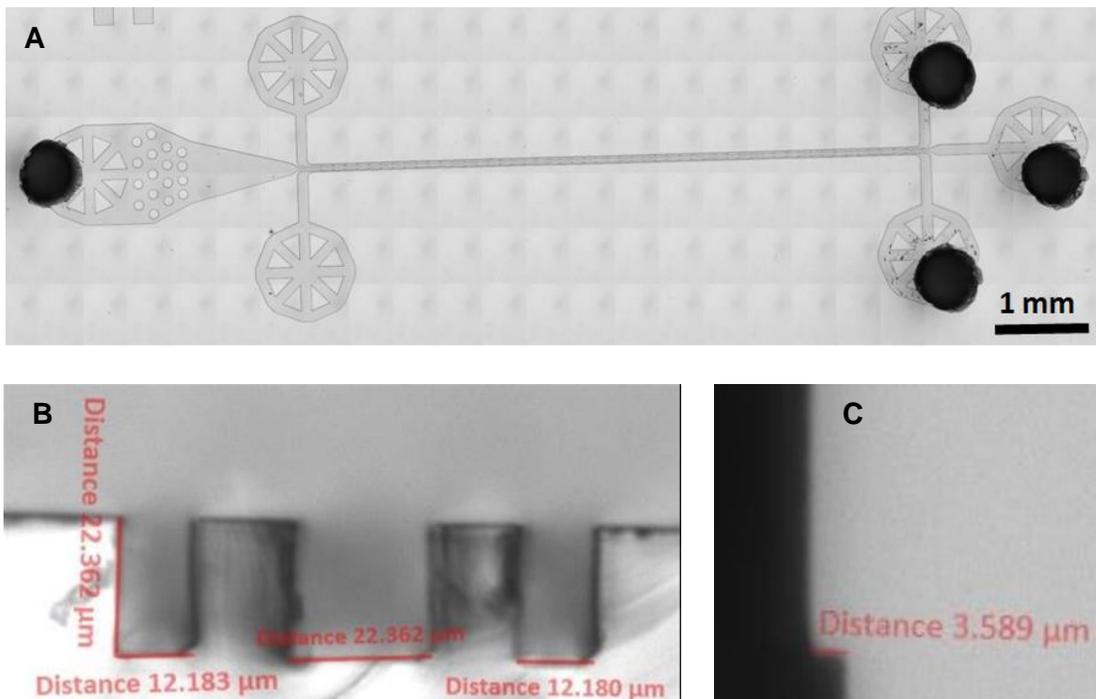
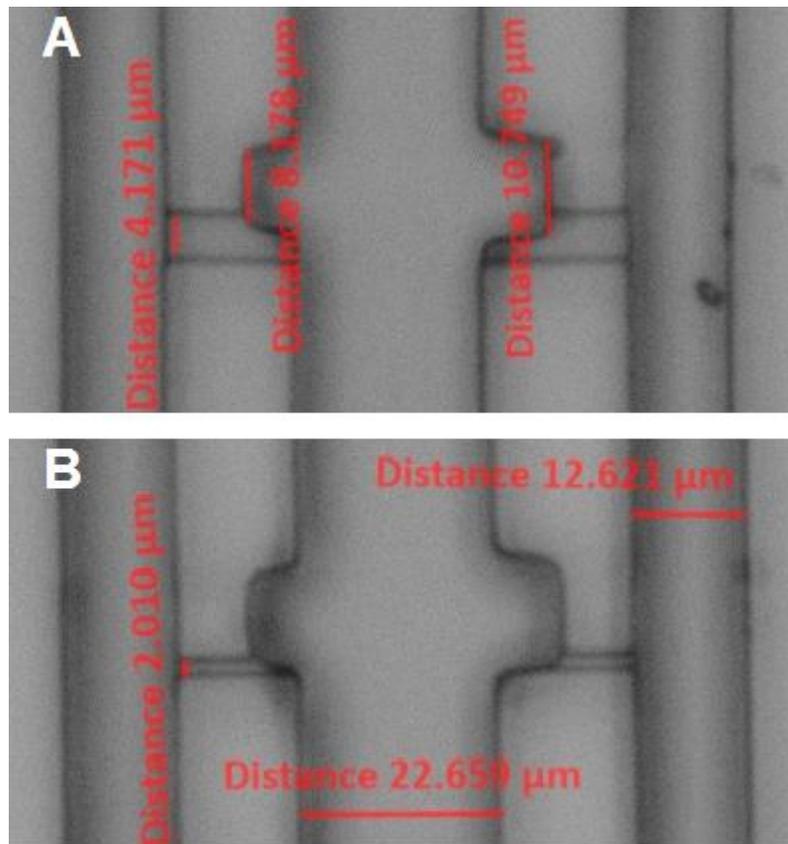


Figura 4.3 Micrografías del dispositivo, A) Mosaico completo del dispositivo. B) Corte transversal de los canales paralelos. C) Corte de una marca para medir la altura de los canales de conexión.

En la figura 4.4 se muestran las dimensiones de las trampas, así como el ancho de los canales paralelos y canales de conexión. Se obtuvo que el

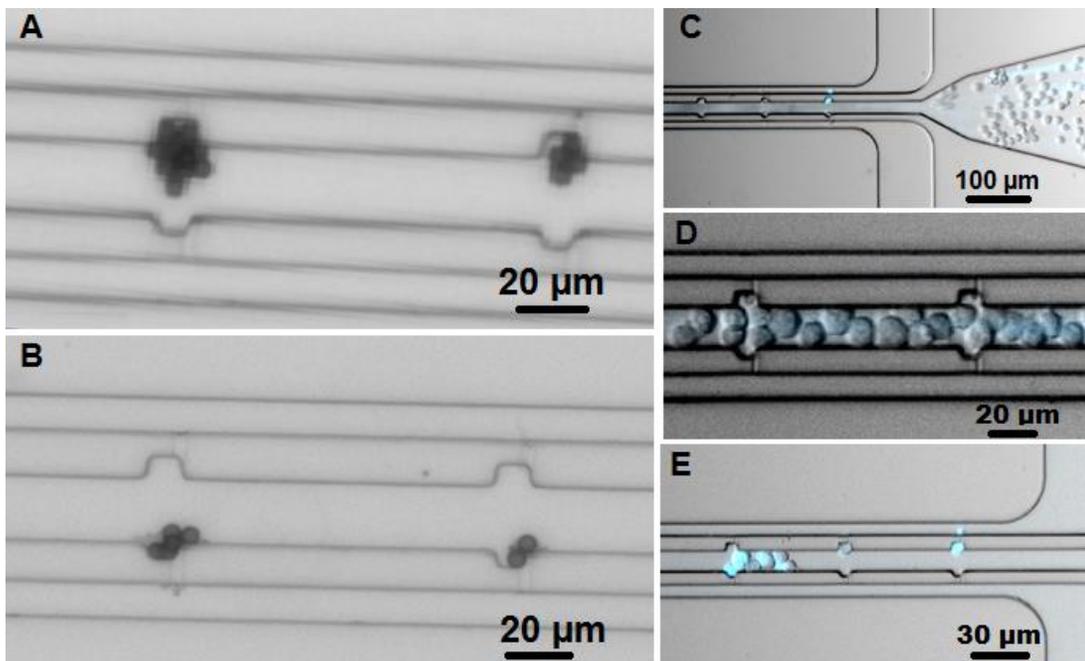
ancho de los canales paralelos fue $2\ \mu\text{m}$ más grande que el diseñado, sin embargo esta diferencia no afectó el funcionamiento del sistema. También se muestra las medidas de los anchos de los canales de conexión, las dimensiones resultaron acorde al diseño. Chen *et al* [78] implementó trampas hidrodinámicas para la captura de células de diámetro grande y caracterizó las dimensiones ideales de las trampas. En nuestro trabajo se adaptaron las dimensiones de los canales al tamaño de las células y perlas; sin embargo, un parámetro importante que se decidió caracterizar fue el ancho del canal de conexión, con la finalidad de evitar que células o perlas pudiesen atravesarlo.



4.4 Micrografías con las medidas obtenidas de las trampas, ancho de los canales paralelos. A) Dispositivo con canales de conexión de $4\ \mu\text{m}$ de ancho, B) Dispositivo con canales de conexión de $2\ \mu\text{m}$.

4.3 Optimización de concentraciones.

El primer parámetro a caracterizar fue la concentración de la suspensión de células y perlas que se introdujeron al dispositivo. La primera concentración usada fue de un 1×10^6 células/mL, sin embargo, se ocluyó el canal debido al gran número de células (Figura 4.5) y al reducido tamaño del canal. Por lo tanto, se disminuyó la concentración a 0.5×10^6 células /mL, que fue la concentración usada para los experimentos, debido a que ésta permitió el flujo de las células sin obstruir el canal. La suspensión de perlas también se fijó a 5×10^5 perlas/mL en los siguientes experimentos, ya que concentraciones mayores ocluían el canal. Además, el exceso de perlas generaba cúmulos que provocaban la captura de más de un perla por trampa.



4.6. Micrografías de la entrada de suspensiones con alta concentración, A) Captura de aglomeraciones de perlas por alta concentración, B) Aglomeraciones de perlas capturadas, C) Entrada de la células a una alta concentración, D) Canales ocluidos por exceso de células, E) Cumulo de células ocluyendo el canal.

4.4 Eficiencia de captura.

Se caracterizó la eficiencia de captura en los dos dispositivos, inyectando las suspensiones a tres diferencias de presión (0.5, 1 y 1.5 psi). Para determinar la eficiencia de captura se contó el número de trampas con células o perlas y se calculó el porcentaje de ocupación.

4.4.1 Captura de células.

Primero se caracterizó la eficiencia de captura de células en los dispositivos con canales de conexión de 2 y 4 μm de ancho. Para realizar estos experimentos no se perforó las salidas del canal lateral conectado a las trampas para perlas, con el fin de evitar flujo hacia esas trampas. En la figura 4.7 se pueden visualizar las células localizadas en las trampas de un solo lado del canal.

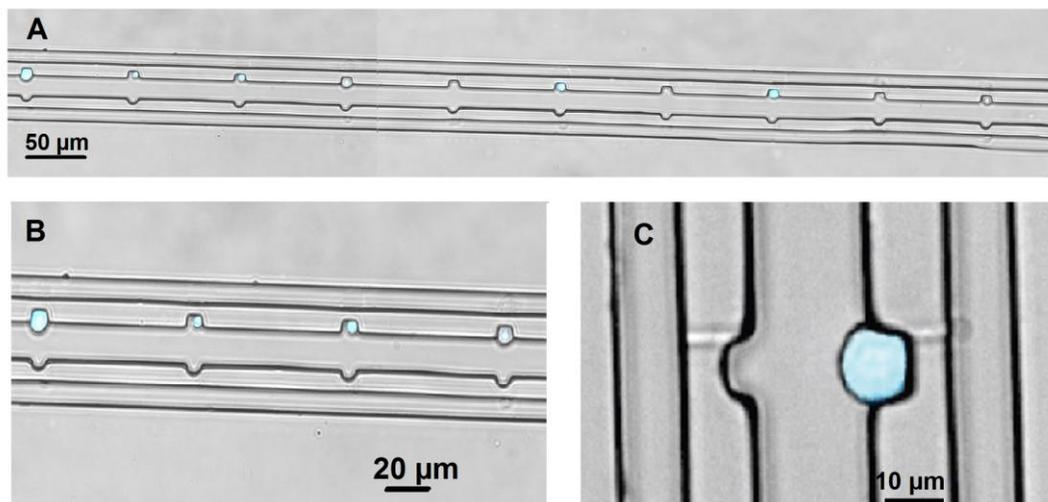


Figura 4.7 Micrográficas de las células teñidas con FDA inmovilizadas en sus trampas, A) Mosaico de 10 trampas con 8 células capturadas, B) Micrografía con células capturadas, C) Acercamiento de una trampa con una célula capturada.

Para determinar a qué diferencia de presión se obtiene la mejor eficiencia de captura, se inyectó la suspensión celular a 3 psi por la entrada y

a la salida se conectó una manguera inyectando buffer de fosfatos a 1.5, 2 y 2.5 psi con la finalidad de generar las tres distintas diferencias de presión (0.5, 1 y 1.5 psi). Además, se realizó un análisis temporal para establecer el tiempo que tarda en ocuparse el mayor número de trampas, para esto se tomaron imágenes cada minuto por un total de 15 minutos.

En la figura 4.8a se puede observar la gráfica de la eficiencia de captura en el dispositivo de 2 μm , en el cual se obtuvo el mejor resultado introduciendo la suspensión a una diferencia de presión de 1 psi, ya que se logró una eficiencia del 60% en 12 minutos. En la gráfica de la figura 4.8b se muestran los resultados obtenidos usando el dispositivo de 4 μm , de igual manera, inyectando la suspensión a una diferencia de presión de 1 psi se logró la mejor eficiencia de captura. En general, el mejor resultado fue usar una diferencia de presión de 1 psi en el dispositivo con canales de 4 μm , ya que se obtuvo una eficiencia de captura del 65% en 5 minutos.

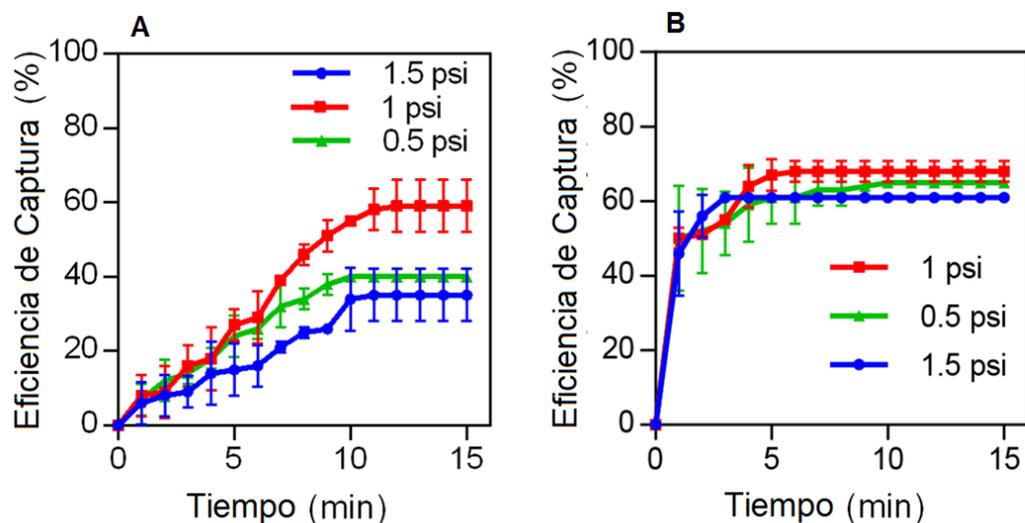


Figura 4.8. Graficas de la eficiencia de captura de células en los dos dispositivos .A) Dispositivo con canales de 2 μm de ancho .B) Dispositivo con canales de 4 μm de ancho.

4.4.2 Captura de perlas.

Se usó el mismo enfoque para evaluar la eficiencia de captura de las perlas en los dos dispositivos. En la figura 4.9 se pueden observar las perlas inmobilizadas en sus trampas correspondientes, debido a que se evitó el flujo hacia las otras trampas al no perforar las salidas del canal con el que se conectan.

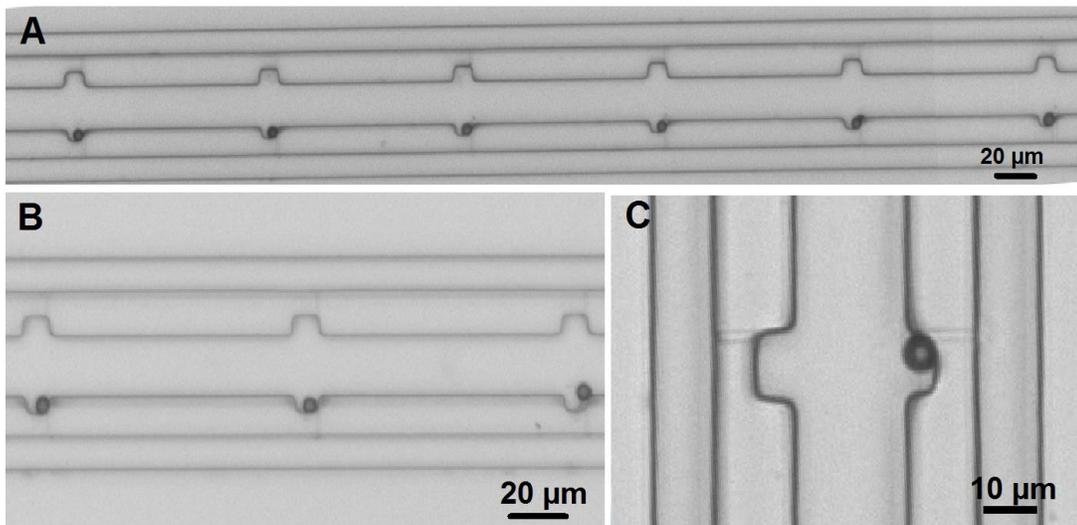


Figura 4.9. Micrografías representativas de la captura de perlas en sus trampas correspondientes. A) Mosaico con 6 trampas con perlas capturadas, B) Micrografía con tres perlas capturadas, C) Acercamiento de una trampa con una perla capturada.

Los resultados obtenidos de los experimentos de captura de perlas se muestran en la figura 4.10. De la misma manera que con las células, el dispositivo con canales de 4 μm fue el más eficiente. También los resultados sugieren que introducir las perlas a una diferencia de presión de 1 psi genera mayor eficiencia debido a que el mayor porcentaje de trampas son ocupadas (80%) en el menor tiempo (8 minutos). En la tabla 1 se resumen los mejores resultados obtenidos, mostrando el tiempo y el porcentaje de trampas ocupadas por células y perlas en los dos dispositivos. Como se puede observar, el porcentaje de células capturadas es menor que el de perlas

capturadas. Esto se puede deber a que en la suspensión celular hay partículas de dimensiones pequeñas que pueden ocluir los canales de conexión (como restos celulares) y por lo tanto disminuir en número de trampas disponibles. Por otro lado, para aumentar la eficiencia de captura tanto de perlas como de células, se podría disminuir la resistencia de los canales laterales, ya que esto aumentaría el flujo hacia las trampas. Una forma de lograr disminuir la resistencia de los canales laterales es aumentar el ancho de los canales.

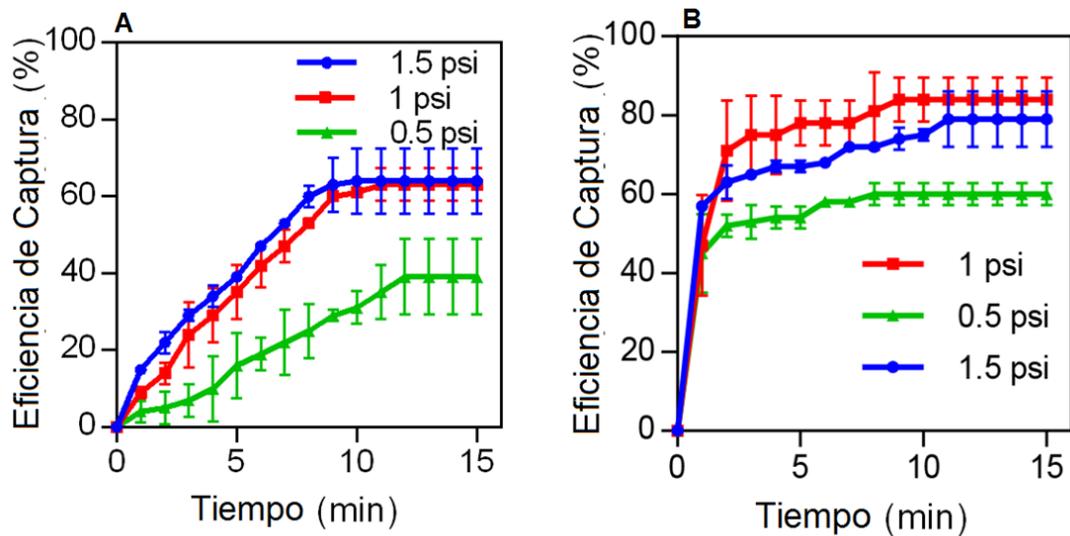


Figura 4.10 Gráficas de la eficiencia de captura de perlas en los dos dispositivos. A) Dispositivo con canales de 2 μm de ancho. B) Dispositivo con canales de 4 μm de ancho.

Dispositivo	Células		Perlas	
	Tiempo (minutos)	Ocupación 1 psi (%)	Tiempo (minutos)	Ocupación 1 psi (%)
2 μm	11	58	10	62
4 μm	5	65	8	80

Tabla 1 Los mejores resultados para mayor número de trampas ocupadas en ambos dispositivos

Cabe destacar que, tanto para la captura de células como de perlas, los dispositivos con canales de 2 μm fueron menos eficientes. Una posible explicación es que tienen mayor resistencia al flujo, por lo tanto, hay menos perlas y células dirigidas hacia las trampas. Posiblemente si se prueban canales de conexión con mayor ancho aumente el porcentaje de trampas ocupadas, sin embargo, también existe el riesgo de que las células atraviesen los canales. Ya que incluso en los canales de 4 μm si se aumenta la diferencia de presión se pueden observar células que se deforman y atraviesan los canales.

4.4.3 Captura de células y perlas.

Después de identificar los parámetros para obtener la mejor eficiencia de captura individual de células y perlas, se realizaron los experimentos para la captura conjunta en un dispositivo. Para efectuarlo, se perforaron las salidas de los dos canales laterales y con el uso de tapones se cerraron las salidas correspondientes para la captura de células o perlas. Los experimentos se realizaron solamente en el dispositivo con canales de 4 μm , debido a que los resultados preliminares sugirieron que fue el más efectivo. Además se usó una diferencia de presión de 1 psi para introducir las suspensiones durante 10 minutos. En la figura 4.11 se pueden observar micrografías representativas de las células y perlas inmovilizadas en sus respectivas trampas,

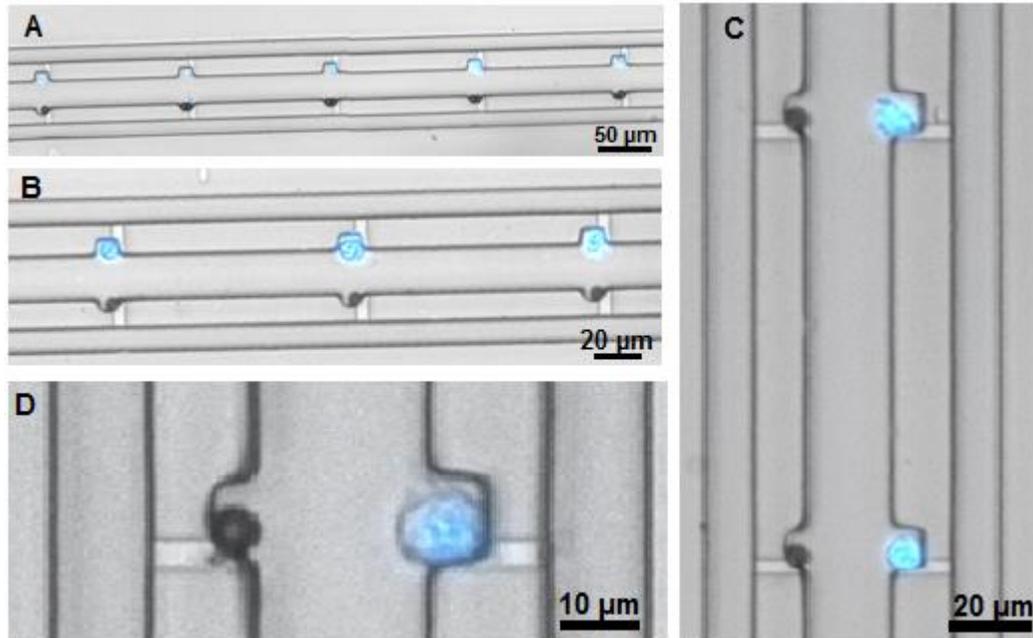


Figura 4.11 Micrografías representativas de la captura de perlas y células juntas en sus respectivas trampas, A). Mosaico de 6 trampas con perlas y células capturadas. B) Micrografía de tres trampas con perlas y células, C) Acercamiento de dos trampas con células y perlas, D) Micrografía de una trampa con una célula y una perla capturadas en sus trampas.

Se calculó el porcentaje de trampas ocupadas por perlas y células juntas e individualmente. En la figura 4.12 se observa que el 77.3% de trampas diseñadas para perlas se ocupó con estas y de las trampas diseñadas para las células se ocupó el 68.6% con células individuales. Sin embargo, solo en el 58% de todas las trampas había una perla y una célula encontradas frente a frente. Esto se debe a que hubo trampas donde solo se capturó una perla en su trampa y no hubo célula en la trampa frontal o viceversa, cabe mencionar que los tapones no son tan efectivos como el no perforar las salidas, ya que estos no sellan perfectamente las salidas. Al principio de los experimentos hubo flujo hacia los canales laterales cerrados ya que 4% de las trampas para células se ocuparon con perlas. Para resolver ese problema se podrían

implementar válvulas para asegurar que las salidas estén correctamente cerradas.

Por otra parte, también se analizó la viabilidad celular, mostrando que del total de células atrapadas 97% permanecieron vivas, haciendo factible el uso del dispositivo para futuros experimentos con células, Cabe mencionar que se ha reportado la comparación de la viabilidad celular en dispositivos de PDMS y placas de cultivo convencionales donde demuestran que no hay cambios significativos de viabilidad celular en ambos materiales. [79, 80]

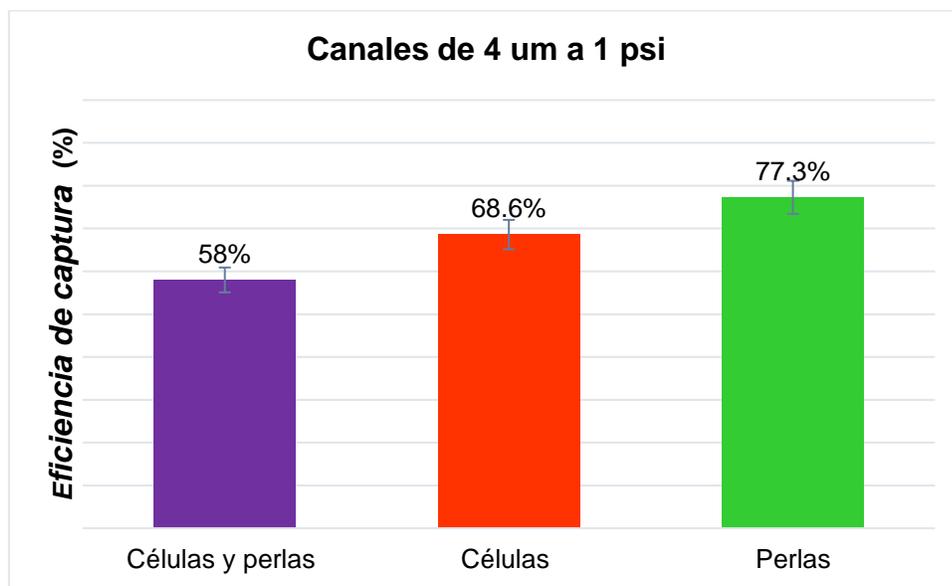


Figura 4.12. Grafica de la eficiencia de captura para células y perlas juntas así como individualmente, en los mismos experimentos.

Este sistema caracterizado permite la captura de células individuales para eventualmente poder medir la secreción de proteínas usando perlas funcionalizadas con anticuerpos de captura. Existen escasos trabajos reportados en donde usan dispositivos microfluidicos para la detección de proteínas producidas por células individuales (Tabla 2). En estos trabajos se han usados varios sistemas para la captura de células, sin embargo una de las desventajas que estos presentan es que tiene variabilidad en el número de células que captura. En contraste nuestro método presenta la ventaja de tener

la certeza de solo capturar una célula por trampa. Además otra ventaja es que no hay contacto entre la célula y los anticuerpos de captura, ya que se tiene una distancia fija entre las trampas. Esto también representa una ventaja adicional debido a que el contacto directo de anticuerpos y células puede provocar una respuesta que no esté asociado al estímulo evaluado [81-83].

Grupos	Control # de células	Control # de perlas	Control de contacto	# de células analizadas
Savas Tay [84]	Si	Si	Si	Bajo
Revzin [76]	No	No	No	Medio
Ohara [85]	No	No aplica	No	Alto
Heath [75]	No	No aplica	No	Medio
Love [74]	No	No aplica	No	Alto

Tabla 2. Comparación de los dispositivos usados para medir la secreción de proteínas en células individuales.

El uso de perlas como biosensores han sido ampliamente utilizadas en dispositivos microfluídicos con el fin de detectar proteínas de fluidos corporales, sin embargo no habían sido usadas para detectar proteínas secretadas por células. Hasta este año solo dos grupos habían demostrado que implementar perlas en dispositivos microfluídica para medir proteínas secretadas en células individuales es factible. El grupo de Revzin aisló perlas, cuando fluían por canales para después capturarlas aleatoriamente con pozos invertidos, por lo que no cuentan con un control del número de perlas capturadas, por lo tanto tiene baja eficiencia de captura. El grupo de Savas Tay implemento un complejo sistema de trampas y bombas para la captura de células y perlas, sin embargo las dimensiones del dispositivo no permite tener alto rendimiento ya que no es posible analizar más de 40 células en un dispositivo. La ventaja del sistema presentado aquí es el reducido tamaño de las estructuras permitiendo aumentar el número de trampas para analizar un número más elevado de células.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó, fabricó y caracterizó un dispositivo microfluidico basado en trampas hidrodinámicas para la captura de células y perlas individuales, con el fin de posteriormente poder usar perlas como biosensores para la detección de proteínas secretadas por células individuales. Se demostró que es posible usar el sistema propuesto para la inmovilización de células y perlas juntas. Además la caracterización realizada permitió determinar los parámetros necesarios para lograr un mejor funcionamiento.

Los resultados muestran que para tener el mayor número de trampas ocupadas se deben introducir las suspensiones de perlas y células a una diferencia de presión de 1 psi. Además usar dispositivos con canales de conexión con ancho de 4 μm logra el mayor número de trampas ocupadas en el menor tiempo. Cabe destacar que el diseño de las trampas evita el movimiento de las células y las perlas por lo tanto se pueden fluir soluciones sin riesgo de desocupar las trampas, Además evita que las células estén sujetas a un estrés alto, ya que las paredes de las trampas protegen las células de alta presión sobre su superficie.

Finalmente se puede concluir que el sistema presentado puede ofrecer diversas ventajas frente a otros dispositivos o a técnicas convencionales usadas para medir la secreción de proteínas en células individuales. Además el sistema no provoca muerte celular, ya que los resultados mostraron que las células permanecen viables después de inmovilizarlas.

6. PERSPECTIVAS

Se demostró que el sistema funciona correctamente, sin embargo se podría mejorar, al incluir una capa de control para tener válvulas que cierren correctamente las salidas de los canales laterales. Esto permitirá tener un mejor control del sistema y será más fácil operarlo, además existe la posibilidad que aumente el número de células y perlas capturadas juntas.

Otra mejora posible es fabricar el molde con una resina positiva, ya que permitirá tener los canales con perfil redondeado. Esto nos ayudará a cerrar el canal central para formar cámaras que aíslen las células y las perlas. Las dimensiones del sistema permite que se puedan hacer modificaciones al diseño para lograr tener más de 700 trampas para la captura de células y perlas. También se puede modificar el diseño para incluir varias entradas controladas por un multiplexor y poder introducir distintos reactivos sin riesgo de contaminación.

Después de que al sistema se le realicen las mejoras mencionadas, éste puede ser usado para varias aplicaciones. Una de ellas sería analizar la producción de citocinas de células del sistema inmune, ya que se han encontrado subpoblaciones de células correlacionadas con enfermedades como lupus eritematoso sistémico o tuberculosis.

El sistema también ofrece la posibilidad de estudiar a nivel individual la comunicación paracrina entre dos poblaciones celulares distintas con el fin de analizar respuestas como migración o proliferación.

REFERENCIAS

- [1] Hastings, A. (2013). *Population biology: concepts and models*: Springer Science & Business Media.
- [2] Yin, H., & Marshall, D. (2012). Microfluidics for single cell analysis. *Current opinion in biotechnology*, 23(1), 110-119.
- [3] Lecault, V., White, A. K., Singhal, A., & Hansen, C. L. (2012). Microfluidic single cell analysis: from promise to practice. *Current opinion in chemical biology*, 16(3), 381-390.
- [4] Wei, W., Shin, Y. S., Ma, C., Wang, J., Elitas, M., Fan, R., & Heath, J. R. (2013). Microchip platforms for multiplex single-cell functional proteomics with applications to immunology and cancer research. *Genome medicine*, 5(8), 1.
- [5] Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., . . . Westhusin, M. (2002). Cell biology: a cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415(6874), 859-859.
- [6] Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., & Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(5584), 1183-1186.
- [7] Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- [8] Zenobi, R. (2013). Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. *Science*, 342(6163), 1243259.
- [9] Raser, J. M., & O'Shea, E. K. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science*, 309(5743), 2010-2013.

- [10] Walling, M. A., & Shepard, J. R. (2011). Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 4049-4076
- [11]. Chang, H. H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D. E., & Huang, S. (2008). Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature*, 453(7194), 544-547.
- [12] Acar, M., Mettetal, J. T., & van Oudenaarden, A. (2008). Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nature genetics*, 40(4), 471-475
- [13] Bishop, A. L., Rab, F. A., Sumner, E. R., & Avery, S. V. (2007). Phenotypic heterogeneity can enhance rare-cell survival in 'stress-sensitive' yeast populations. *Molecular microbiology*, 63(2), 507-520.
- [14] Fraser, H. B., Hirsh, A. E., Giaever, G., Kumm, J., & Eisen, M. B. (2004). Noise minimization in eukaryotic gene expression. *PLoS Biol*, 2(6), e137.
- [15] Avraham, R., Haseley, N., Brown, D., Penaranda, C., Jijon, H. B., Trombetta, J. J., . . . Regev, A. (2015). Pathogen cell-to-cell variability drives heterogeneity in host immune responses. *Cell*, 162(6), 1309-1321
- [16] Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690), 1622-1625.
- [17] Han, Y., Wind-Rotolo, M., Yang, H.-C., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2007). Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nature Reviews Microbiology*, 5(2), 95-106.
- [18] Kuukasjärvi, T., Karhu, R., Tanner, M., Kähkönen, M., Schäffer, A., Nupponen, N., . . . Isola, J. (1997). Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer research*, 57(8), 1597-1604.

- [19] Kuang, Y., & Walt, D. R. (2005). Monitoring “promiscuous” drug effects on single cells of multiple cell types. *Analytical biochemistry*, 345(2), 320-325.
- [20] Lindström, S., & Andersson-Svahn, H. (2010). Overview of single-cell analyses: microdevices and applications. *Lab on a Chip*, 10(24), 3363-3372.
- [21] Wang, D., & Bodovitz, S. (2010). Single cell analysis: the new frontier in ‘omics’. *Trends in biotechnology*, 28(6), 281-290.
- [22] Altschuler, S. J., & Wu, L. F. (2010). Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell*, 141(4), 559-563.
- [23] Toriello, N. M., Douglas, E. S., Thaitrong, N., Hsiao, S. C., Francis, M. B., Bertozzi, C. R., & Mathies, R. A. (2008). Integrated microfluidic bioprocessor for single-cell gene expression analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20173-20178.
- [24] Birtwistle, M. R., Rauch, J., Kiyatkin, A., Aksamitiene, E., Dobrzyński, M., Hoek, J. B., . . . Kholodenko, B. N. (2012). Emergence of bimodal cell population responses from the interplay between analog single-cell signaling and protein expression noise. *BMC systems biology*, 6(1), 1.
- [25] Carlo, D. D., & Lee, L. P. (2006). Dynamic single-cell analysis for quantitative biology. *Analytical chemistry*, 78(23), 7918-7925.
- [26] Batchelor, E., Loewer, A., & Lahav, G. (2009). The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 371-377.
- [27] Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19(11), 1853-1861.
- [28] Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport.

- [29] Sikder, H. A., Devlin, M. K., Dunlap, S., Ryu, B., & Alani, R. M. (2003). Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer cell*, 3(6), 525-530.
- [30] Blagoev, B., Kratchmarova, I., Ong, S.-E., Nielsen, M., Foster, L. J., & Mann, M. (2003). A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nature biotechnology*, 21(3), 315-318.
- [31] Wu, M., & Singh, A. K. (2012). Single-cell protein analysis. *Current opinion in biotechnology*, 23(1), 83-88.
- [32] van den Heuvel, M., Nusse, R., Johnston, P., & Lawrence, P. A. (1989). Distribution of the wingless gene product in *Drosophila* embryos: a protein involved in cell-cell communication. *Cell*, 59(4), 739-749.
- [33] Idsby RA, K. T. (2007). *Inmunologia de Kuby* . Médica Panamericana.
- [34] O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8(3), 275-283.
- [35] Callard, R. E., & Gearing, A. J. (1994). *The cytokine factsbook* (Vol. 1): Academic Press London.
- [36] Shirasaki, Y., Yamagishi, M., Shimura, N., Hijikata, A., & Ohara, O. (2013). Toward an understanding of immune cell sociology: real-time monitoring of cytokine secretion at the single-cell level. *IUBMB life*, 65(1), 28-34.
- [37] Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest Journal*, 118(2), 503-508.
- [38] Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest Journal*, 117(4), 1162-1172.
- [39] Arai, K.-i., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N., & Yokota, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual review of biochemistry*, 59(1), 783-836.

- [40] Tobias, P. S., & Ulevitch, R. J. (1993). Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiology*, 187(3), 227-232.
- [41] Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., . . . Ulevitch, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249(4975), 1429-1431.
- [42] Ulloa, L., & Tracey, K. J. (2005). The 'cytokine profile': a code for sepsis. *Trends in molecular medicine*, 11(2), 56-63.
- [43] Lin, W.-W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1175-1183.
- [44] Bayer, M., Tauchmannová, H., Ferenčík, M., Kovařová, M., Killinger, Z., Franeková, L., & Sheth, K. (2015). *Dictionary of Rheumatology*: Springer.
- [45] Crowther, J. R. (1995). *ELISA: theory and practice* (Vol. 42): Springer Science & Business Media.
- [46] Tanguay, S., & Killion, J. J. (1994). Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine and cytokine research*, 13(4), 259-263.
- [47] Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., & Rieger, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 159(1-2), 197-2
- [48] Bonner, W., Hulett, H., Sweet, R., & Herzenberg, L. (1972). Fluorescence activated cell sorting. *Review of Scientific Instruments*, 43(3), 404-409.
- [49] Bandura, D. R., Baranov, V. I., Ornatsky, O. I., Antonov, A., Kinach, R., Lou, X., . . . Tanner, S. D. (2009). Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled

plasma time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 81(16), 6813-6822.

- [50] Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368-373.
- [51] Tian, W.-C., & Finehout, E. (2009). *Microfluidics for biological applications* (Vol. 16): Springer Science & Business Media.
- [52] Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M., Fettingner, J. C., Paulus, A., Lüdi, H., & Widmer, H. M. (1992). Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography A*, 593(1), 253-258.
- [53] Huh, D., Gu, W., Kamotani, Y., Grotberg, J. B., & Takayama, S. (2005). Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles. *Physiological measurement*, 26(3), R73.
- [54] Yi, C., Li, C.-W., Ji, S., & Yang, M. (2006). Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells. *Analytica Chimica Acta*, 560(1), 1-23.
- [55] Price, A. K., & Culbertson, C. T. (2007). Chemical analysis of single mammalian cells with microfluidics. *Analytical chemistry*, 79(7), 2614-2621.
- [56] Mu, X., Zheng, W., Sun, J., Zhang, W., & Jiang, X. (2013). Microfluidics for manipulating cells. *Small*, 9(1), 9-21.
- [57] van Noort, D., Ong, S. M., Zhang, C., Zhang, S., Arooz, T., & Yu, H. (2009). Stem cells in microfluidics. *Biotechnology progress*, 25(1), 52-60.
- [58] El-Ali, J., Sorger, P. K., & Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature*, 442(7101), 403-411.

- [59] Weibel, D. B., & Whitesides, G. M. (2006). Applications of microfluidics in chemical biology. *Current opinion in chemical biology*, 10(6), 584-591.
- [60] Neuži, P., Giselbrecht, S., Länge, K., Huang, T. J., & Manz, A. (2012). Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 11(8), 620-632.
- [61] Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J., & Whitesides, G. M. (1998). Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Analytical chemistry*, 70(23), 4974-4984.
- [62] Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1998). Soft lithography. *Annual review of materials science*, 28(1), 153-184.
- [63] del Campo, A., & Greiner, C. (2007). SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(6), R8
- [64] Qin, D., Xia, Y., & Whitesides, G. M. (2010). Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature protocols*, 5(3), 491-502.
- [65] Unger, M. A., Chou, H.-P., Thorsen, T., Scherer, A., & Quake, S. R. (2000). Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288(5463), 113-116.
- [66] Zare, R. N., & Kim, S. (2010). Microfluidic platforms for single-cell analysis. *Annual review of biomedical engineering*, 12, 187-20
- [67] Chou, H.-P., Unger, M. A., & Quake, S. R. (2001). A microfabricated rotary pump. *Biomedical Microdevices*, 3(4), 323-330.
- [68] Yu, J., Zhou, J., Sutherland, A., Wei, W., Shin, Y. S., Xue, M., & Heath, J. R. (2014). Microfluidics-based single-cell functional proteomics for fundamental and applied biomedical applications. *Annual review of analytical chemistry*, 7, 275-295.

- [69] Lin, C.-H., Hsiao, Y.-H., Chang, H.-C., Yeh, C.-F., He, C.-K., Salm, E. M., . . . Hsu, C.-H. (2015). A microfluidic dual-well device for high-throughput single-cell capture and culture. *Lab on a Chip*, 15(14), 2928-2938.
- [70] Chung, K., Rivet, C. A., Kemp, M. L., & Lu, H. (2011). Imaging single-cell signaling dynamics with a deterministic high-density single-cell trap array. *Analytical chemistry*, 83(18), 7044-7052.
- [71] Liu, W., Dechev, N., Foulds, I. G., Burke, R., Parameswaran, A., & Park, E. J. (2009). A novel permalloy based magnetic single cell micro array. *Lab on a Chip*, 9(16), 2381-2390.
- [72] Grier, D. G. (2003). A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424(6950), 810-816.
- [73] Di Carlo, D., Wu, L. Y., & Lee, L. P. (2006). Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip*, 6(11), 1445-1449.
- [74] Han, Q., Bradshaw, E. M., Nilsson, B., Hafler, D. A., & Love, J. C. (2010). Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving. *Lab on a Chip*, 10(11), 1391-1400.
- [75] Ma, C., Fan, R., Ahmad, H., Shi, Q., Comin-Anduix, B., Chodon, T., . . . Radu, C. G. (2011). A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells. *Nature medicine*, 17(6), 738-743.
- [76] Son, K. J., Rahimian, A., Shin, D.-S., Siltanen, C., Patel, T., & Revzin, A. (2016). Microfluidic compartments with sensing microbeads for dynamic monitoring of cytokine and exosome release from single cells. *Analyst*, 141(2), 679-688.
- [77] Bhattacharya, S., Datta, A., Berg, J. M., & Gangopadhyay, S. (2005). Studies on surface wettability of poly (dimethyl) siloxane (PDMS) and

glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. *Journal of microelectromechanical systems*, 14(3), 590-597.

- [78] Deng, B., Li, X., Chen, D., You, L., Wang, J., & Chen, J. (2014). Parameter Screening in Microfluidics Based Hydrodynamic Single-Cell Trapping. *The Scientific World Journal*, 2014.
- [79] Bélanger, M. C., & Marois, Y. (2001). Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: A review. *Journal of biomedical materials research*, 58(5), 467-477.
- [80] Futrega, K., Yu, J., Jones, J. W., Kane, M. A., Lott, W. B., Atkinson, K., & Doran, M. R. (2016). Polydimethylsiloxane (PDMS) modulates CD38 expression, absorbs retinoic acid and may perturb retinoid signalling. *Lab on a Chip*, 16(8), 1473-1483.
- [81] Takai, T. (2002). Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 580-592.
- [82] Clynes, R., Maizes, J. S., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T., & Ravetch, J. V. (1999). Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *The Journal of experimental medicine*, 189(1), 179-186.
- [83] Unkeless, J. (1979). Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *The Journal of experimental medicine*, 150(3), 580-596.
- [84] Junkin, M., Kaestli, A. J., Cheng, Z., Jordi, C., Albayrak, C., Hoffmann, A., & Tay, S. (2016). High-Content Quantification of Single-Cell Immune Dynamics. *Cell reports*, 15(2), 411-422.
- [85] Shirasaki, Y., Yamagishi, M., Suzuki, N., Izawa, K., Nakahara, A., Mizuno, J., . . . Nishikomori, R. (2014). Real-time single-cell imaging of protein secretion. *Scientific reports*, 4.

