



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

**Dispositivo microfluídico para aislar y recuperar células  
blancas**

**Tesis que presenta**

Oriana Gerallin Chavez Pineda

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

Ingeniería y Física Biomédicas

**Director de tesis**

Dr. José Luis García Cordero

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y al Cinvestav-IPN, Unidad Monterrey por la oportunidad de cursar esta maestría.

Igualmente agradezco al Dr. José Luis García Cordero por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, por la confianza que me brindo para formar parte de su grupo de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y consejos en el desarrollo de mi trabajo de tesis, en especial a Alan González por su apoyo incondicional.



## Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS .....	2
ABSTRACT .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1 Separación de poblaciones celulares .....	8
1.2 Sangre .....	9
1.2.1 Leucocitos .....	11
1.2.2 Métodos convencionales de separación.....	14
1.3 Microfluídica.....	16
1.3.1 Métodos microfluidicos para separación de células.....	17
1.3.2 Métodos de separación pasivos .....	18
1.3.3 Enfoque Inercial.....	20
1.3.4 Filtración Hidrodinámica .....	22
1.3.5 Métodos de separación activos .....	23
1.3.6 Dielectroforesis.....	24
1.3.7 Acustoforesis .....	25
1.3.8 Magnetoforesis .....	27
1.3.9 Desplazamiento lateral determinista.....	29
1.4 Justificación .....	40
2. OBJETIVOS.....	42

2.1 Objetivo General .....	42
2.2 Objetivos específicos .....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	44
3.1 Diseño de dispositivo .....	44
3.2 Simulación del sistema .....	47
3.3 Fabricación de dispositivos .....	48
3.3.1 Fabricación del molde.....	49
3.3.2 Fabricación de dispositivos de PDMS .....	51
3.4 Metodología experimental.....	51
3.4.1 Caracterización de dispositivo microfluídico .....	52
3.4.2 Separación de leucocitos.....	53
3.4.3 Marcaje y fijación de muestras .....	54
3.4.4 Análisis por citometría de flujo .....	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
4.1 Simulaciones .....	60
4.2 Pruebas de energía .....	62
4.3 Medidas del dispositivo .....	64
4.4 Caracterización de dispositivo microfluídico .....	65
4.5 Separación de Leucocitos.....	67
4.6 Análisis por citometría de flujo .....	70
4.7 Eficiencia de separación del dispositivo microfluídico.....	74
5. CONCLUSIONES .....	78
6. PERSPECTIVAS.....	80
REFERENCIAS.....	82

# ABSTRACT

Separating cells from a population of complex mixtures is a first step in different diagnostic methods, biological investigation and clinic therapy. Blood components separation has been carried out through dissociation of physical properties, such as size, density, charge, among others.

Microfluidic devices have been established as an additional alternative to the commonly used methodologies for blood cell separation, offering several advantages, such as minimized sample and reagents consumption, fast efficiency, continuous separation, and high throughput and automatization, thus reducing human error, and in some cases eliminates the need to label cell with antibodies or magnetic beads.

In this thesis, we present a microfluidic device capable of separating and recovering white blood cells exploiting the deterministic lateral displacement method. This method separates cells based on size and deformability through the interaction with structures and hydrodynamical forces. The microfluidic device design allows a mechanical focusing of the blood sample without using two or more inlets, it is commonly performed, allowing an easy manipulation and efficient white blood cells separation. The efficiency of the microfluidic device was characterized, considering variables like cell recovery, purity and cell viability. As a result, our device has a cell recovery of 70% and cells are distributed in the outlets with an efficiency of ~90%, without affecting cell viability.

# RESUMEN

Separar una población de células a partir de mezclas complejas es un primer paso en los métodos de diagnóstico, investigación biológica y terapia clínica. La separación de componentes sanguíneos se ha llevado a cabo a través de la disociación de propiedades físicas tales como tamaño, densidad, carga, entre otros.

Los dispositivos microfluídicos han surgido como una alternativa adicional a las metodologías utilizadas tradicionalmente para la separación de células sanguíneas, ofreciendo diversas ventajas como: un consumo minimizado de muestra y reactivos; separación rápida, eficiente y de manera continua; alta automatización y paralelización. De esta manera reduciendo el error humano y en algunos casos la necesidad de marcar las células con anticuerpos o perlas magnéticas.

En esta tesis se presenta un dispositivo microfluídico capaz de separar y recuperar células blancas (leucocitos) haciendo uso del método de desplazamiento lateral determinista, el cual permite separar células en base a su tamaño y deformabilidad a partir de la interacción con estructuras y fuerzas hidrodinámicas. El diseño del dispositivo permite un enfoque mecánico de la muestra sin el uso de dos o más presiones, permitiendo así una fácil manipulación y eficiente separación de células blancas. Después de la separación de células, se analizó la eficiencia del sistema en cuanto a variables como recuperación, pureza y viabilidad celular. Como resultado, nuestro dispositivo tiene una recuperación del 70% y distribuye las células en las salidas de interés con una eficiencia del ~90% sin afectar la viabilidad de las células.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Separación de poblaciones celulares

Los organismos están formados por diferentes poblaciones celulares que cumplen funciones especializadas, coordinadas por sistemas complejos de comunicación [1]. Es decir, cada tipo de célula está especialmente adaptada para realizar una o más funciones concretas; por ejemplo, los eritrocitos que transportan el oxígeno desde los pulmones a los tejidos [2].

Para el estudio de una determinada población celular (en lo que respecta a la estructura, función e interacción con el ambiente) es necesario en muchos casos un primer paso de separación, puesto que las células de interés normalmente se encuentran inmersas en un medio con diferentes tipos de células. Actualmente existen una gran variedad de métodos de separación de células que se basan en diferentes propiedades como la adhesión, densidad, unión con algún anticuerpo, polarización, entre otras [3].

La separación y clasificación de poblaciones de células a partir de una muestra heterogénea es fundamental para diversas aplicaciones, entre ellas la investigación biológica, el diagnóstico de enfermedades y la terapia celular.

En la terapia celular, la separación de células es una herramienta que permite introducir una población enriquecida de un tipo de célula específica a pacientes con deficiencia de éstas. Por ejemplo, la purificación de plaquetas por aféresis (técnica que separa los componentes de la sangre y luego devuelve al



torrente sanguíneo una población de interés purificada) a menudo se utilizan para transfusiones durante una cirugía [4].

En la terapia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) las diferentes metodologías de separación de células han favorecido el uso de células T (forman parte del sistema inmune) como agentes terapéuticos. Este método terapéutico se basa inicialmente en la separación eficiente de células T que posteriormente serán manipuladas ex vivo para tratar al paciente infectado con el VIH es, al menos en teoría, una forma de utilizar la "inmunidad natural". De esta forma, las células T transferidas pueden reconocer y matar específicamente a las células infectadas por el VIH, ofreciendo un enfoque terapéutico dirigido, disminuyendo al mismo tiempo los efectos de toxicidad en los órganos [5].

Para el diagnóstico de enfermedades generalmente se estudian diferentes fluidos biológicos. La sangre, en particular, es un indicador importante del estado funcional del cuerpo humano debido a que intercambia información con todos los tejidos a través de la red vascular [2]. Diversas enfermedades pueden ser diagnosticadas a través del examen de los biomarcadores moleculares y celulares que circulan en la sangre. Un ejemplo de ello es la detección de células tumorales circulantes (CTC) en muestras de sangre, que ha surgido como una herramienta de diagnóstico y pronóstico mínimamente invasiva para los pacientes con cánceres metastásicos [6,7].

## **1.2 Sangre**

La sangre es un tejido líquido que constituye el 7% del peso corporal de una persona adulta, ocupando un volumen total de 4-4.5 L en las mujeres y 4.5-5 L en los hombres. Se compone de una porción líquida que contiene agua, solutos y proteínas llamada plasma y representa el 55% del volumen sanguíneo total. También contiene 45% de elementos formes como eritrocitos, leucocitos (células blancas) y plaquetas [8,9].

La sangre circula en el interior de los vasos sanguíneos y cumple diferentes funciones entre ellas, transporte, regulación y protección. Transporta oxígeno desde los pulmones hasta las células del cuerpo y dióxido de carbono desde las células hacia los pulmones, a través de la hemoglobina presente en los eritrocitos. Los eritrocitos son células que no tienen núcleo, tienen forma de disco bicóncavo con un diámetro aproximado de 7-8  $\mu m$  y 2.5  $\mu m$  de grosor (Figura 1.1). Su membrana plasmática es flexible, lo que permite que se deformen durante su recorrido por capilares. Un hombre adulto tiene alrededor de 4-5 millones de eritrocitos por microlitro [8,9]

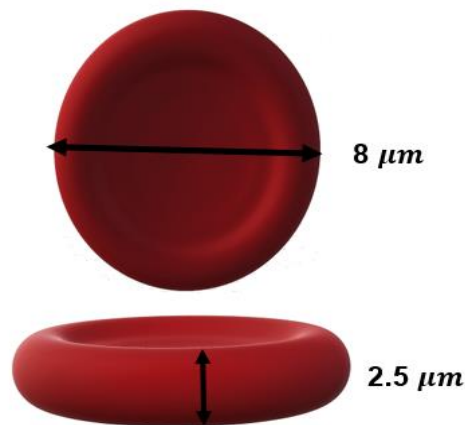


Figura 1.1 Esquema de morfología del eritrocito.

Adicionalmente, la sangre tiene una función de regulación, es decir, ayuda a mantener la homeostasis de todos los líquidos corporales. Facilita la regulación del pH, por medio de proteínas plasmáticas y otros solutos, que actúan como sustancias amortiguadoras evitando cambios bruscos que podrían afectar el funcionamiento de las células. De igual forma, contribuye en el ajuste de la temperatura corporal a través del agua presente en el plasma sanguíneo; el agua absorbe y transporta el calor (por convección); además, gracias a su capacidad para fluir a través de la piel por todos los vasos sanguíneos, permite que el excedente de calor se transfiera al medio ambiente [9].

Algunos componentes sanguíneos cumplen funciones de protección; la sangre puede coagularse por la intervención de las plaquetas y diversas proteínas plasmáticas, previendo su pérdida excesiva en el sistema circulatorio luego de una lesión. Las plaquetas son pequeños cuerpos granulados, carentes de núcleo que miden de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro y su recuento varía entre 130,000 a 400,000 por microlitro de sangre. Como se mencionó anteriormente las plaquetas ayudan a frenar la pérdida de sangre en los vasos sanguíneos, debido a que constituyen la mayor parte de la masa del coágulo, en donde los fosfolípidos en su membrana celular activan los factores de coagulación en el plasma que generan la formación de hebras de fibrina, que refuerzan el tapón plaquetario [10].

La sangre adicionalmente protege al organismo frente a agresiones externas de virus, bacterias y toxinas, a través de los leucocitos y algunas proteínas plasmáticas como los anticuerpos [10]. A continuación, se profundizará sobre los leucocitos debido a que son las células de interés en la separación de células sanguíneas.

### **1.2.1 Leucocitos**

Las células blancas o leucocitos, a diferencia de los eritrocitos, poseen núcleo, que se hacen visibles por técnicas de tinción, como por ejemplo con el colorante fluorescente Hoechst. La sangre contiene entre 4,000 a 11,000 leucocitos por microlitro, que se clasifican como granulocitos y agranulados, dependiendo de si tienen gránulos citoplasmáticos. Los granulocitos (leucocitos polimorfonucleares) se subdividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos; los leucocitos agranulares incluyen a los linfocitos y monocitos. Las subpoblaciones de leucocitos se diferencian por sus características morfológicas, funcionales y concentraciones en sangre (ver figura 1.2) [8].

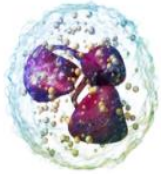
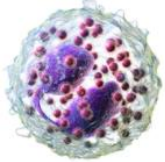
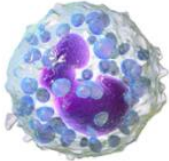
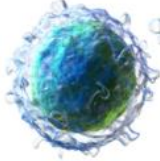
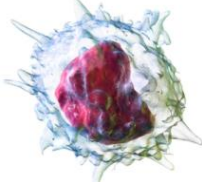
<b>Neutrófilo</b>	<b>Diámetro μm</b>	<b>% entre leucocitos</b>
	10-12	55%- 65%
<b>Eosinófilo</b> 	10- 14	2%- 4%
<b>Basófilo</b> 	8- 10	0,5%- 1%
<b>Linfocito</b> 	7-14	23%- 35%
<b>Monocito</b> 	12- 20	4%- 8%

Figura 1.2 Características de subpoblaciones de leucocitos (Morfología y Concentraciones normales) [11].

Cada subpoblación de células blancas cumple diferentes funciones. Los neutrófilos, por ejemplo, son los más rápidos en responder frente a la destrucción tisular por parte de bacterias, liberando diversas sustancias químicas para destruir un patógeno. Dentro de estas sustancias se incluye la enzima lisozima, la cual destruye ciertas bacterias, y oxidantes como el peróxido de hidrogeno. Los neutrófilos tienen gránulos en su citoplasma, su tamaño es 10- 12  $\mu\text{m}$  de diámetro y su concentración es de 55%- 65% del total de leucocitos. Por otro parte, los eosinófilos detectan y fagocitan agentes parasitarios, también ejercen un papel defensivo en las reacciones alérgicas debido a la liberación de enzimas, como la histaminasa, la cual combate los efectos de la histamina, y otras sustancias relacionadas con la inflamación durante las reacciones alérgicas. Su morfología se caracteriza por que el núcleo tiene dos lóbulos conectados por una gruesa hebra de cromatina (Figura 1.2), su diámetro es de 10- 14  $\mu\text{m}$  y su concentración es de 2%- 4% del total de células blancas. Los basófilos tienen un papel importante en las reacciones alérgicas agudas, debido a que intensifica la respuesta inflamatoria a través de la liberación de heparina, histamina y serotonina. Esta célula tiene gránulos citoplasmáticos, su tamaño oscila entre 8- 10  $\mu\text{m}$  (Figura 1.2), y constituyen menos del 1% de la población de leucocitos [8], [9].

En cuanto a los monocitos se conocen que son las células más grandes de las células sanguíneas, su tamaño es de aproximadamente 12- 20  $\mu\text{m}$ , constituyen el 4%- 8% del total de células blancas. Estas células cuando se diferencian en macrófagos fagocitan y destruyen células muertas o envejecidas [9].

El linfocito es otro tipo de leucocito agranulado, su tamaño y morfología es variable, puede medir entre 7  $\mu\text{m}$ - 14  $\mu\text{m}$  de diámetro. Su función principal es regular la respuesta inmunitaria específica para esto se compone de tres líneas de celulares células B, células T y células citolíticas naturales (NK). Las células B tienen como función principal la destrucción de bacterias e inactivación de sus toxinas; en cuanto las células T atacan virus, hongos,

células cancerosas y células trasplantadas, por lo tanto, son responsables de las reacciones debidas a transfusión y el rechazo de los órganos trasplantados. Las células NK tienen la capacidad de destruir células infectadas por virus y las células tumorales [8].

Debido a que las células blancas protegen al organismo y regulan la respuesta inmunitaria, se han estudiado diferentes aspectos de estas poblaciones celulares en cuanto a su estructura, función e interacción con el micro ambiente. La separación de estas células facilita el estudio de la respuesta inmunitaria del organismo (interacción antígeno- anticuerpo), además favorece el estudio del comportamiento celular frente a estímulos externos. Por lo tanto, la eficiente separación de células permite una mayor investigación en áreas tan diversas como la terapia celular, el diagnóstico de enfermedades y la investigación biológica [3]. A continuación, se discute sobre los métodos tradicionales de separación.

### **1.2.2 Métodos convencionales de separación**

En la actualidad existen diversos métodos de separación de células que se basan en diferentes propiedades como la adhesión, densidad y unión con anticuerpos.

La separación de componentes sanguíneos tradicionalmente se realiza por la eliminación de células rojas. Este método se lleva a cabo mezclando una muestra de sangre (previamente tratada con anticoagulante) con una solución de lisis. El tampón de lisis puede ser hipotónico, es decir una solución con menor concentración de soluto que provoca que la célula aumente su tamaño y eventualmente explote en un intento de restablecer el equilibrio osmótico. De igual forma se puede usar una solución hipertónica la cual tiene una alta concentración de solutos provocando que la célula pierda agua debido a la presión osmótica [12].

Luego del tratamiento con tampón de lisis la muestra se lava, se centrifuga y finalmente se elimina los eritrocitos con el fin de recuperar las

células blancas. La desventaja de este método es la pérdida de leucocitos durante el proceso de centrifugación e igualmente la activación de las mismas. Para la separación y posterior estudio de otros componentes sanguíneos como los eritrocitos el método es inapropiado debido a la eliminación de esta población celular [3], [12]

La separación de subpoblaciones de leucocitos se realiza mediante métodos de gradiente de densidad. En este método la separación se consigue implementando una solución a diferentes concentraciones, una de las soluciones usadas es Ficoll-Hypaque (polisacárido) en donde la densidad del medio aumenta con la profundidad del tubo y luego de un proceso de centrifugación, las células se sedimentan hasta alcanzar aquella posición en la que su densidad iguala a la del medio. De esta forma las poblaciones se ubicarán en diferentes regiones a lo largo del tubo produciendo de esta manera la separación [13].

La citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés Fluorescence Activated Cell Sorting) permite separar diferentes poblaciones celulares en función del tipo de marcaje fluorescente que presenten. Las células inicialmente son tratadas con anticuerpos específicos marcados con fluoróforos; luego las células en suspensión pasan por una región de enfoque que se encuentra acoplado a un cristal piezoeléctrico que vibra con una determinada frecuencia y amplitud. La vibración perturba el flujo de la muestra generando que se formen gotas contenidas de células (Figura 1.3). El análisis se realiza en función de la fluorescencia que presenta cada célula y se le asigna un tipo de carga (positiva, negativa, o ninguna). Finalmente, la muestra pasa por una región que tiene dos placas cargadas que desvía las gotas a diferentes contenedores dependiendo de su carga [14].

La citometría FACS es un método convencional que tiene una alta sensibilidad, eficiencia de separación y pureza; sin embargo, para su funcionamiento requiere del marcaje previo de la muestra a través de

anticuerpos tratados con fluoróforos. En ocasiones se presenta dificultad en encontrar marcadores específicos para una determinada población celular [14].

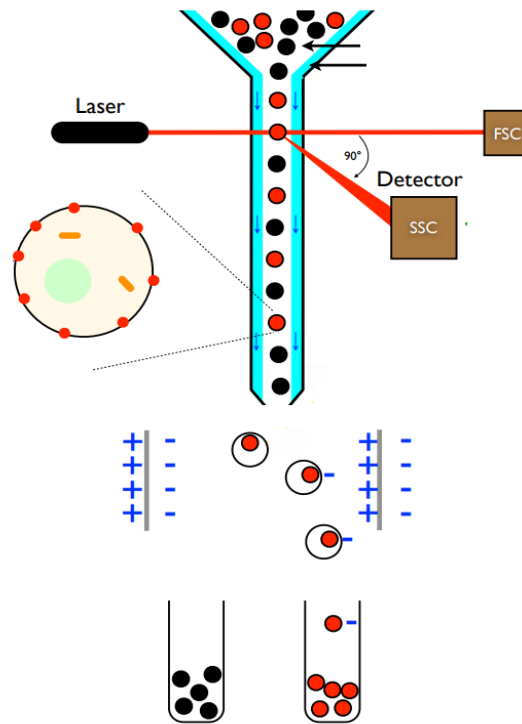


Figura 1.3 Esquema generalizado de los componentes de un citómetro FACS. Tomado de [15].

### 1.3 Microfluídica

La microfluídica ha emergido como una potente tecnología de naturaleza multidisciplinar que permite manipular y analizar con precisión pequeños volúmenes de fluidos (nano- a femto-litros) utilizando estructuras con dimensiones micrométricas [16]. En el campo de la biología se comenzaron a explotar los principios de la microfluídica en métodos analíticos, como cromatografía y electroforesis capilar. Sin embargo, la microfluídica ha expandido rápidamente sus aplicaciones en el campo biológico a partir de los avances en las técnicas de fabricación, específicamente con la litografía suave en polidimetilsiloxano (PDMS). Con ésta se logra fabricar dispositivos



multicapas, que permite incorporar estructuras para el control de los fluidos dentro de los mismos, como la implementación de válvulas, mezcladores y bombas. Además, el uso del PDMS tiene ventajas en otros campos, como en los ensayos biológicos dado que es un material flexible, ópticamente transparente, bio-compatible y se puede unir a otras superficies como vidrio y silicio [17,18].

Implementar plataformas microfluídicas tiene diversas ventajas, tales como un consumo mínimo de muestra y reactivos; por las dimensiones de los canales, bajos costos de fabricación, tiempos cortos de operación y una alta automatización y paralelización, reduciendo de esta manera el error humano. Por lo tanto, con la microfluídica y sus avances en la fabricación se pueden utilizar fácilmente estructuras a una escala similar a las de las células, de modo que pueden emplearse para estudiar fenómenos celulares, construir sistemas que imitan parámetros fisiológicos, realizar separación de poblaciones celulares, y por su alta portabilidad, implementarse en entornos de escasos recursos como en países en vía de desarrollo [17,19].

### **1.3.1 Métodos para separación de células**

Las plataformas microfluídicas han surgido como una alternativa adicional a las metodologías utilizadas tradicionalmente para la separación de células (centrifugación en gradiente de densidades y citometría de flujo). Estas plataformas ofrecen todos los beneficios mencionados anteriormente, además de realizar una separación rápida y de manera continua, y en algunos casos sin necesidad de marcar las células con anticuerpos o perlas magnéticas [3]. La implementación de estas técnicas microfluídicas, permite la separación de células en poblaciones distintas basándose en propiedades físicas como tamaño, carga y deformabilidad.

Los métodos de separación en microfluídica presentados a continuación, se clasifican como activos o pasivos y se definen en función de los principios

del funcionamiento. Los métodos pasivos utilizan la interacción entre partículas, campo de flujo y la estructura del canal. Las técnicas activas hacen uso de campos externos acústicos, magnéticos o eléctricos [20].

### **1.3.2 Métodos de separación pasivos**

Los métodos de separación pasivos dependen de la geometría de los canales y de las fuerzas hidrodinámicas propias de los fluidos en movimiento (como la fuerza de elevación y la fuerza de arrastre de flujo secundario inherentes, que se generan debidas al flujo dentro de los mismos), por lo que no necesitan fuerzas externas para realizar una separación de células según sus propiedades físicas [21].

Los dispositivos microfluídicos que separan o, en otras palabras, que clasifican las células en base a su tamaño, utilizan fuerzas hidrodinámicas para realizarlo. En el estudio de la física implementada en los dispositivos microfluídicos de separación, generalmente se modela a la célula como una partícula rígida, por ende, en muchas técnicas no se consideran las propiedades de deformación que tiene la célula, excepto en el método de Desplazamiento Lateral Determinista (DLD) el cual se clasifica como pasivo y se discute en el siguiente capítulo [21].

Dentro de los métodos pasivos se encuentran los métodos inerciales, es decir, los métodos que se basan en la propiedad que tienen los cuerpos de permanecer en su estado de equilibrio o movimiento uniforme. Su funcionamiento va estar sujeto a las fuerzas que experimentan las partículas cuando fluyen a través de una tubería o canal, puesto que la geometría del canal afecta la variación de la fuerza. Se han implementado canales con forma recta, curva, espiral y curvas asimétricas [21].

En los métodos microfluídicos inerciales se deben considerar diferentes fuerzas, entre éstas, la fuerza que se genera por la interacción de las partículas con la pared del canal (Figura 1.4 a), donde la interacción causa que la partícula

se mueva ligeramente más lento con respecto al fluido, dirigiendo dicha fuerza lejos de las paredes del canal. Esto se produce por la baja presión en la parte superior y la alta presión entre la pared y la partícula, debido a que el fluido se mueve con mayor velocidad en la parte superior que en la parte inferior (pared y partícula). Esta fuerza se relaciona con el coeficiente de elevación, la densidad del fluido, la velocidad máxima del fluido y el diámetro de la partícula, por lo tanto, disminuye con el diámetro hidráulico del canal (Figura 1.4a) [21].

Asimismo, el perfil de velocidad (en este caso parabólico) permite que la partícula suspendida en un fluido experimente diferentes magnitudes de velocidad y para compensar esta diferencia el flujo del fluido induce una fuerza sobre la partícula, dirigida normalmente hacia las paredes del canal microfluídico. Esta fuerza relaciona la densidad del fluido, la velocidad máxima del fluido, el diámetro de la partícula y el diámetro hidráulico del canal (Figura 1.4 b) [22].

Otro factor por considerar es la geometría de los canales, pues éstos adicionan otras variables que afectan la separación de partículas. Ejemplo de ello, son los canales curvos que adicionan un flujo secundario conocido como flujo Dean ( $F_D$ ), que se genera por una recirculación de fluido hacia el centro de la curvatura del canal a lo largo de las superficies superior e inferior del canal; impartiendo una fuerza de arrastre (Figura 1.4 c) sobre las partículas, proporcional al tamaño de la partícula y a la velocidad del flujo secundario [22].

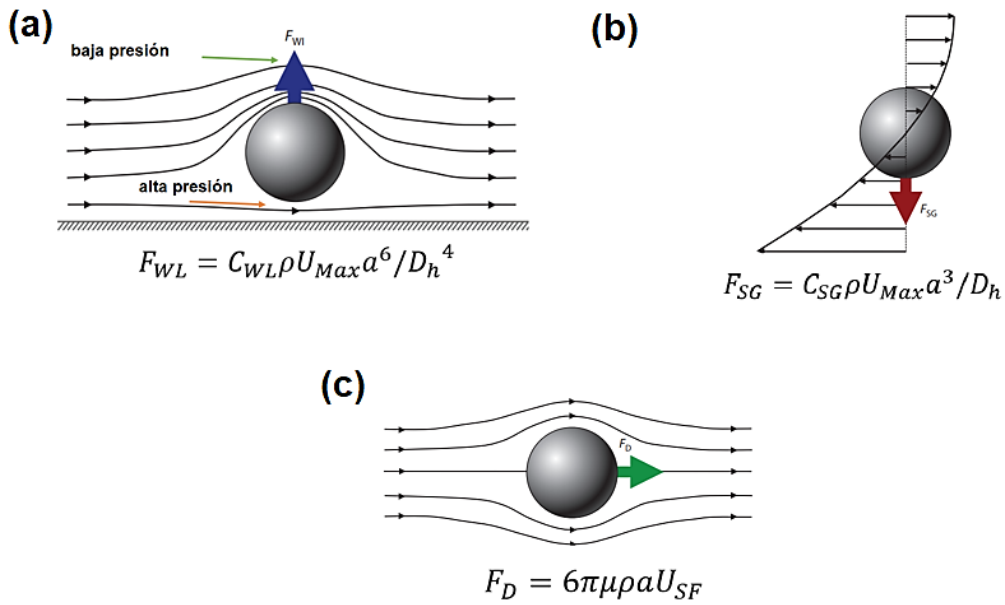


Figura 1.4 Esquema que describen las fuerzas dominantes en métodos inerciales. (a) Fuerza de la interacción de la partícula con la pared. (b) Fuerza cuando la partícula está en un campo de velocidad parabólico. (c) Fuerza de arrastre de flujo secundario. Términos;  $\mu$ , viscosidad del fluido,  $\rho$ , densidad del fluido;  $a$ , diámetro de partícula;  $C_{SG}$ , coeficiente de elevación para la fuerza de elevación;  $C_{WI}$ , coeficiente de elevación para la fuerza de interacción de la pared;  $D_h$ , diámetro hidráulico del canal;  $F_D$ , fuerza de arrastre de flujo secundario;  $F_{SG}$ , fuerza de elevación del gradiente de corte;  $F_{WI}$ , fuerza de interacción de la pared;  $U_{Max}$ , velocidad máxima del fluido;  $U_{SF}$ , velocidad de flujo secundario. Tomado de [22]

### 1.3.3 Enfoque Inercial

Una de las aplicaciones del enfoque inercial es la separación de partículas en dispositivos microfluídicos en forma de espiral (Figura 1.5) en donde las partículas experimentan una fuerza de arrastre causada por el flujo de Dean ( $F_D$ ) transversal y una fuerza neta de sustentación (relacionada con la interacción de las partículas con las paredes), y el perfil de velocidad, como previamente se mencionó que varían en magnitud a través de la sección transversal del canal [23].

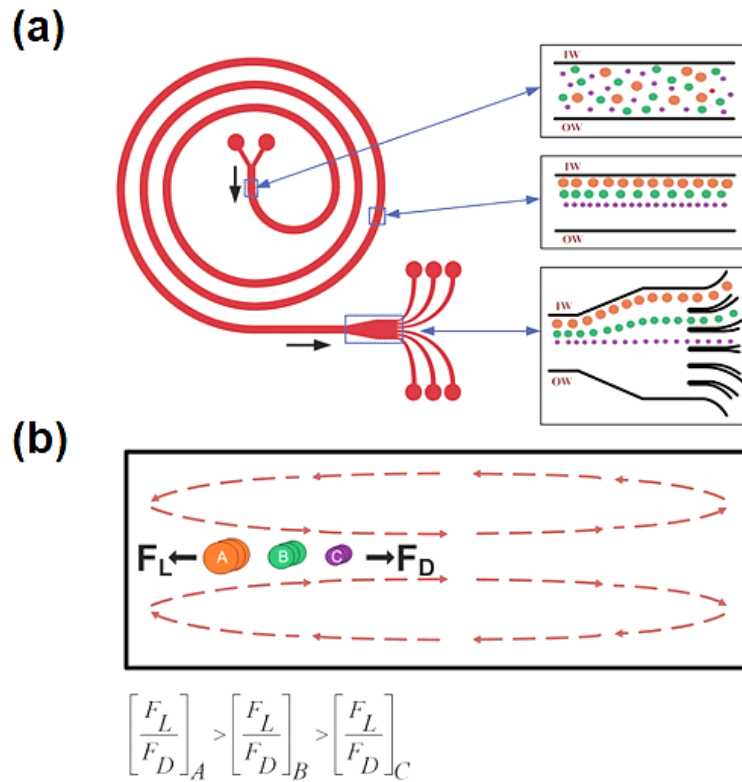


Figura 1.5 (a) Esquema de un dispositivo microfluídico en forma de espiral para separación pasiva de partículas. (b) Sección transversal del micro canal donde se ilustran las fuerzas  $F_L - F_D$  en las partículas y su relación para la posición de equilibrio. Términos:  $F_L$  fuerza de elevación neta,  $F_D$  fuerza de arrastre causada por el flujo de Dean; (IW) pared interior, (OW) pared exterior. Tomado de [23]

El fundamento de la separación se basa en el equilibrio de fuerzas, entre la fuerza de sustentación y la fuerza de arrastre que actúa sobre las partículas, la magnitud de las fuerzas mencionadas depende del radio de la partícula. Por lo tanto, las partículas de mayor tamaño se ubican en el interior de la pared del canal y las de menor tamaño se ubican en el exterior de la pared del canal, por el equilibrio de fuerzas mencionadas anteriormente [20].

Este método se ha implementado en la separación de células tumorales circulantes (CTC), células sanguíneas, partículas de poliestireno y células presentes en el esputo [23], [24], [25], [26]. Además, poseen diferentes ventajas: una fabricación sencilla (tiempos cortos de fabricación), obtención de eficiencias de separación del 90%, alta viabilidad celular (> 90%), y no se

necesita marcar las células (con anticuerpos, perlas magnéticas, etc) para realizar la separación. Aun así, muestra desventajas como, baja especificidad debido a las colisiones de las partículas, generando que la pureza en las muestras disminuya. Para evitar este problema se puede diluir la muestra previamente, sin embargo, esto resulta en tiempos largos para procesar la muestra [21].

### **1.3.4 Filtración Hidrodinámica**

La filtración hidrodinámica es otro método pasivo de separación por tamaño y se ha utilizado en la separación de células sanguíneas, micro esferas y células del hígado. Los dispositivos microfluídicos que implementan esta técnica constan de una región de ingreso de muestra (entradas), un canal principal que se encuentra unido a varios canales de ramificación y finalmente una región de recolección de la muestra (salidas).

Esta técnica se basa en que, a bajo número de Reynolds (los efectos viscosos dominan frente a los efectos inerciales), el centro de un objeto seguirá las líneas de flujo laminar, de esta manera se divide el flujo en diferentes canales y así es posible separar partículas por su tamaño. En otras palabras, cuando las partículas viajan en un canal se distribuyen a lo ancho de éste, al pasar por puntos de ramificación la velocidad en el canal principal se reduce; produciendo que partículas se concentren y posteriormente se alineen a lo largo de las paredes laterales del micro canal (Figura 1.6). De esta forma, al pasar nuevamente por puntos de ramificación la separación se produce por la diferencia de posiciones que tendrían las partículas en base a su tamaño: las partículas más pequeñas se encontrarán más cerca de la pared lateral que las partículas de mayor tamaño [21].

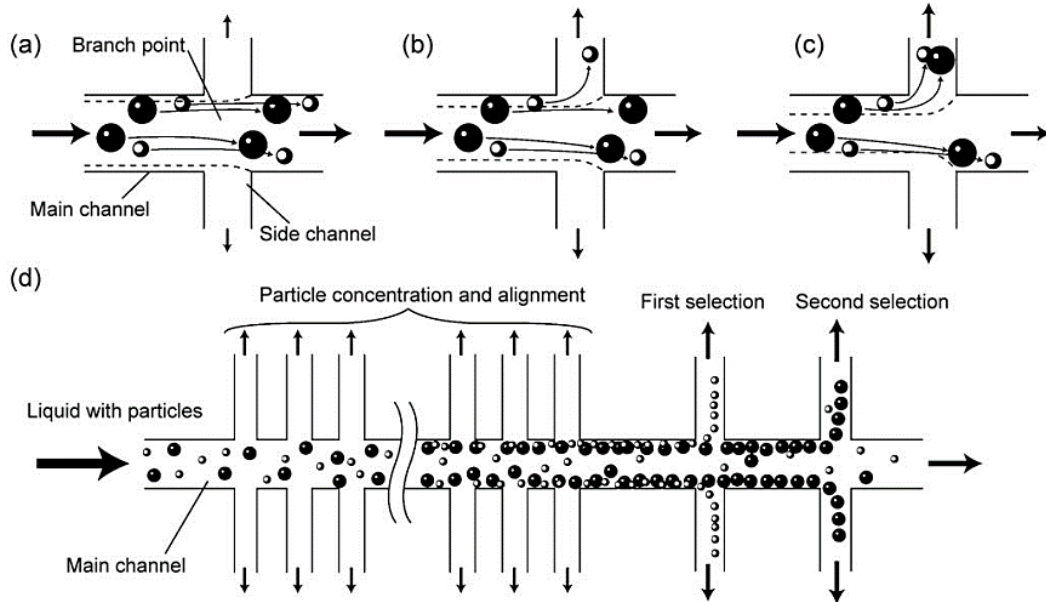


Figura 1.6 Principio de filtración hidrodinámica. Diagrama esquemático mostrando el comportamiento de las partículas en la ramificación (concentración y separación). Tomado de [27]

La ventaja de este método es la fabricación sencilla y su operación simple, esto conlleva a tiempos cortos, tanto en la fabricación como en el procesamiento de muestras. Sin embargo, presenta dificultades debido a las colisiones de las partículas en los puntos de ramificación, produciendo una reducción en la pureza de las muestras recolectadas. Además, en ocasiones se genera oclusión de canales (ramificaciones) afectando de esta forma el funcionamiento y la eficiencia de separación del dispositivo microfluídico [27].

### 1.3.5 Métodos de separación activos

Los métodos activos se basan en la aplicación de campos externos sobre los dispositivos microfluídicos para realizar la separación; estos campos pueden ser magnéticos, eléctricos y acústicos.

### 1.3.6 Dielectroforesis

La separación por dielectroforesis (fuerza que experimentan las partículas cuando pasan por un campo eléctrico no uniforme) es un método activo y su principio se fundamenta en el tamaño y propiedades eléctricas de las partículas. En el caso de la célula la separación va a depender de la conductividad del citosol e igualmente de las propiedades de la membrana (permeabilidad, capacitancia, y la conductividad) y su tamaño [28].

Los dispositivos microfluídicos que realizan separación en base a propiedades eléctricas cuentan con una zona inicial, donde las células son enfocadas al centro del canal, una región en la cual se aplica un campo eléctrico no uniforme que genera la separación, y más de un canal de salida, para la recuperación de cada especie separada (Figura 1.7).

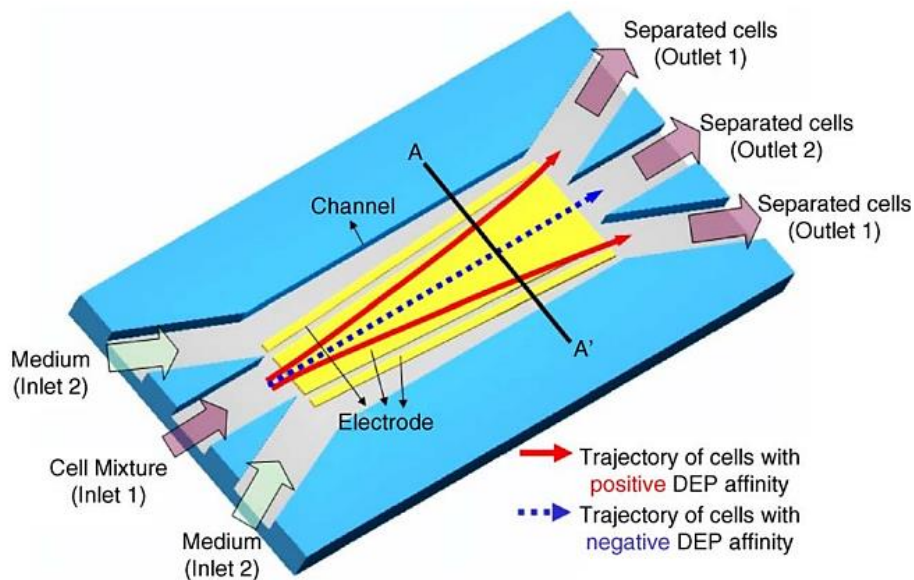


Figura 1.7 Esquema de un dispositivo microfluídico, para separación de partículas por dielectroforesis. Tomado de [29]

La separación en estos dispositivos microfluídicos se produce cuando las células pasan por la zona del campo eléctrico no uniforme, y si sus propiedades endógenas lo permiten, sus cargas se redistribuyen y se forma un dipolo inducido o permanente, direccionando a las células según su carga. El



resultado es la separación de la población total en subpoblaciones según la densidad de carga y el potencial zeta intrínseco de cada célula [21].

La ventaja de estos dispositivos microfluídicos es que se obtiene una alta eficiencia de separación y recuperación, y de igual forma que en los métodos pasivos no se requiere que las partículas estén marcadas con anticuerpos fluorescentes o con micro perlas.

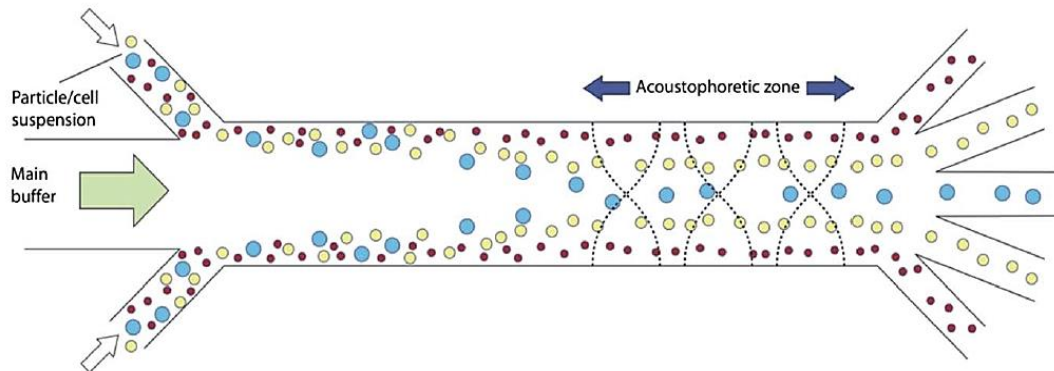
Sin embargo, si comparamos este método con los métodos pasivos se observan desventajas como una fabricación compleja, específicamente en la alineación de los electrodos y la geometría de estos. Por ende, una inadecuada fabricación impediría controlar la no uniformidad del campo eléctrico, que es un factor primordial para su buen funcionamiento. Además, si en las poblaciones a separar las propiedades eléctricas no son significativamente diferentes, como es el caso de diferentes tejidos en los mamíferos, se hace necesario modular el sistema con el fin de obtener un óptimo funcionamiento. La conductividad del medio donde se encuentra sumergida la célula podría dar lugar a un calentamiento cerca de los electrodos generando de esta forma burbujas, así como la muerte celular relacionada con el calor [4], [21], [30].

### **1.3.7 Acustoforesis**

Otra técnica con la cual se realiza separación de partículas implementando campos externos, se denomina acustoforesis. En ella, las células o partículas suspendidas en un fluido se exponen a un campo acústico. Este método se ha implementado en la separación de células sanguíneas, partículas de poliestireno y células tumorales circulantes (CTC), [31], [32], [33].

Los dispositivos microfluídicos que implementan esta técnica cuentan con una zona inicial, donde las células son enfocadas a las paredes del canal, una región en la cual se aplica un campo acústico, y diferentes salidas para recuperar las partículas según su tamaño (Figura 1.8). La región acústica consta de ondas estacionarias generadas por dos fuentes de sonido opuestas,

o por un solo transductor ultrasónico que se enfrenta a un reflector de sonido [33].



*Figura 1.8 Representación esquemática de funcionamiento de dispositivo microfluídico para la separación por campos acústicos. Tomado de [34]*

El fundamento físico de este método es que las partículas al ser expuestas a un campo acústico experimentarán una fuerza generada por la onda estacionaria sobre la sección transversal del canal microfluídico. Sin embargo, esta fuerza acústica transversal es contrarrestada por la actuación de la fuerza de fricción experimentada por las partículas cuando se mueven en un fluido laminar. Por lo tanto, las partículas de mayor densidad se desplazarán (Figura 1.8) hacia los puntos de la onda cuya amplitud es cero (nodos) y las de menor tamaño se moverán hacia los puntos de la onda cuya amplitud es máxima (antinodos) [4], [35]

De este modo, la separación es controlada por la magnitud del campo acústico empleado y de la velocidad de flujo, en otras palabras, por el tiempo en que las partículas se retienen en la zona acústica [34].

Las ventajas de estos dispositivos microfluídicos, son iguales al método anteriormente mencionado y es que se obtiene una alta eficiencia de separación y recuperación, y no se requiere que las partículas estén marcadas. En cuanto a las desventajas del método se tiene fabricación compleja, específicamente en la construcción de la región acústica por la necesidad de un material eficaz en la propagación de ondas. De igual forma se presenta

dificultad en el procesamiento de grandes volúmenes, dado que se necesitan tiempos de procesamiento largos, afectando variables como la temperatura, la cual se ha identificado como el principal problema en relación con la estabilidad en sistemas de acoustoforesis [32], [34].

Además, se ha observado que la implementación de campos acústicos para separar partículas tiene baja especificidad debido a que las propiedades acústicas de las mismas se superponen. Un ejemplo de ello se observó en la separación de células blancas y líneas celulares de cáncer. En ellas, la densidad se solapa generando así una baja eficiencia de separación [32].

### 1.3.8 Magnetoforesis

La magnetoforesis se clasifica como un método de separación activa y se diferencia con los anteriormente discutidos en que implementa un campo magnético externo para desplazar células previamente marcadas con perlas magnéticas que se encuentran tratadas con anticuerpos. Los dispositivos microfluídicos que implementan este método cuentan con una región inicial donde las células son enfocadas a lo largo del canal, una región en la cual se aplica un campo magnético, y diferentes salidas para recuperar las partículas según su tamaño (Figura 1.9).

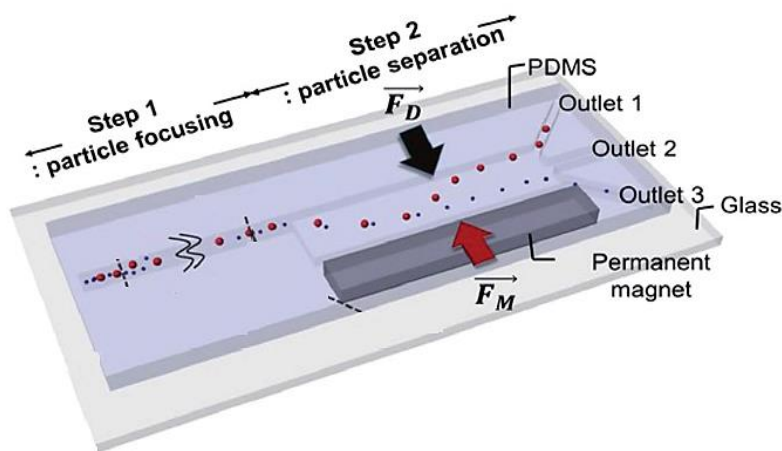


Figura 1.9 Representación esquemática de funcionamiento de dispositivo microfluídico para la separación de partículas por medio de campos magnéticos. Tomado de [36].

La separación o clasificación de partículas se produce cuando estas pasan por un campo magnético generado por un imán o electroimanes; al pasar por este campo las partículas experimentarán una fuerza magnética que está relacionada con su volumen y el gradiente del campo magnético. Sin embargo, la separación causada por fuerzas magnéticas requiere de un campo magnético no homogéneo, puesto que, si se aplica un campo magnético homogéneo en el que el gradiente magnético es cero, entonces la fuerza que actúa sobre las partículas es cero [20], [36].

Aplicando un campo no homogéneo dentro de los canales, las partículas experimentan una fuerza magnética y una fuerza de arrastre hidrodinámico debida al flujo, por lo tanto, la competencia entre ambas fuerzas determina el movimiento lateral de las partículas. Como resultado, se genera una migración longitudinal de partículas en función de su tamaño. Dado que la fuerza magnética es más dominante que el arrastre hidrodinámico, las partículas de menor tamaño sufren un menor desplazamiento que las de mayor tamaño [36].

Este método se ha implementado en la separación de células sanguíneas, células tumorales circulantes (CTC) y microesferas [37]. Esta técnica ofrece ventajas como alta eficiencia de separación, alta pureza y menos posibilidades de daño celular. Sin embargo, hay varios inconvenientes con el método, tales como una baja sensibilidad, el procesamiento de la muestra es lento y generalmente se necesita marcar las células previamente con perlas magnéticas que se encuentran tratadas con anticuerpos, dichos anticuerpos deben ser específicos para cada población [32].

En conclusión, los métodos microfluídicos discutidos anteriormente presenta diferentes ventajas y desventajas, debido a que los trabajos reportados no presentan estudios completos de parámetros importantes como recuperación, pureza y viabilidad celular obtenida con el método microfluídico implementado. En este trabajo se espera implementar una técnica microfluídica para la separación de células blancas de una muestra de sangre. Así, se desea tener cualidades como: fácil operación, alta eficiencia de separación y recuperación, alta viabilidad celular

y considerar la deformabilidad de las células sanguíneas debido a que esta variable afecta la orientación en el canal y por ende la eficiencia de separación del dispositivo. Uno de los métodos que se aproximan a las cualidades deseadas se denomina Desplazamiento Lateral Determinista, el cual se discute en el capítulo siguiente.

### **1.3.9 Desplazamiento lateral determinista**

El Desplazamiento Lateral Determinista (DLD) es un método de separación pasivo, dado que usa estructuras y fuerzas hidrodinámicas para clasificar partículas en base a su tamaño y deformabilidad.

Esta técnica ofrece diferentes ventajas entre ellas la fabricación sencilla, alta eficiencia de separación, no requiere que las células se marquen con anticuerpos o perlas magnéticas, funcionamiento continuo, y dado que es un método determinista, las partículas siguen una trayectoria predeterminada. Su característica más representativa es que para realizar la separación se considera la deformabilidad de las células, por lo tanto, separa poblaciones con diferentes formas [38]. Este método se ha implementado en la separación de células tumorales circulantes (CTC), componentes sanguíneos, partículas de poliestireno y parásitos [39], [40], [41].

El método desplazamiento lateral determinista (DLD) utiliza un arreglo de postes (puede ser circular, triangular, rombo, etc) dentro de un canal microfluídico con el fin de controlar con precisión la trayectoria que siguen las partículas de diferente tamaño, para generar la separación [38].

Al tener un arreglo de postes con filas que se desplazan lateralmente una distancia establecida desde el predecesor, conduce a la creación de diferentes líneas de flujo. En la figura 1.10 se presenta un arreglo de postes en donde se pueden visualizar tres líneas de flujo que se crean debido al desplazamiento de tres postes desde su punto inicial.

La separación se rige por una variable denominada diámetro crítico ( $D_c$ ), que se define como el doble de la distancia desde la superficie del poste a la

primera línea de flujo. Por lo tanto, si el tamaño de la partícula es mayor al diámetro crítico ésta se desplaza a la segunda línea de corriente. Este proceso continúa cada vez que pasa por un poste, mientras tanto las partículas más pequeñas que el diámetro crítico permanecen centrados dentro de la primera línea de flujo, por lo tanto, no se desplazan lateralmente [41].

El diámetro crítico depende de factores como, el diámetro del poste ( $D_p$ ), la distancia entre poste-poste  $\lambda$  (constante), que es la suma de la distancia de separación  $G$  y el diámetro del poste; cada fila se desplaza una distancia ( $\Delta\lambda$ ) con referencia a su predecesor, como se presenta en la Figura 1.10.

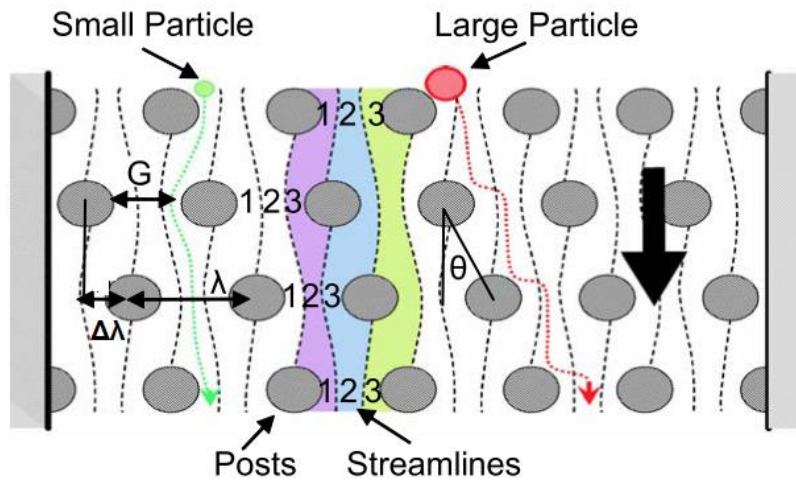


Figura 1.10 Representación esquemática que ilustra la separación por desplazamiento lateral determinista en una matriz de postes. Tomado de [38].

La variable establecida como  $\Delta\lambda$  es la distancia en donde cada fila sucesiva de postes se desplaza lateralmente en referencia a su predecesor, como la distancia entre los centros de los postes ( $\lambda$ ) es la misma se puede establecer la siguiente relación [38].

$$\lambda \tan \theta = \frac{\lambda}{N} \quad (1.1)$$

Donde  $\theta$  es el ángulo que se forma por el desplazamiento lateral de las filas y representa la alineación de cada columna con respecto a la dirección del

flujo. Se establece la variable  $N$  como el periodo en donde los postes de la fila  $N+1$  se encuentran en la misma posición que la primera fila, ésta se relaciona como [38]:

$$N = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} \quad (1.2)$$

El periodo ( $N$ ) de esta forma determina el número de líneas de flujo. Con la inversa de la ecuación 1.1 se puede establecer el término fracción de desplazamiento de la fila ( $\varepsilon$ ) como [38]:

$$\varepsilon = \frac{\Delta\lambda}{\lambda} = \frac{1}{N} = \tan \theta \quad (1.3)$$

La variable que establece qué camino seguirá cada partícula esta dado por el diámetro crítico que se define como:

$$D_C = 2\beta \quad (1.4)$$

Donde  $\beta$  representa en ancho de la primera línea de flujo, que está relacionado con la distancia de separación ( $G$ ) entre postes y la fracción del desplazamiento de la fila ( $\varepsilon$ )

$$D_C = 2\eta G\varepsilon \quad (1.5)$$

Donde se define el termino adimensional  $\eta$  que relaciona el perfil de flujo entre cada poste. Asumiendo un perfil de flujo parabólico a través de la distancia entre postes, es decir con velocidad cero en las paredes de los postes, Beech [42] encontró que  $\eta = \sqrt{\frac{N}{3}}$ .

Para comparar esta teoría Davis [36] realizó una serie de experimentos con 20 dispositivos microfluídicos con diferente tamaño de separación ( $G$ ) entre

1.3  $\mu m$  a 38  $\mu m$  y varió de 0.005 a 0.5 la fracción de desplazamiento de la fila ( $\epsilon$ ). Para los experimentos inyectó perlas de poliestireno que varían en tamaño de 0,9  $\mu m$  a 22  $\mu m$ . En la figura 1.11 se presenta los resultados obtenidos por Davis en donde los datos se normalizaron dividiendo el tamaño de partícula por la distancia de separación de los postes. Los círculos huecos representan las partículas que fueron desplazadas lateralmente, mientras que los círculos solidos representan las partículas que no fueron desplazadas, se observó una clara separación de partículas y estos datos los comparó con un modelo parabólico. Con los datos de los experimentos encontró un mejor modelo de ajuste para el umbral crítico.

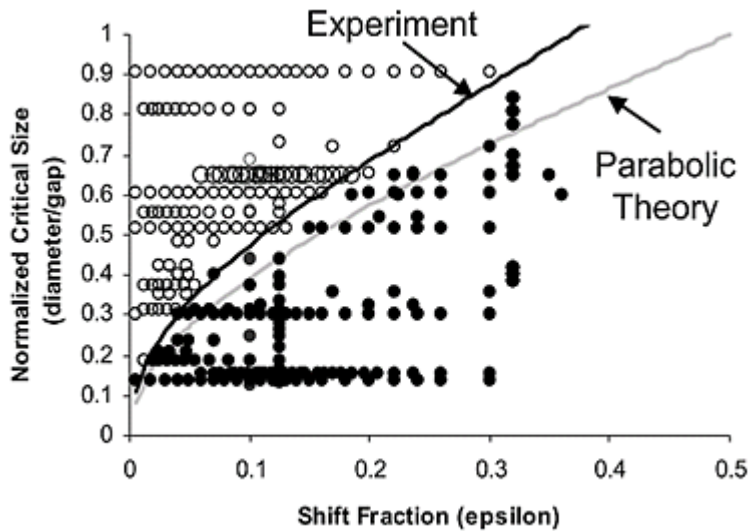


Figura 1.11 Datos experimentales obtenidos por Davis [38] para encontrar el diámetro crítico. Círculos huecos representa partículas desplazadas lateralmente y círculos solidos representa partículas que no se desplazaron lateralmente. Tomado de [36].

En base a los datos Davis [38] estableció la siguiente relación:

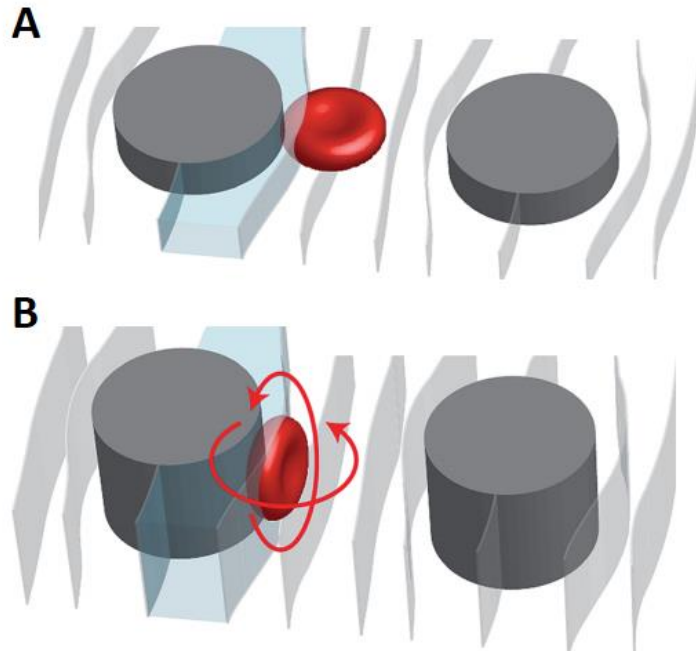
$$D_{C=} = 1.4 G \epsilon^{0.48} \quad (1.6)$$



Donde  $G$  es la distancia de separación de los postes, es decir  $G = \lambda - D_p$  y  $\varepsilon$  es la fracción de desplazamiento de la fila.

Otro factor que influye en el buen funcionamiento del método DLD es la altura de los postes, en particular en la separación de células por sus propiedades intrínsecas de deformación. Holm, et al [43], [44] demostraron que la profundidad del canal (altura de los postes) se puede utilizar para controlar la orientación de las partículas, y de esta forma acentuar las diferencias en la forma de las partículas a separar. Los autores diseñaron dispositivos con diferentes alturas ( $33\mu m$ ,  $26\mu m$ ,  $11\mu m$ ,  $9\mu m$ ,  $4\mu m$  y  $3.5\mu m$ ) encontrando que las células se orientaban de diferente forma, obteniendo así un diámetro efectivo para la separación. Los postes de mayor altura permiten que las partículas giren debido a fuerzas de corte y, como resultado son ordenados de acuerdo con su dimensión más pequeña (en los eritrocitos  $2.5\mu m$ ), (Figura 1.12A). Por consiguiente, los postes de menor altura ( $\sim 4\mu m$ ) maximizan el tamaño efectivo de la célula (Figura 1.12) esto por reducir la libertad de rotación de las mismas.

Los dispositivos microfluídicos que utilizan DLD generalmente tienen los siguientes componentes, una región de entrada que consiste en uno o varios canales donde la muestra se enfoca, una región en la cual se ubican la matriz de postes y una región de salida, para recuperar la muestra separada.



*Figura 1.12 Representación esquemática de la influencia de la profundidad en el diámetro efectivo de separación. A. En postes altos la célula se orienta de acuerdo con su espesor. B. En postes bajos la célula se orienta de acuerdo con su diámetro. Tomado de [44]*

Este método se ha implementado en la separación de células sanguíneas. Davis et al [41] diseñaron un dispositivo microfluídico que consta de una región de entrada con tres canales, uno para la entrada de la muestra y los otros dos para la entrada de tampón que permite enfocar la muestra; un canal principal con 13 regiones de postes con diámetro crítico decreciente y al finalizar el canal tres salidas, la salida uno para recuperar los eritrocitos y plaquetas, salidas dos y tres para recuperar las células blancas. (Figura 1.13).

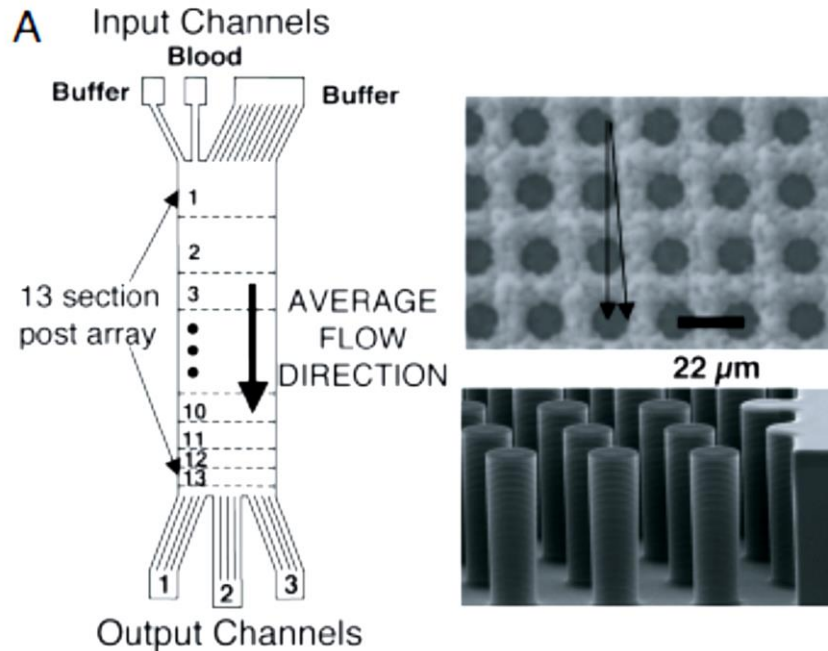


Figura 1.13 Dispositivo microfluídico diseñado por Davis et al. para separar glóbulos blancos de los glóbulos rojos y plaquetas. (Derecha) Micrografía de vista superior y transversal de postes. Tomado de [41]

Las células sanguíneas viajaron a una velocidad de  $1000 \mu\text{m/s}$  y el análisis de un microlitro de sangre se llevó a cabo en un período de 1 h. Los resultados en la separación de células mostraron que el 2% de total de los granulocitos se recuperaron en la salida de los eritrocitos. También se observó presencia de los eritrocitos en las salidas de las células blancas. En este trabajo los autores no realizaron análisis de eficiencia de separación y recuperación del dispositivo, de igual forma no se estudió la viabilidad celular [41].

Asimismo, Holmes et al. [45] diseñaron un dispositivo para la separación de células sanguíneas, el cual consta de tres canales: un pequeño canal cercano a la pared para la entrada de la muestra; dos canales para la entrada de tampón que permite enfocar la muestra cerca de la pared; un canal principal con múltiples regiones de postes con ángulo creciente; y tres salidas.

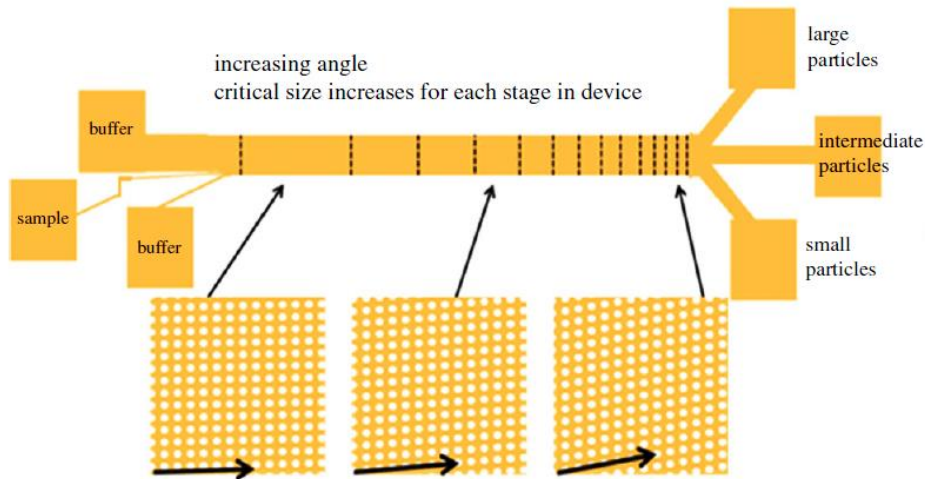


Figura 1.14 Dispositivo microfluídico diseñado por Holmes et al. para separar células sanguíneas. Tomado de [45]

En este trabajo los autores trataron químicamente (glutaraldehído) a los glóbulos rojos para alterar su deformabilidad de la membrana y de esta forma alterar el comportamiento hidrodinámico de las células en el dispositivo microfluídico. También se estudió el efecto de la velocidad de flujo en la separación de células, encontrando que a bajas velocidades de flujo las células blancas aumentan su desplazamiento lateral, es decir su separación es más significativa.

Otro dispositivo microfluídico utilizado en la separación de células sanguíneas fue publicado por Choi et al. [46] el cual consta de dos entradas, una entrada de muestra y otra entrada de tampón, un canal en forma de serpentin con arreglo de postes y un diámetro crítico de  $4.6 \mu m$ , y al final dos canales de salida con estructuras afiladas que permiten extraer mecánicamente componentes intracelulares (Figura 1.15)

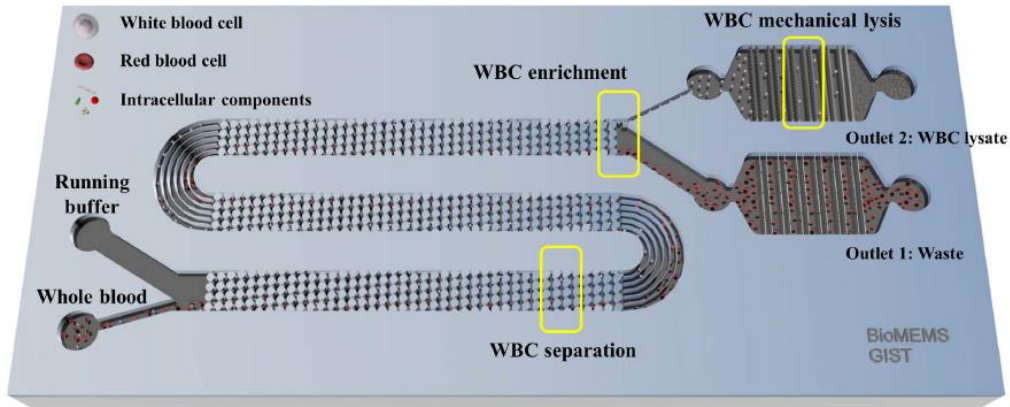


Figura 1.15 Dispositivo microflúidico diseñado por Choi et al. para separar células sanguíneas y posteriormente extraer componentes intracelulares. Tomado de [46]

En la separación de componentes sanguíneos en este dispositivo se obtuvo como resultado una eficiencia de separación  $\sim 98\%$  y una pureza máxima de  $72\%$ , sin embargo, por las dimensiones de los canales, la resistencia hidráulica era mayor a las usadas anteriormente [46].

Adicional a la separación de componentes sanguíneos y debido a que el método DLD considera la deformación de las partículas, se ha implementado en la separación de parásitos en sangre. Holm et al. [44] fabricaron un dispositivo microflúidico que permite separar parásitos de una muestra de sangre completa, su diseño se basa en una sola entrada, un canal con forma de serpentin con arreglo de postes, que se divide en tres regiones como se presenta en la figura 1.16. Cada región tiene diferentes características, la primera región tiene una altura de  $26 \mu m$  en la cual se espera que los eritrocitos se desplacen según su grosor, es decir se comporten como partículas de menor tamaño, en esta región el diámetro crítico era de  $7.1 \mu m$ . Por lo tanto, las células de tamaño mayor a  $7.1 \mu m$  (leucocitos) se desplazaron a través del arreglo de postes hacia la pared izquierda que conecta con la salida 1, por medio de canales paralelos de conexión. Debido a que los eritrocitos y parásitos son de menor tamaño se desplazan hacia la segunda región a través de canales paralelos de conexión. La segunda región tiene una altura de  $3,5 \mu m$  y un

diámetro crítico de  $3,5 \mu m$ ; el arreglo matricial está organizado para dirigir las partículas de mayor tamaño hacia las dos paredes del canal (Figura 1.16) en este caso y por la altura de la región, los eritrocitos se comportan como partículas de mayor tamaño. Luego que los eritrocitos y parásitos entran en la región tres, la cual tiene una altura de  $9 \mu m$  y un diámetro crítico de  $3.5 \mu m$ , el arreglo de postes desplaza los parásitos hacia el centro canal, el cual conecta con la salida tres. Debido a que los eritrocitos se organizan nuevamente según su grosor, se mueven cerca de las paredes del canal que conecta con la salida 2.

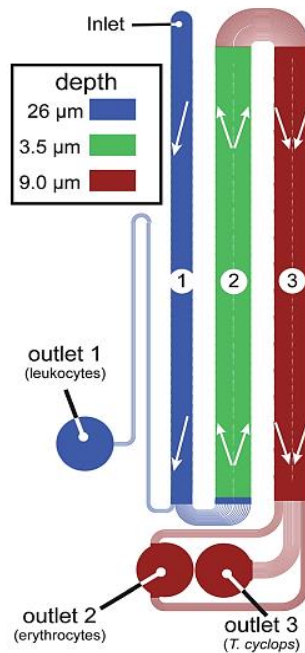


Figura 1.16 Dispositivo microfluídico diseñado por Holm et al, para separar parásitos *T. cyclops* de una muestra de sangre. Las flechas señalan la orientación de inclinación de los postes. Tomado de [44]

Este diseño permitió separar en base a la forma de las poblaciones, como resultado los autores obtuvieron una eficiencia de separación del parásito de 67.9% y aunque no es la óptima la implementación del dispositivo permitió establecer cómo las células sanguíneas se orientan en canales con diferentes alturas.



## 1.4 Justificación

Como se ha mencionado, la separación y clasificación de poblaciones de células a partir de una muestra heterogénea es fundamental para diversas aplicaciones, entre ellas la investigación biológica, el diagnóstico de enfermedades y la terapia celular. Las plataformas microfluídicas han surgido como una alternativa adicional a las metodologías utilizadas tradicionalmente para la separación de células. Ofrecen ventajas, como un consumo mínimo de muestra y reactivos; por las dimensiones de los canales, bajos costos de fabricación, tiempos cortos de operación y una alta automatización y paralelización.

En la actualidad existen dispositivos microfluídicos que implementan el método de desplazamiento lateral determinista (DLD) para separar células sanguíneas. Sin embargo, su operabilidad y eficiencia de separación no son las óptimas, debido a la necesidad de enfocar la muestra hidrodinámicamente, a través del uso de dos o más entradas. Adicionalmente, en los trabajos publicados no se evalúan todos los parámetros (pureza, recuperación y viabilidad) que influyen en la eficacia de los dispositivos.

En el presente trabajo se presenta un dispositivo microfluídico que permite un enfoque mecánico de la muestra sin el uso de dos o más presiones, permitiendo así una fácil manipulación y eficiente separación de células blancas.





# **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo General**

Diseñar, fabricar y caracterizar un dispositivo microfluídico que permita la separación de leucocitos usando el método desplazamiento lateral determinista (DLD) enfocando mecánicamente con una microestructura la muestra de sangre, facilitando así su operación.

## **2.2 Objetivos específicos**

1. Fabricar un dispositivo microfluídico que permita separar leucocitos de una muestra de sangre.
2. Caracterizar variables que afectan el funcionamiento del dispositivo (presión, flujo volumétrico, factor de dilución).
3. Validar el dispositivo, para la separación de células sanguíneas a diferentes factores de dilución.



# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 Diseño de dispositivo

El diseño del dispositivo microfluídico se realizó en el software AutoCAD (versión 2014, Autodesk Inc.) luego se exportó con extensión .DXF y se convirtió al formato .GDS utilizando KLayout (versión 0.23.9) con el fin que los diseños sean compatibles con el software del microgenerador de patrones ( $\mu$ PG 101, Heidelberg Instruments Inc., CA, USA), equipo usado para fabricar los moldes.

El diseño consiste en un canal recto de 4 cm de longitud y 0.3 cm de ancho (Figura 3.1), con una entrada que se bifurca a lo ancho del canal, generando que la muestra se enfoque hacia las paredes. El canal contiene un arreglo matricial de postes circulares de 20  $\mu$ m de diámetro, separados por una distancia de 18  $\mu$ m. Cada poste se encuentra desplazado hacia el centro del canal 2  $\mu$ m con respecto al centro de la fila anterior, los parámetros se presentan en Tabla 3.1. El final del canal se conecta con 32 canales paralelos en donde 15 canales conectan con la salida 1 (salida de leucocitos) y 17 canales conectan con la salida 2 (salida de eritrocitos).

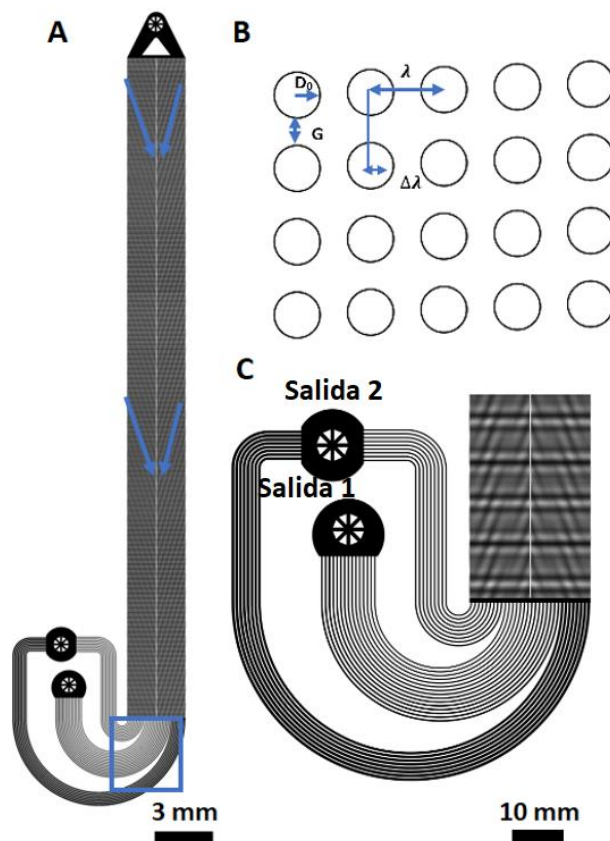


Figura 3.1. Diseño del dispositivo microfluídico. A) Diseño completo del dispositivo. B) Región de postes con parámetros que establecen el diámetro crítico. C) Canales paralelos de conexión con salida de leucocitos y eritrocitos.

Parámetros	
Longitud de canal principal	4 cm
Ancho de canal principal	0.3 cm
Diámetro de poste ( $D_0$ )	20 $\mu\text{m}$
Distancia poste-poste ( $\lambda$ )	38 $\mu\text{m}$
Desplazamiento de fila postes ( $\Delta\lambda$ )	2 $\mu\text{m}$
Distancia entre postes ( $G$ )	18 $\mu\text{m}$

Tabla 3.1 Parámetros del diseño considerados para el cálculo de diámetro crítico.

A partir de la ecuación 1.6 se calculó el diámetro crítico, obteniendo un valor de 6  $\mu\text{m}$ , es decir las células con diámetro mayor (leucocitos) al diámetro

crítico se desplazan lateralmente hacia la pared del centro del canal, que conecta con la salida de leucocitos a través de 15 canales paralelos. Por consiguiente, las células de menor tamaño al diámetro crítico (eritrocitos) se mueven constantemente cerca de las paredes del canal, este movimiento permanente se produce por el enfoque inicial de la muestra hacia las paredes a través de la bifurcación de la entrada y las estructuras geométricas. Las regiones cercanas a la pared se conectan a la salida de eritrocitos a través de 17 canales paralelos.

Para el efectivo funcionamiento del dispositivo microfluídico se debe considerar que los 32 canales de conexión tengan la misma resistencia hidráulica, la cual depende de las dimensiones de cada canal. Por lo tanto, se inició graficando uno de los canales estableciendo así la longitud (7,040.012  $\mu\text{m}$ ) y el ancho (35  $\mu\text{m}$ ) y usando estas dimensiones se calculó la resistencia (ecuación 3.1 tomada de [47]) para canales con sección transversal rectangular, obteniendo un valor de  $3.38 \times 10^{14} \text{ Pa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$ .

$$R_h = \frac{12\eta L}{h^3 w \left[1 - 0.63 \frac{h}{w}\right]} \quad (3.1)$$

Con la ecuación anterior se despeja  $w$  en términos de la resistencia (constante) y de la longitud de cada canal (medida en AutoCAD) obteniendo así el valor del ancho de cada canal (ecuación 3.2)

$$w = \frac{12\eta L}{R_h h^3} + 0.63 h \quad (3.2)$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad del fluido,  $L$  es la longitud del canal de conexión,  $h$  es la altura y  $R_h$  la resistencia hidráulica. En la Tabla 3.2 se presenta los valores de los 32 canales de conexión con diferentes anchos y longitudes con los cuales se establece una resistencia constante de  $3.38 \times 10^{14} \text{ Pa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$ .

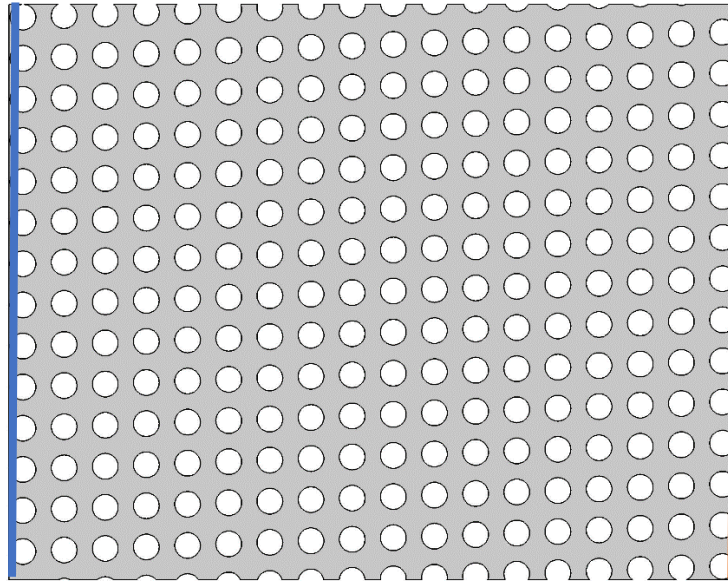
Canal	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Canal	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Longitud ( $\mu\text{m}$ )
1	35	7040.012	17	39.21	8484.7992
2	35.44	7190.8084	18	40.09	8786.3921
3	35.88	7341.6049	19	40.97	9087.985
4	36.32	7492.4013	20	41.85	9389.5778
5	36.76	7643.1978	21	42.72	9691.1707
6	37.2	7793.9942	22	43.6	9992.7636
7	37.64	7944.7907	23	44.48	10294.3565
8	38.08	8095.5871	24	45.36	10595.9494
9	38.51	8246.3836	25	63.05	16627.2486
10	33.06	6373.6489	26	64.37	17079.6369
11	33.94	6675.2418	27	65.68	17532.0253
12	34.82	6976.8347	28	67	17984.4137
13	35.69	7278.4276	29	68.32	18436.8021
14	36.57	7580.0205	30	69.64	18889.1906
15	37.45	7881.6134	31	70.96	19341.5791
16	38.33	8183.2063	32	72.27	19793.9677

*Tabla 3.2 Canales de conexión con diferentes dimensiones que establecen una resistencia constante.*

## 3.2 Simulación del sistema

Se estudió el efecto de los parámetros ( $D_0$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $G$ ) establecidos en la matriz de postes realizando simulaciones con el software de análisis y resolución por elementos finitos COMSOL Multiphysics 5.2.

Las simulaciones se llevaron a cabo usando un modelo 2D del arreglo matricial de postes (Figura 3.2), el cual se diseñó en el software Autodesk AutoCAD 2014 y se guardó con extensión .DXF para luego ser importado a COMSOL. Se utilizó el módulo de flujo laminar para simular el sistema, el cual usa las ecuaciones de Navier-Stokes para fluidos incompresibles.



*Figura 3.2 Diseño implementado para simulaciones de líneas de flujo y perfil de velocidad. La línea azul y naranja representa la entrada y la salida respectivamente.*

En el software se determinaron parámetros iniciales como propiedades del fluido (viscosidad dinámica 0.001 Pa·s y densidad del agua 1.000 kg/m<sup>3</sup>). La presión de entrada del agua se estableció a 1 psi y la presión de salida a 0 psi.

El modelo simulado es una pequeña región del arreglo matricial de postes implementado en el diseño del dispositivo microfluídico, en el software COMSOL Multiphysics 5.2. Se evaluó el efecto de los parámetros usados en el diseño como por ejemplo el diámetro del poste, la separación de poste-poste y el desplazamiento de cada fila. El análisis se llevó a cabo realizando gráficas de perfil de velocidad y líneas de flujo, variables que afectan el desplazamiento de las células.

### **3.3 Fabricación de dispositivos**

La fabricación del dispositivo microfluídico se realizó empleando técnicas de fotolitografía y litografía suave. La técnica de fotolitografía consiste en grabar



estructuras con luz UV en un sustrato recubierto con un material fotosensible para luego utilizarlo como un molde maestro [42]. Por otro lado, la litografía suave es el “estampado” de ese molde en un material de elastómero “suave”, el más utilizado es el polidimetilsiloxano (PDMS) [43]. El proceso de fabricación se realizó dentro de un cuarto limpio que evita que el polvo u otras partículas se encuentren en las micro estructuras.

### **3.3.1 Fabricación del molde**

El molde se fabricó en obleas de silicio de 10 cm de diámetro (Desert Silicon Inc., Tempe, AZ, USA). Inicialmente se realizó tratamiento a la oblea con plasma de oxígeno por 10 minutos en un limpiador de plasma (Zepto, Diener Electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Germany), con el fin de remover partículas sobre la superficie de la oblea y cambiar las propiedades químicas. Luego la oblea se colocó en un spin coater (SCS 6800 Spin Coater Series, Specialty Coating Systems, Inc., Indianapolis, Indiana, USA) programado previamente con parámetros como tiempo de duración, rampa (tiempo que toma en alcanzar la velocidad programada) y velocidad de giro en revoluciones por minuto (rpm), estos parámetros establecen el espesor que tendrá la capa. En particular, para que el molde tenga una altura  $\sim 23 \mu\text{m}$  se llevó a cabo el siguiente protocolo: Se coloca la oblea de silicio en el spin coater, luego se vierte fotorresina negativa GM-1060 (Gersteltec Sarl, Pully, Lausanne, Switzerland) sobre la oblea.

Se acciona el spin coater con parámetros previamente establecidos, velocidad de giro 900 revoluciones por minuto (rpm) durante 40 s con una rampa de 9 s; luego, se lleva a 0 rpm con una rampa de 9 s. Se retira del spin coater y se deja en relajación durante 30 minutos en una caja de Petri.

Se realiza un proceso pre-cocido colocando la oblea sobre una plancha (PC-420D, Corning Inc., NY, USA) a 50°C y se aumenta 5°C cada dos minutos hasta alcanzar 65 °C. Luego se deja en 65°C durante 4 minutos. Se aumenta a 70°C

y 5°C cada 2 minutos hasta alcanzar una temperatura de 95°C. Finalmente se mantiene a 95°C durante 28 minutos.

El siguiente paso es la exposición del diseño el cual se guardó en formato GDS. Se utilizó el equipo micro pattern generator ( $\mu$ PG 101, Heidelberg Instruments Inc., CA, USA) el cual tiene un láser de 70 mW con una longitud de onda de 377 nm (radiación UVA). El láser incide sobre la fotorresina trazando el diseño, al incidir la luz UV sobre la resina se empieza con el proceso de polimerización. En el equipo se puede establecer parámetros como la cantidad de energía que se encuentra en el rango de 10 mW a 70 mW y el porcentaje de energía (5 a 100%).

La oblea con resina GM1060 se expuso utilizando el cabezal de 4mm con los parámetros de 70mW al 90% con el fin de obtener estructuras de 23  $\mu$ m de alto. Posterior a la exposición, la fotorresina es sometida al postcoccido, que consiste en calentar la oblea de la misma forma que en el precoccido. El paso siguiente fue revelar las estructuras sumergiendo la oblea en PGMEA (Propylene glycol monomethyl ether acetate, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Este agente revelador disuelve la fotorresina no expuesta, permitiendo así distinguir las estructuras polimerizadas. Luego se enjuaga con alcohol isopropílico (IPA) (Isopropyl alcohol lot. 759, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) para detener la reacción y se revisa con un estereomicroscopio (Stemi DV4, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Turingia, Germany) que la fotorresina no expuesta se haya eliminado completamente.

Seguido de esto, se realizó un proceso denominado hard-bake el cual aumenta la resistencia mecánica y química de las estructuras y consiste en poner el molde en el horno a 135 °C durante 2 horas. Al finalizar se colocó el molde dentro de un contenedor cerrado y se aplica 400  $\mu$ l de clorotrimetilsilano (Chlorotrimethylsilane Lot. SHBG2552V, Sigma-Aldrich Co, USA.) durante 30 minutos. Esta solución se adhiere a la superficie de la oblea, evitando la unión del PDMS a las estructuras.

### **3.3.2 Fabricación de dispositivos de PDMS**

Una vez se tiene el molde maestro, se procede a realizar las réplicas del dispositivo. Las réplicas se fabrican de polímero y consiste en hacer una mezcla de pre-polímero de polidimetil siloxano (PDMS) y agente curador (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation) en relación 10:1 es decir, se mezcla diez partes de pre-polímero y una de agente curador.

Para la fabricación de réplicas de PDMS se inició colocando el molde en una caja Petri, previamente cubierta de papel aluminio. Luego se prepara la mezcla de pre-polímero y agente curador. Para ello se pesa 50 gramos de PDMS y 5 gramos de agente curador, se mezclan usando una centrifuga planetaria (AR-100, Thinky USA Inc.). Se vierte la mezcla sobre el molde y se desgasifica colocándolo en una cámara de vacío por 15 minutos, esto para asegurar que no queden atrapadas burbujas de aire entre las estructuras del molde. Posteriormente se introduce al horno (UF55, Memmert GmbH + Co. KG) por una hora a 80°C para que se polimerice el PDMS.

Seguido de esto se desprende el PDMS del molde, se cortan los dispositivos con una navaja y se hacen perforaciones en las entradas y salidas con una prensa (MP10-UNV, SCHMIDT Technology Corporation, Cranberry Twp., PA, USA). Luego de obtener los dispositivos de PDMS, se procede a pegarlos en un portaobjetos. Este proceso consiste en introducir el dispositivo y el portaobjetos en un plasma cleaner el cual trata las superficies con plasma de oxígeno por 90 segundos. Al finalizar este proceso se ponen en contacto las superficies, para esto el PDMS se deja caer “por su peso” sobre el portaobjetos evitando que queden burbujas de aire en la superficie.

### **3.4 Metodología experimental**

Se realizaron una serie de experimentos con el fin de caracterizar el funcionamiento del dispositivo. Primeramente, se comprobó que la resistencia de los canales de conexión fuera las misma. Para esto se inyectó colorante y se midió el flujo volumétrico en ambas salidas. Además, se determinó la

variación del flujo volumétrico en el tiempo, para analizar como las fluctuaciones en la presión de entrada afecta el funcionamiento del dispositivo; esto se realizó inyectando colorante y de igual forma para sangre diluida. Luego de caracterizar el sistema se procedió a separar células sanguíneas inyectando sangre diluida, seguido de esto se recuperó en las salidas las muestras separadas y se procedió a marcarlas y fijarlas para un posterior análisis por citometría de flujo.

### **3.4.1 Caracterización de dispositivo microfluídico**

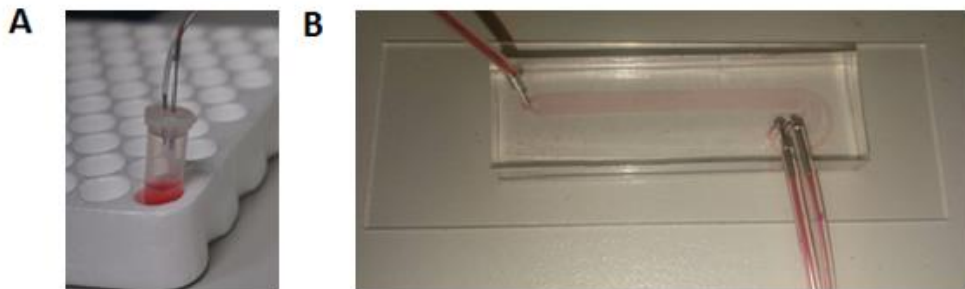
En todos los experimentos para la introducción de las soluciones, se usó un compresor de aire (Sprayit SP94002) conectado a un tablero de control, el cual incluye reguladores para controlar la presión, manómetros que mide la presión de la muestra inyectada y válvulas externas para cerrar y abrir la entrada de aire. Cada válvula se conecta a un tubo eppendorf que contiene la muestra, a través de tubos Tygon, de esta forma la muestra se presuriza y se genera un flujo volumétrico constante hacia el dispositivo.

Para analizar como el flujo volumétrico y la resistencia hidráulica afecta el funcionamiento del dispositivo, se realizaron experimentos inyectando agua con colorante líquido de color rojo (McCormick, colorante vegetal), a diferentes presiones. El experimento consistió en inyectar colorante y medir en las salidas el flujo volumétrico en el tiempo, para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Se inyecta al dispositivo agua Milli-Q a una presión de 2 psi con el fin de eliminar basuras presentes en el canal.
2. Se cierran las salidas para eliminar burbujas de aire.
3. Luego de eliminar las burbujas de aire se abren las salidas.
4. Se inyecta colorante al dispositivo a través de un tubo eppendorf presurizado a diferentes presiones (1psi, 2psi y 3psi).
5. Las dos salidas se conectan a tubos Tygon en donde se mide el flujo durante 40 minutos en 8 intervalos.

De igual forma se midió el flujo volumétrico en el tiempo cuando se inyecta una muestra de sangre diluida, para este experimento se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se inyecta tampón de fosfato 1x (PBS) (Sigma-Aldrich Co, Lot # SLBK 1358 V, USA.) a una presión de 2 psi, para eliminar basuras que se encuentren dentro del canal.
2. Se fluye Plurónico al 2% (Sigma-Aldrich Co, Lot # SLBG6026V USA.) durante 1 hora, para bloquear la superficie y evitar la adhesión de células.
3. Se cierran las salidas para tratar toda la superficie con plurónico.
4. Se abren las salidas y se lava con tampón de fosfato 1x (PBS) a una presión de 1 psi.
5. Se inyecta la muestra de sangre diluida ( $50 \mu\text{L}$  de sangre en  $950 \mu\text{L}$  de PBS) por medio de un tubo eppendorf (Figura 3.3A.) presurizado a diferentes presiones (1 psi, 2 psi y 3 psi).
6. Las salidas se conectan a tubos Tygon (Figura 3.3 B.) en donde se mide el flujo durante 40 minutos en 8 intervalos.



*Figura 3.3 Fotografías del diseño experimental. A) Eppendorf modificado para la inyección de la muestra B) Dispositivo microfluídico con tubos Tygon conectado a las salidas.*

### **3.4.2 Separación de leucocitos**

Para los experimentos de separación de células se inyectó tampón de fosfato 1x (PBS) (Sigma-Aldrich Co.) a una presión de 2 psi, para eliminar

basuras que se encuentren dentro del canal y adicionalmente se cerró las salidas del dispositivo con el fin de eliminar burbujas de aire. Luego se fluyó Plurónico al 2% (Sigma-Aldrich Co.) durante 1 hora, con el fin de bloquear la superficie y evitar la adhesión de células. Mientras transcurría este proceso se preparó las muestras iniciales de sangre a diferentes factores de dilución, la primera consta de 50  $\mu\text{L}$  de sangre diluida en 950  $\mu\text{L}$  de PBS y 1.5  $\mu\text{L}$  de colorante Hoechst (el cual tiñe los núcleos). La segunda consta de 100  $\mu\text{L}$  de sangre diluida en 900  $\mu\text{L}$  de PBS y 1.5  $\mu\text{L}$  de colorante Hoechst. Luego de finalizado el tiempo se lavó las estructuras con tampón de fosfato 1x (PBS) a una presión de 1 psi.

Al culminar el proceso de tratamiento de las superficies se realizó el experimento. En la primera etapa de experimentos se inyecta la muestra de sangre diluida (1:20) a diferentes flujos volumétricos 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  y 9  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Las salidas se conectaron previamente con tubos Tygon hacia eppendorf, en donde se recupera la muestra y posteriormente se toman 10  $\mu\text{L}$  para realizar el conteo de células por medio de un hemocitómetro.

En la segunda etapa de experimentos se inyecta la muestra de sangre a diferentes factores de dilución (1:10 o 1:20) a un flujo volumétrico 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ , luego se recupera la muestra en los tubos eppendorf para marcar, fijar y analizar por citometría de flujo.

### **3.4.3 Marcaje y fijación de muestras**

Luego de pasar la muestra de sangre por el dispositivo microfluídico y recuperar en las salidas leucocitos y eritrocitos, se procedió a marcar con calceína y homodímero-1 de etidio (kit de viabilidad). Luego se fijaron para un posterior análisis por citometría de flujo.

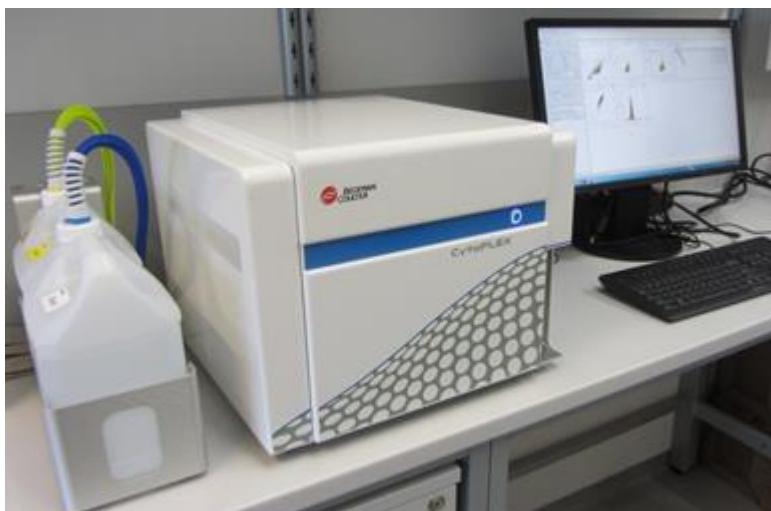
Para llevar a cabo este proceso, inicialmente se preparó la muestra para tinción, la cual consta de 300  $\mu\text{L}$  de PBS, 2  $\mu\text{L}$  calceína y 6  $\mu\text{L}$  de homodímero-1 de etidio (Viability/Cytotoxicity Kit, Thermo Fisher, USA L3224). Luego se agregó a cada tubo (muestra recuperada) 48  $\mu\text{L}$  de dicha solución. Se incubó

por 15 minutos y se lavó posteriormente con 1 mL de PBS. Seguido de esto, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se fijaron las muestras agregando 100  $\mu$ L de formalina (Formalin Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA SLBH 1382V) la cual se incubó durante 10 minutos. Se lavó con 1mL de PBS para posteriormente centrifugar (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Germany) la muestra a 1500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Al finalizar el proceso se suspende la muestra en 100  $\mu$ L de PBS.

#### **3.4.4 Análisis por citometría de flujo**

Las muestras fijadas se analizaron por citometría de flujo usando el equipo CytoFLEX S Beckman coulter (Figura 3.4). La muestra fluyó por los detectores a un flujo volumétrico de 10  $\mu$ L/min, el tiempo de lectura fue de 60 segundos, por lo tanto, el volumen analizado fue 10  $\mu$ L.

Para el uso del equipo se realizó un primer paso de lavado, que consistió en fluir cloro durante 2 minutos, luego se fluyó agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente en el software del equipo (CytExpert) se crea una carpeta “nuevo experimento” esto crea un archivo con extensión .xit y una carpeta con el mismo nombre del archivo donde se guardan los datos sin procesar (archivos. fcs).



*Figura 3.4 Fotografía del equipo de citometría (CytoFLEX) usado para análisis de muestras recuperadas.*

En el software del equipo se estableció los fluorocromos que se leerán según su longitud de onda, en particular las muestras recuperadas se marcaron con Hoechst, calceína y homodímero-1 de etidio (kit de viabilidad Thermo Fisher Scientific) los filtros usados para la lectura de la muestra se presentan en la tabla 3.3.

<b>Excitación</b> <b>n</b>	<b>Emisión</b> <b>n</b>	<b>Nombre del canal</b> <b>CytoFLEX</b>	<b>Marcadores</b> <b>fluorescentes</b>
488 nm	578 nm	PE-A	Homodimero de etidio
488 nm	519 nm	FITC	Calceína
405 nm	455 nm	PB450	Hoechst

*Tabla 3.3 Canales con excitación y emisión en CytoFLEX para análisis de las muestras.*

Para la adquisición de datos se crea un archivo por cada muestra, se despliega ventanas para las gráficas de punto de tamaño versus granularidad, PB450 versus FITC y finalmente FITC versus PE.



El análisis de las muestras recuperadas en las salidas del dispositivo se inició con la lectura de los controles positivos y negativos que consisten en: a) Tubo de sangre diluida sin marcar. b) Tubo de sangre diluida marcada con Calceína. c) Tubo de sangre diluida marcada con Homodimero- etidio. d) Tubo de sangre diluida marcada con Hoechst.

Cabe señalar que los experimentos de separación de células sanguíneas se realizaron para muestras diluidas a diferentes factores de dilución (1:10 y 1:20) y para hacer análisis estadístico se hicieron tres experimentos por cada factor.

Para realizar estudios de eficiencia de separación, pureza y recuperación del dispositivo microfluídico, se analizaron las siguientes muestras:

1. Muestra de sangre diluida que se inyecta en la entrada del dispositivo para su posterior separación (muestra inicial).
2. Muestra obtenida después de la separación, recuperada en la salida de eritrocitos
3. Muestra obtenida después de la separación, recuperada en la salida de leucocitos.

Al finalizar la lectura de las muestras se procedió a limpiar el citómetro haciendo fluir cloro durante 2 minutos, seguido de esto se fluyó agua destilada durante 5 minutos. Con los datos adquiridos se analizaron gráficas en el software Kaluza (CytExpert Software for CytoFLEX, USA) para luego presentar en gráficos estadísticos.

Para evaluar la eficiencia de los diferentes métodos de separación se evalúan parámetros como pureza, recuperación y viabilidad celular. La pureza permite establecer el porcentaje de células no deseadas que entra en cada una de las salidas y se calcula como el número de leucocitos (WBCs) recolectados en la salida 1 sobre el número total de células encontradas (leucocitos y eritrocitos), la relación se presenta en la ecuación de a continuación [3].

$$P = \frac{\text{WBCs en la salida 1}}{\text{total de células en la salida}} \times 100\% \quad (3.3)$$

La recuperación se usa generalmente para describir el porcentaje de células que se obtienen después de la separación en comparación con el número de células originales en la suspensión original, se define como [3]:

$$R = \frac{WBCs \text{ en la salida } 1}{WBCs \text{ iniciales}} \times 100\% \quad (3.4)$$

La viabilidad celular es un parámetro importante debido a que un dispositivo de separación que no obtiene células vivas tiene poco valor cuando la aplicación es biológica. Para evaluar este parámetro se utiliza diferentes marcadores fluorescentes que permiten establecer el daño a la membrana.



# 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Simulaciones

De manera que se pueda verificar el funcionamiento del dispositivo microfluídico, se realizaron simulaciones de un sistema más sencillo, en este caso una pequeña región del canal principal. El diseño simulado es una región de  $532\ \mu\text{m} \times 660\ \mu\text{m}$  del arreglo matricial de postes del canal principal, las dimensiones que se consideraron en las simulaciones fueron postes circulares de diámetro  $20\ \mu\text{m}$ , separados por una distancia de  $18\ \mu\text{m}$ . Cada poste se encuentra desplazado hacia el centro del canal  $2\ \mu\text{m}$  con respecto al centro de la fila anterior.

En la simulación la entrada del fluido (agua) se localizó en la pared izquierda a una presión de 1 psi y la salida en la pared derecha a una presión de 0 psi. Se obtuvieron gráficas de perfil de velocidad y líneas de flujo a lo largo del arreglo matricial. En la figura 4.1A se muestra el campo de velocidades del flujo, se puede observar que los postes crean regiones donde el movimiento del fluido es lento (azul) cerca de las paredes de los postes y la velocidad más alta (rojo) se centra entre los huecos de los postes, confirmando un perfil de velocidad parabólico a través de la separación. Como los postes están separados simétricamente, es decir la separación entre los postes horizontales y verticales es la misma ( $18\ \mu\text{m}$ ), genera un diámetro crítico uniforme. Por el contrario, cuando los postes se separan asimétricamente, es decir se reduce la distancia vertical de separación de los postes ( $9\ \mu\text{m}$ ) se observa un campo de velocidad de menor magnitud (Figura 4.1B), por lo tanto, aumenta las regiones donde el movimiento del fluido es lento (azul). En consecuencia, en el diseño se implementó matrices de postes simétricos (Figura 4.1A) pues se obtiene una menor resistencia hidráulica que con la geometría asimétrica, debido que en la geometría asimétrica aumenta el número de postes. Esto ocasiona que al usar

el sistema microfluídico la muestra se inyecte a bajos flujos volumétricos y de esta forma se reduce el posible daño a las células por el estrés de corte.

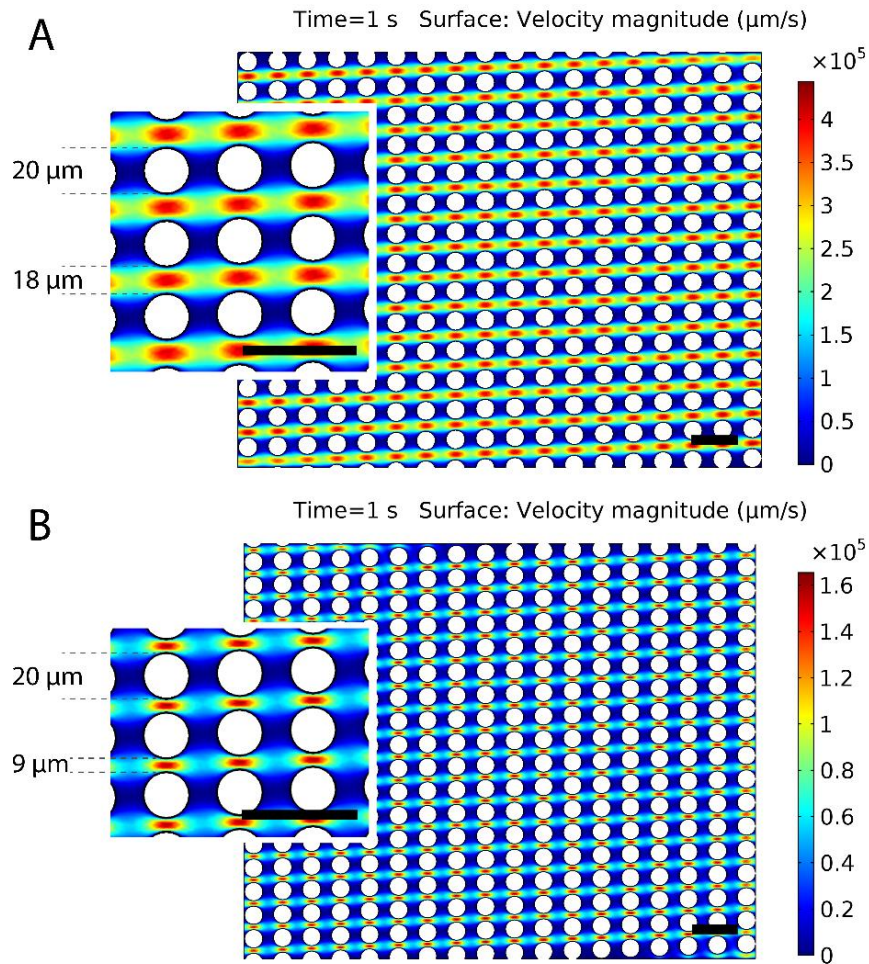


Figura 4.1 Simulación de campo de velocidad en el arreglo de postes. A) Geometría simétrica. B) Geometría asimétrica. (barra de escala equivale a 50  $\mu\text{m}$ )

De igual forma, se simuló las líneas de flujo en la región de postes, ésta variable es fundamental para el funcionamiento del método de desplazamiento lateral, debido a que la trayectoria que seguirá cada célula dependerá de la deformación de las líneas de flujo.

En la figura 4.2 se observan las líneas de flujo en el arreglo matricial de postes. Se puede ver como las líneas más cercanas a la pared del poste pasan por el espacio de separación de la siguiente fila de postes (señalada con flecha

roja). Igualmente se visualiza como las otras líneas de flujo siguen la inclinación de los postes (señalada con flecha verde). Como las células se mueven siguiendo las líneas de flujo, las de menor tamaño se encontrarán más cerca de la pared del poste, por lo tanto, se moverán en zigzag. Mientras que las células de mayor tamaño seguirán las líneas flujo que siguen la inclinación de los postes (la inclinación del poste llega al centro del canal), es decir se desplazarán lateralmente a lo largo de la matriz de postes.

Time=1 s Streamline: Velocity field

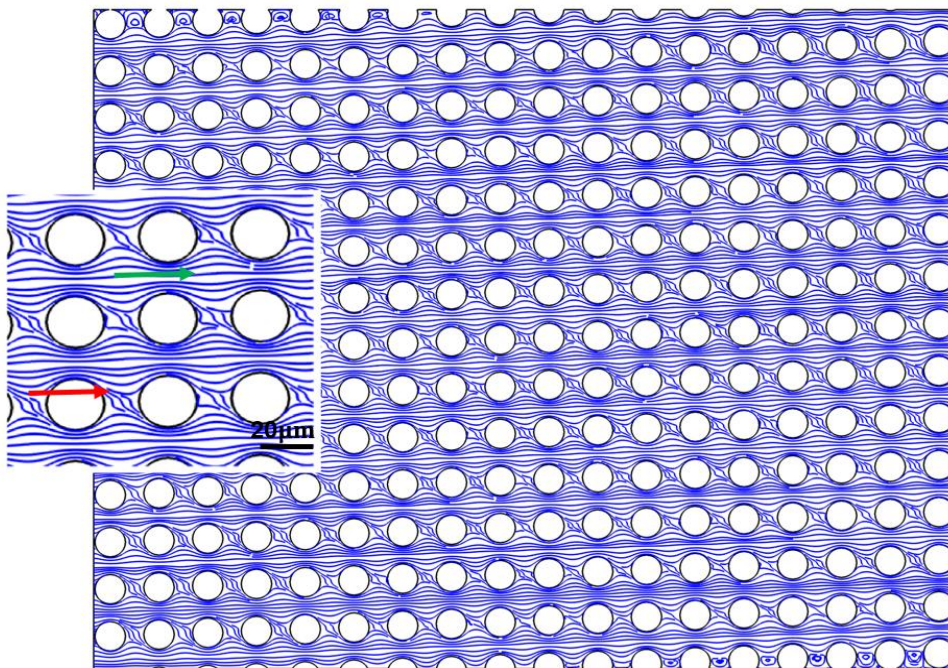


Figura 4.2 Simulación de líneas de flujo en región de postes.

## 4.2 Pruebas de energía

Durante la fabricación del molde del dispositivo microfluídico se observó que el tamaño de los postes se reduce significativamente, esto se debe a excesos de energía durante el proceso de exposición. Los parámetros del láser utilizado fueron de 70mW a un porcentaje de energía del 90% (Figura 4.3A). Como el diámetro del poste es una variable que afecta el funcionamiento del



método de separación DLD, se realizaron pruebas de energía con el fin de establecer parámetros (energía y el porcentaje) necesarios para que las dimensiones de las estructuras no se reduzcan.

El equipo  $\mu$ PG permite elegir la cantidad de energía (10 a 70 mW) y el porcentaje de energía (5 a 100%), por lo tanto, se expuso un diseño que consta de un arreglo matricial de postes de diámetro de 20  $\mu$ m. En el equipo se programó una serie donde se exponen varios diseños, variando la potencia desde 50 mW hasta 70 mW y el porcentaje de energía desde 50% a 100%, con el fin de encontrar los parámetros efectivos para obtener un poste con diámetro de 20  $\mu$ m. Esto mismo se realizó pasando el láser dos veces. Algunos resultados obtenidos, muestran disminución en el diámetro del poste y desprendimiento de estructuras, por ejemplo, al usar una potencia de 60 mW al 90% (Figura 4.3B).

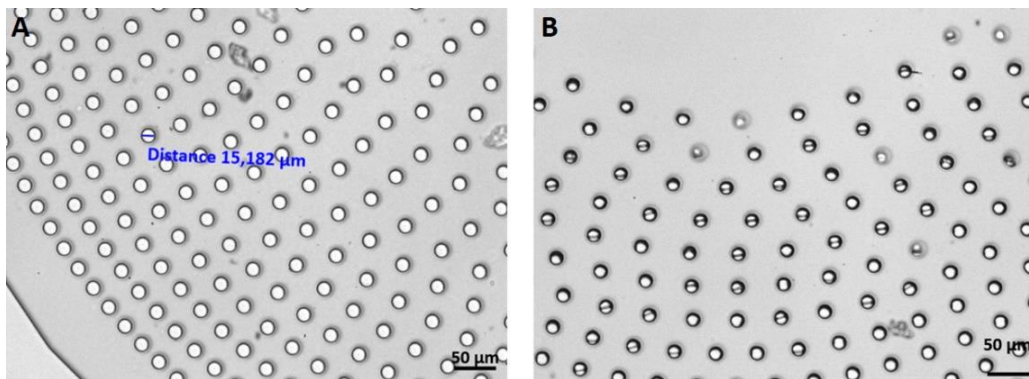
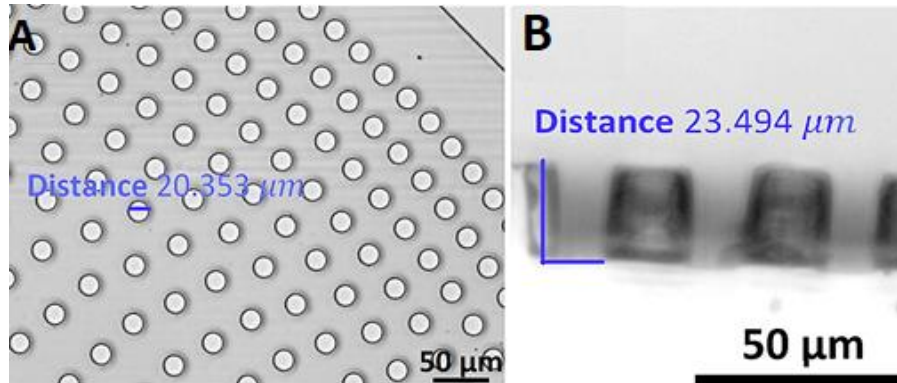


Figura 4.3 Micrografías de pruebas de exposición. A. Parámetros de 70mW al 90%. B. Parámetros de 60 mW al 90%.

Para obtener un poste de diámetro de  $\sim 20 \mu$ m, según las pruebas de energía se debe usar el láser a una potencia de 60 mW a un porcentaje de energía de 50% (Figura 4.4A). Adicionalmente, se realizó un corte transversal de las estructuras, con el fin de observar el perfil del poste y la altura obtenida según el protocolo implementado. En la figura 4.4B se muestra la altura de los

postes y del canal, señalando que el resultado fue el esperado ( $23\mu\text{m}$ ) y la forma del poste es recta.



*Figura 4.4 Micrografías de pruebas de exposición parámetros de 60mW al 50%. A. Micrografía superior B. Micrografía de corte transversal de región de postes.*

### 4.3 Medidas del dispositivo

En la figura 4.5A se presenta mosaicos del dispositivo completo fabricado en polidimetilsiloxano (PDMS), donde se puede visualizar el canal principal con su entrada, los canales de conexión y las dos salidas. Adicionalmente se midieron las estructuras con el fin de revisar que sean las adecuadas para el correcto funcionamiento del dispositivo microfluídico.

El diámetro de los postes obtenido según el protocolo implementado fue de  $20\mu\text{m}$  como se puede observar en la figura 4.5B. La altura del dispositivo se midió realizando un corte transversal a diferentes secciones, debido a que la altura a lo largo del dispositivo no cambia, se presenta en la figura 4.5C la altura de los canales que conectan hacia las salidas.

La altura obtenida fue de  $23.4\mu\text{m}$  (Figura 4.5C), la deseada para controlar la orientación de las células (según lo reportado por Holm [41,42]), acentuando diferencias en la forma de cada población celular. Esta altura permite que las células giren debido a fuerzas de corte y, como resultado los eritrocitos son ordenados de acuerdo con su dimensión más pequeña, es decir, se organizan según su espesor  $2.5\mu\text{m}$ . Mientras que las células blancas por su forma se orientan con dimensiones



mayores a  $7\ \mu\text{m}$ , por esta razón se puede establecer diferencias significativas en el tamaño de las poblaciones celulares.

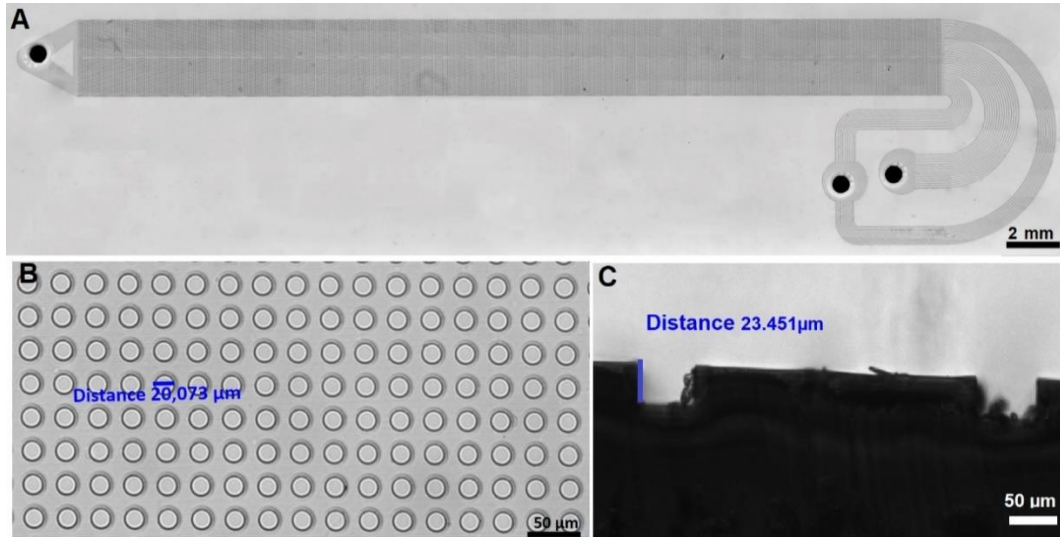


Figura 4.5 Micrográficas del dispositivo, A) Mosaico completo del dispositivo. B) Vista superior de región de postes C) Corte transversal de los canales paralelos.

#### 4.4 Caracterización de dispositivo microfluídico

Inicialmente se comprobó que la resistencia de los canales de conexión fuera la misma, debido a que este parámetro afecta el movimiento de las células dentro del dispositivo. Para esto se inyectó agua con colorante a una presión de 1 psi, las salidas se conectaron a tubos Tygon en donde se midió el fluido desplazado. Con la medición del fluido desplazado y el tiempo, se calculó la velocidad; a partir de estos datos y teniendo en cuenta el diámetro de los tubos Tygon ( $508\ \mu\text{m}$ ) se calculó el flujo volumétrico. En la figura 4.6 se presenta la variación del flujo volumétrico en el tiempo, en la salida de leucocitos (salida 1) y en la salida de eritrocitos (salida 2). Se puede observar que la diferencia es de  $\sim 0,1\ \mu\text{m}/\text{min}$  en los flujos volumétricos obtenidos, esto implica que la resistencia de los 32 canales de conexión es casi idéntica.

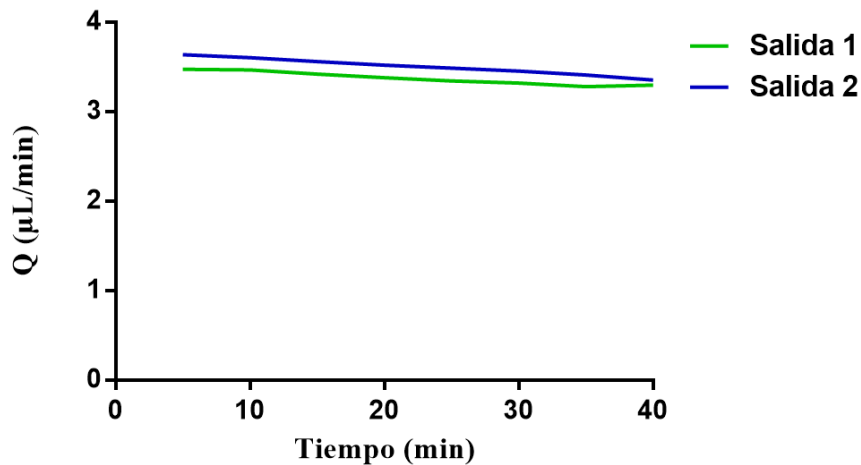


Figura 4.6 Caracterización del flujo volumétrico en la salida 1 y en la salida de 2.

Posteriormente se determinó la variación del flujo volumétrico en el tiempo, para analizar cómo las fluctuaciones en la presión de entrada afecta el funcionamiento del dispositivo. Para esto se inyectó agua con colorante rojo, debido a que esta solución fue filtrada previamente no posee ningún tipo de partículas que produzca oclusión en regiones del dispositivo. En la figura 4.7A se muestra la variación del flujo volumétrico en el tiempo para tres diferentes experimentos, cuando se inyecta agua con colorante. Cuando se inyecta la muestra a presiones de 1 psi, 2 psi y 3 psi la variación del flujo volumétrico en el tiempo fue de aproximadamente  $0.5 \mu\text{m}/\text{min}$ . Esto implica que la presión de la entrada de la muestra tiende a ser constante. Las barras de error se relacionan con la presencia de basura dentro de los canales microfluídicos.

Cuando se inyecta una muestra de sangre diluida (1:20) al dispositivo a presiones de 1 psi y 2 psi, se observa que la variación del flujo volumétrico en el tiempo incrementa a  $0.7 \mu\text{m}/\text{min}$  (Figura 4.7B). Sin embargo, al inyectar la muestra a una presión de 3 psi se observa a partir de los 20 minutos una disminución del flujo volumétrico, esto se puede atribuir al aumento de la resistencia del canal causado por la obstrucción de regiones en el dispositivo, debido al aumento de células que entran al dispositivo microfluídico, esto se puede solucionar con un filtro en la entrada de la muestra.

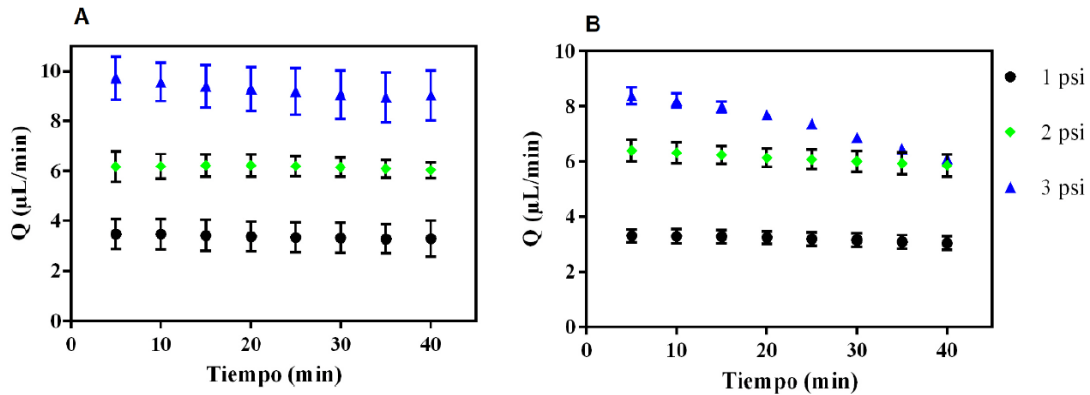


Figura 4.7 Caracterización del flujo volumétrico A) Inyectando agua con colorante. B) Inyectando muestra de sangre diluida en PBS 1X (1:20).

## 4.5 Separación de Leucocitos

En los experimentos de separación de leucocitos se inyectó la muestra de sangre diluida en PBS (1:20 o 1:10) por medio de un tubo Eppendorf presurizado a 1 psi. Durante los experimentos se observó que las células se enfocaron hacia las paredes del canal principal debido a la bifurcación de la entrada y al enfoque mecánico realizado por la estructura triangular, esta orientación mecánica evita el uso de dos o más entradas de tampón para enfocar hidrodinámicamente la muestra. Los eritrocitos a lo largo del canal microfluídico se desplazan cerca a la pared, debido a que se orientaron según su espesor, es decir se comportan como partículas de menor tamaño [41]. En la figura 4.8 se observa que los eritrocitos se encuentran en regiones cercanas a la pared, que conectan con la salida 2 (salida de eritrocitos) a través de canales de conexión.

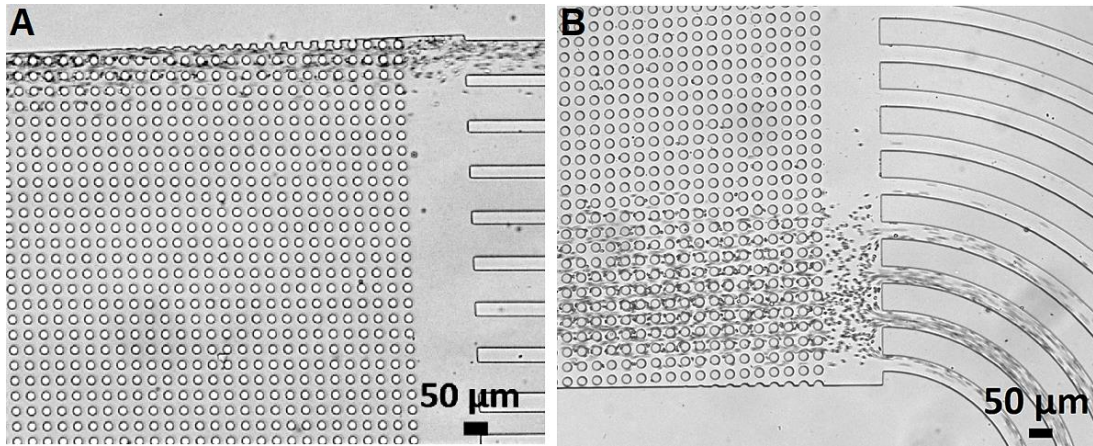


Figura 4.8 Micrografías del dispositivo cuando se inyecta una muestra de sangre diluida. A) Eritrocitos enfocados cerca de la pared superior. B) Eritrocitos enfocados cerca de la pared inferior.

Por otra parte, se observó que los leucocitos se desplazaron lateralmente al centro del canal. La visualización y reconocimiento de las células blancas se produce por el marcaje con colorante fluorescente Hoechst, el cual tiñe los núcleos de las células. En la figura 4.9 se muestra la región central del dispositivo en donde se identifican por fluorescencia el movimiento de los leucocitos hacia la salida 1 (salida de leucocitos).

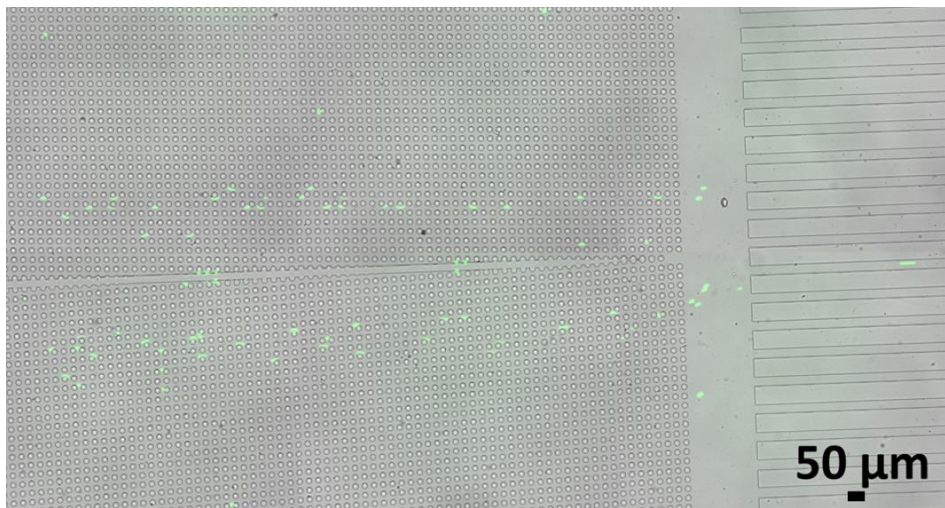


Figura 4.9 Mosaico de región central del dispositivo mostrando leucocitos marcados con Hoechst.

Posteriormente se realizaron una serie de experimentos en los cuales se inyectó una muestra de sangre diluida 1:20 a diferentes flujos volumétricos ( $3 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $6 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $9 \mu\text{L}/\text{min}$ ) la muestra se recuperó luego de transcurrir 40 minutos, para cuantificar las células por medio del hemocitómeto (cámara de Neubauer) en cada una de las salidas (eritrocitos y leucocitos). En la figura 4.10 se presenta la distribución de las células en la salida 1 (salida de leucocitos) y en la salida 2 (salida eritrocitos). Para graficar la distribución inicialmente se cuantifica el porcentaje total de células, es decir las células encontradas en las dos salidas y sobre este se calcula el porcentaje individual.

En la gráfica se observa que el 100% de células recuperadas se encontraron en la salida de interés, es decir ningún leucocito se desplaza hacia la salida 2; este resultado no varía al inyectar la muestra a  $3 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $6 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $9 \mu\text{L}/\text{min}$ . Igualmente se observa que cuando la muestra se inyecta a un flujo volumétrico de  $3 \mu\text{L}/\text{min}$ , el  $\sim 4\%$  de los eritrocitos totales entran a la salida de leucocitos; mientras que al inyectar la muestra a un flujo de  $6 \mu\text{L}/\text{min}$  el  $\sim 10\%$  de los eritrocitos entran a la salida 1. Al inyectar la muestra a un flujo volumétrico de  $9 \mu\text{L}/\text{min}$  se observa que  $\sim 15\%$  de los eritrocitos entran en la salida de leucocitos. Con los resultados se establece que al inyectar la muestra a flujos volumétricos mayores de  $3 \mu\text{L}/\text{min}$ , aumenta la entrada de eritrocitos hacia la salida 1.

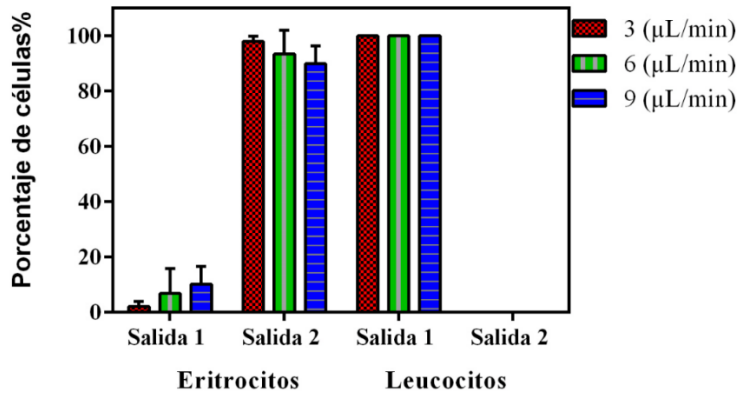


Figura 4.10 Distribución de células en la salida de leucocitos (salida 1) y en la salida de eritrocitos (salida 2) para una muestra de sangre diluida 1:20.

Con el fin de evaluar la eficiencia del dispositivo en cuanto a la recuperación, pureza y viabilidad celular, se realizaron una serie de experimentos en donde las muestras recuperadas se analizaron por citometría de flujo, debido a que esta técnica es más precisa en la cuantificación de células.

## 4.6 Análisis por citometría de flujo

Para determinar la eficiencia del dispositivo microfluídico en la separación de células blancas, se analizaron por citometría de flujo muestras recuperadas en cada una de las salidas. Con los datos obtenidos se evaluaron diferentes parámetros entre ellos, pureza, recuperación y viabilidad celular.

Para evaluar estos parámetros, se analizaron muestras iniciales, muestras recuperadas en la salida de leucocitos y en la salida de eritrocitos. A continuación, se presentan algunos resultados obtenidos por citometría de flujo. En la figura 4.11 se presentan las gráficas de puntos para una muestra inicial de sangre diluida (1:10). Primeramente, se establece la región de análisis que corresponde al 94.5% del total de los datos. Luego se reconoce las diferentes poblaciones (eritrocitos y células blancas) según su tamaño (eje horizontal) y granularidad (eje vertical), en donde los eritrocitos (representado con color azul) se ubican en la parte inferior debido a que no presentan complejidad interna



(granularidad) y son de menor tamaño. Posteriormente se ubica la población de linfocitos (representado con color verde) y los monocitos (color rojo); en la parte superior de la gráfica se ubican los granulocitos debido a que tienen mayor complejidad interna (Figura 4.11A). Posteriormente se diferencia las poblaciones celulares que tienen núcleo (PB450-A) y las que están vivas (FITC-A) como los eritrocitos no tienen núcleo se ubican en la parte inferior de la gráfica. Se observa que el porcentaje inicial de eritrocitos equivale a un 84.25% de la muestra total, mientras que la población de células blancas equivale a un 7.62% de la muestra total (Figura 4.11B). De la población total de leucocitos se realiza una gráfica de tamaño (eje horizontal) versus granularidad (eje vertical), con el fin de identificar las subpoblaciones de células blancas (linfocitos, granulocitos y monocitos) sin la presencia de eritrocitos.

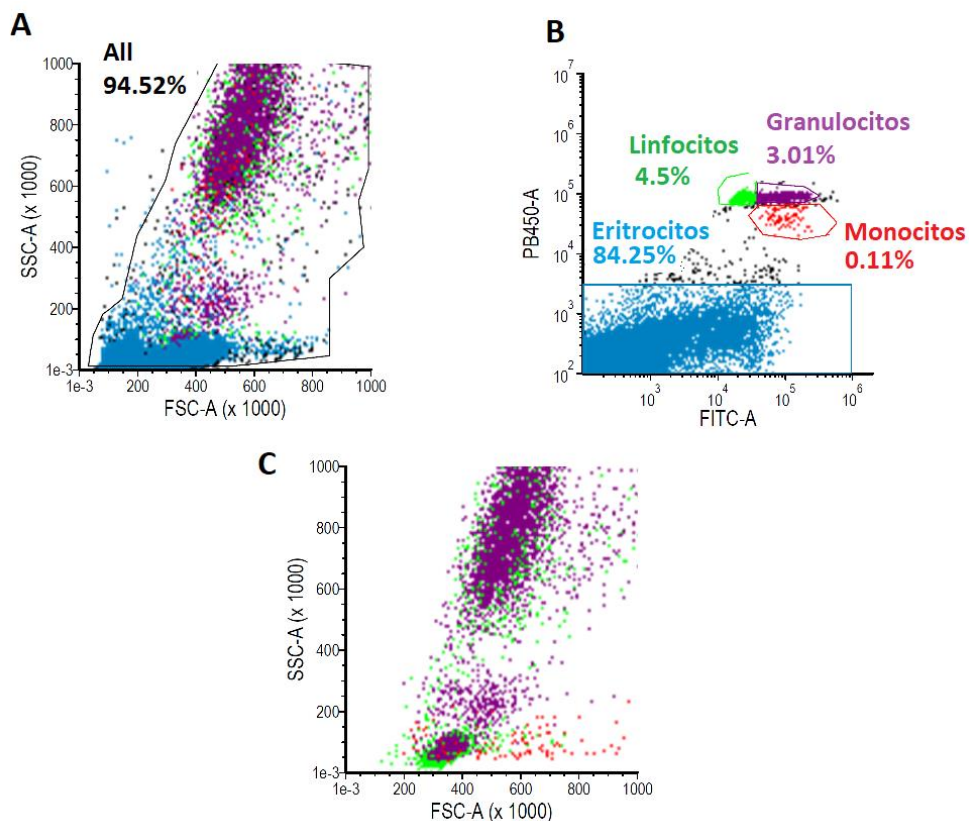


Figura 4.11 Gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo para una muestra inicial. A) Tamaño y granularidad de poblaciones de sangre diluida. B) Gráfica PB450 (tinción núcleo) y FITC (células vivas). C) Tamaño y granularidad de población de leucocitos.

Posteriormente se analizó la muestra recuperada en la salida de eritrocitos. De igual forma, se muestran las gráficas de puntos en donde se reconoce inicialmente las diferentes poblaciones (eritrocitos y células blancas) según su tamaño (eje horizontal) y granularidad (eje vertical) (Figura 4.12A). Se establece la región de análisis que corresponde al 95.93% del total, se observa que la mayor población se encuentra en la parte inferior de la gráfica, esto corresponde a los eritrocitos. Luego se diferencia las poblaciones celulares que tienen núcleo (PB450-A) y las que están vivas (FITC-A). En la Figura 4.12B se observa que, en las regiones previamente establecidas para las células blancas, se encuentra un 0.01% de total de la muestra. De la población total de leucocitos se realiza una gráfica de tamaño (eje horizontal) versus granularidad (eje vertical) (Figura 4.12C). Se observa que el porcentaje de eritrocitos equivale a un 93.18% de la muestra total, mientras que la población de células blancas se reduce a 0.01%, esto indica una alta pureza en la separación de eritrocitos.



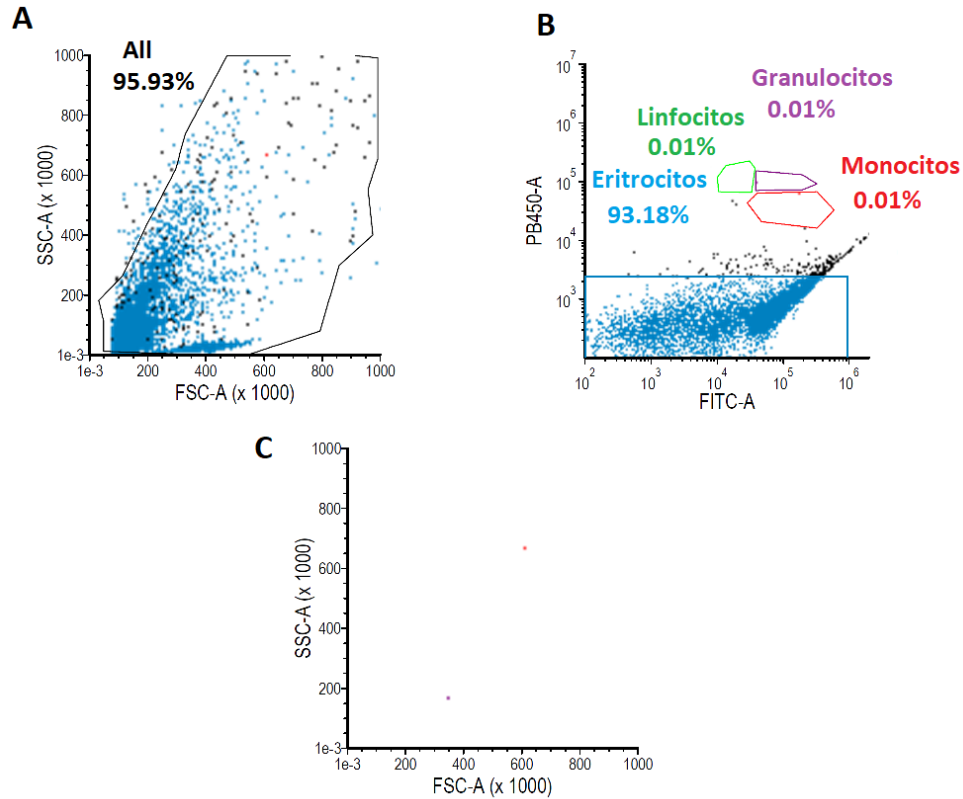


Figura 4.12 Gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo para muestra recuperada en la salida de eritrocitos. A. Tamaño y granularidad de muestra recogida. B. Gráfica PB450 (tinción núcleo) y FITC (células vivas). C. Tamaño y granularidad de población de leucocitos.

Finalmente se realizó el análisis de la muestra recuperada en la salida de leucocitos. En la figura 4.13A se presenta la gráfica de puntos en donde inicialmente se establece la región de análisis, que corresponde al 98.10% de la muestra total, se reconoce las diferentes poblaciones (eritrocitos y células blancas) según su tamaño y granularidad. Posteriormente, en la figura 4.13B se diferencia las poblaciones celulares que tienen núcleo (PB450-A) y las que están vivas (FITC-A) encontrando que un porcentaje de 39.19% de eritrocitos están entrando a la salida de leucocitos. También se identificaron las subpoblaciones de células blancas (Figura 4.13C) encontrando que la población de leucocitos aumenta su concentración 6.5 veces más comparado con la muestra inicial.

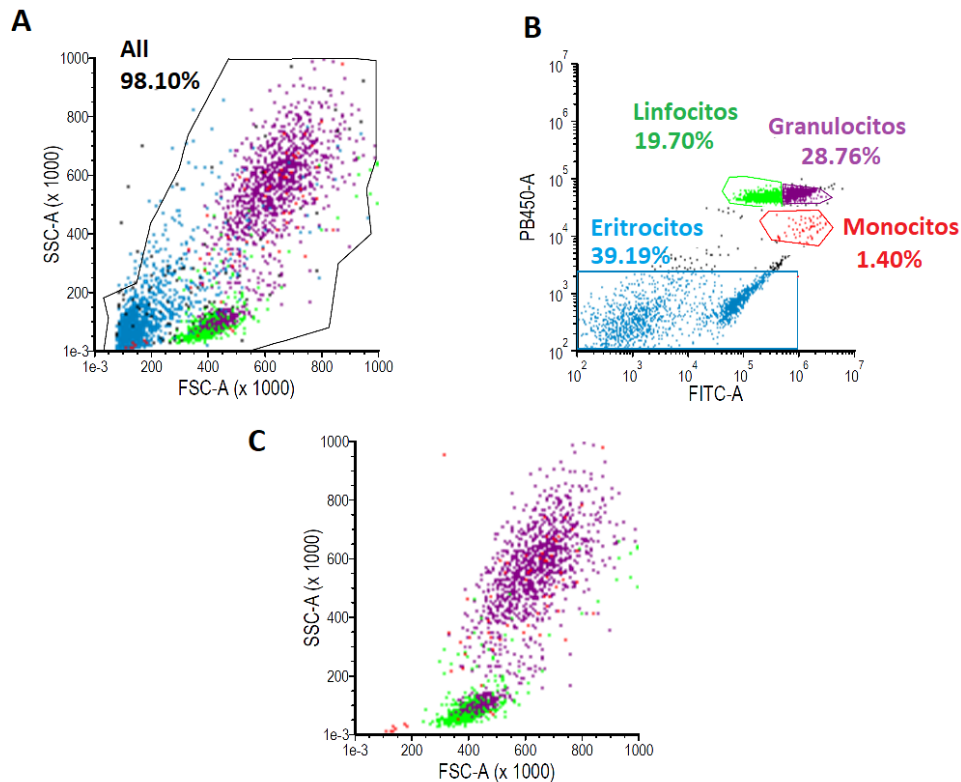


Figura 4.13 Gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo para muestra recuperada en la salida de leucocitos. A. Tamaño y granularidad de muestra recogida. B. Grafica PB450 (tinción núcleo) y FITC (células vivas). c. Tamaño y granularidad de población de leucocitos.

## 4.7 Eficiencia de separación del dispositivo microfluídico.

Con los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron parámetros que establecen la eficiencia del dispositivo microfluídico, entre estos, la distribución celular en las salidas, pureza, recuperación y viabilidad celular. Para graficar la distribución de células a través de las salidas, se calculó el total de eritrocitos y leucocitos recuperados, a partir de estos datos se determinó la fracción que se recogió en cada una de las salidas (ecuación 4.1). En la figura 4.13 se observa que en la salida uno (salida leucocitos) hay una proporción de leucocitos de aproximadamente el 94% del total, también se observa una

fracción de eritrocitos, esto altera la pureza de la muestra. En la salida dos (salida de eritrocitos) se observa mayor presencia (~ 94%) de eritrocitos que en la salida uno, sin embargo, se observa una pequeña fracción de leucocitos.

$$\% = \frac{WBCs \text{ en la salida 1}}{\text{total WBCs en la salida 1 y 2}} \times 100\% \quad (4.1)$$

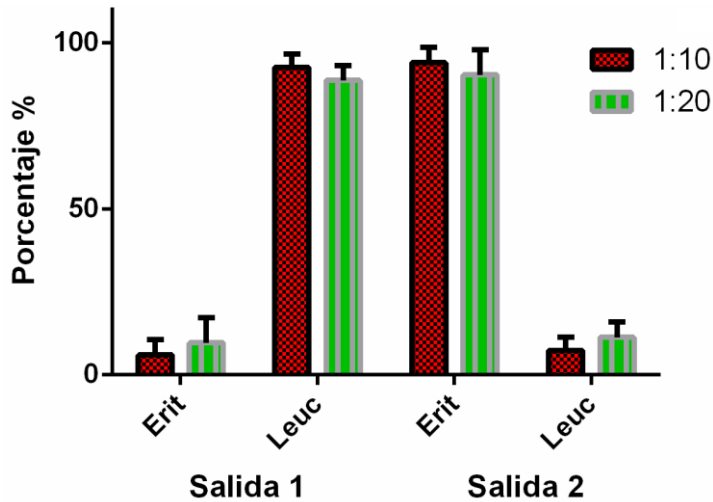


Figura 4.13 Distribución de células en la salida de leucocitos (salida 1) y en la salida de eritrocitos (salida 2) para muestras de sangre diluida 1:20 y 1:10.

Para los cálculos de pureza y recuperación se usaron las ecuaciones 3.3 y 3.4 respectivamente. En la figura 4.14 se presentan los datos obtenidos por citometría de flujo para tres diferentes experimentos, cuando la muestra de sangre inicial se inyecta a diferentes factores de dilución (1:10 y 1:20). Se observa que la máxima recuperación (~70%) y pureza (~60%) se obtienen al inyectar la sangre a un factor de dilución de 1:10. Al inyectar la sangre diluida 1:20 se obtiene una máxima pureza de ~58% y una recuperación máxima ~57%.

La recuperación calculada puede estar influenciada por la pérdida de células, durante el proceso de marcaje celular debido a procesos de lavados y centrifugación.

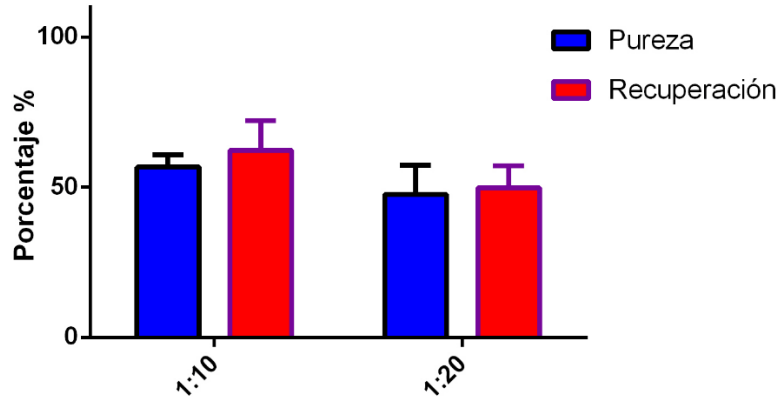


Figura 4.14 Eficiencia de recuperación y pureza para muestras inyectadas a diferentes factores de dilución.

Por otra parte, en la figura 4.15 se analizó la viabilidad celular, mostrando que del total de células blancas separadas el 97% estaban vivas, haciendo factible el uso del dispositivo para futuros experimentos con células. Este parámetro es importante en la implementación biológica, debido a que en la separación de células se espera hacer el menor daño posible con el fin de realizar posteriores experimentos.

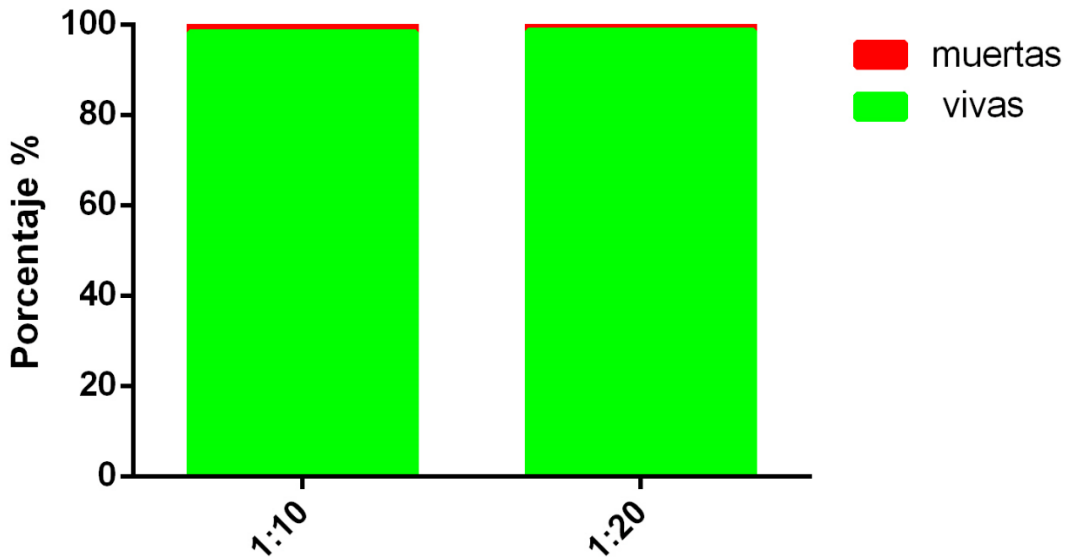


Figura 4.15. Grafica de viabilidad de células separadas en el dispositivo microfluídico.



## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó, fabricó y caracterizó un dispositivo microfluídico que permite la separación de las células blancas de una muestra de sangre diluida. Empleamos el método de desplazamiento lateral determinista (DLD) enfocando mecánicamente la muestra con una microestructura, eliminando la necesidad de un canal de enfoque, facilitando así su operación. La caracterización realizada permitió determinar que al inyectar la muestra a un flujo volumétrico de  $3 \mu\text{L}/\text{min}$  se obtiene menor contaminación por eritrocitos.

Los resultados de los experimentos muestran que para recuperar mayor número de células blancas se debe inyectar la muestra de sangre a un factor de dilución 1:10 a un flujo volumétrico de  $3 \mu\text{L}/\text{min}$ . Implementando estos parámetros se obtuvo una recuperación máxima del 70% esto se puede atribuir a la pérdida de células durante el proceso de marcaje celular debido a procesos de lavados y centrifugación. La pureza máxima obtenida fue de 60%, sin embargo, se observa que la población de células blancas aumenta su concentración 6.5 veces más comparado con la muestra inicial. Adicionalmente el sistema no provoca muerte celular, los resultados mostraron que las células permanecen viables después de la separación.



## 6. PERSPECTIVAS

Se demostró que el dispositivo microfluídico funciona en la separación de células blancas, sin embargo, para mejorar parámetros como recuperación y pureza, se puede incluir un filtro en la entrada que elimine basura de la muestra, evitando de esta forma la oclusión de regiones del dispositivo.

Por otra parte, al sistema microfluídico se le puede incorporar un sistema óptico y un sistema neumático portable. El sistema óptico permitirá detectar poblaciones de células y luego de un análisis de imágenes, realizar la cuantificación de la población de interés. El sistema neumático le proporcionaría mayor portabilidad al sistema microfluídico, ofreciendo ventajas en el campo del diagnóstico de enfermedades.

De igual forma, al dispositivo microfluídico se le puede agregar nuevas secciones de postes con diferente diámetro crítico, para ser usado en la separación de diferentes estructuras biológicas; como por ejemplo células tumorales circulantes y parásitos de una muestra de sangre.





# REFERENCIAS

- [1] Alberts, B., & Bray, D. (2006). Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana.
- [2] Guyton, A. C., Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2006). Tratado de fisiología médica. Elsevier Brasil
- [3] Tomlinson, M. J., Tomlinson, S., Yang, X. B., & Kirkham, J. (2013). Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of tissue engineering*, 4, 2041731412472690.
- [4] Gossett, D. R., Weaver, W. M., Mach, A. J., Hur, S. C., Tse, H. T. K., Lee, W., ... & Di Carlo, D. (2010). Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3249-3267.
- [5] Lam, S., & Bollard, C. (2013). T CELL THERAPIES FOR HIV. *Immunotherapy*, 5(4), 407.
- [6] Li, X., Chen, W., Li, Z., Li, L., Gu, H., & Fu, J. (2014). Emerging microengineered tools for functional analysis and phenotyping of blood cells. *Trends in biotechnology*, 32(11), 586-594.
- [7] Paterlini-Brechot, P., & Benali, N. L. (2007). Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer letters*, 253(2), 180-204.
- [8] Gal Iglesias, B., López-Gallardo, E., Martín Velasco, A. I., & Prieto Montalvo, J. (2001). Bases de la fisiología. Tébar.
- [9] Tortora, G. J., & Reynolds Grabowski, S. (2002). Principios de anatomía y fisiología. Oxford.
- [10] Fox, S. I. A. A., & Luis, J. (2003). Fisiología humana.
- [11] Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". *WikiJournal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436.

- [12] De Castro, J., Rojas, M. O., & Wasserman, M. (1996). Evaluación de métodos para la separación eficiente de leucocitos. *Biomédica*, 16(2), 98-104.
- [13] SKOOG, W. A., & BECK, W. S. (1956). Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood*, 11(5), 436-454.
- [14] Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G., & Herzenberg, L. A. (1972). Fluorescence activated cell sorting. *Review of Scientific Instruments*, 43(3), 404-409.
- [15] Sabban, S. (2011). Development of an in vitro model system for studying the interaction of *Equus caballus* IgE with its high-affinity FcεRI receptor (Doctoral dissertation, University of Sheffield).
- [16] Tian, W. C., & Finehout, E. (Eds.). (2009). *Microfluidics for biological applications* (Vol. 16). Springer Science & Business Media.
- [17] Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368-373.
- [18] Sia, S. K., & Whitesides, G. M. (2003). Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24(21), 3563-3576.
- [19] Folch, A. (2016). *Introduction to bioMEMS*. CRC Press.
- [20] Sajeesh, P., & Sen, A. K. (2014). Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review. *Microfluidics and nanofluidics*, 17(1), 1-52.
- [21] Bhagat, A. A. S., Bow, H., Hou, H. W., Tan, S. J., Han, J., & Lim, C. T. (2010). Microfluidics for cell separation. *Medical & biological engineering & computing*, 48(10), 999-1014.
- [22] Martel, J. M., & Toner, M. (2014). Inertial focusing in microfluidics. *Annual review of biomedical engineering*, 16, 371-396.
- [23] Kuntaegowdanahalli, S. S., Bhagat, A. A. S., Kumar, G., & Papautsky, I. (2009). Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab on a Chip*, 9(20), 2973-2980.

- [24] Warkiani, M. E., Guan, G., Luan, K. B., Lee, W. C., Bhagat, A. A. S., Chaudhuri, P. K., ... & Lim, C. T. (2014). Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 14(1), 128-137.
- [25] Nivedita, N., & Papautsky, I. (2013). Continuous separation of blood cells in spiral microfluidic devices. *Biomicrofluidics*, 7(5), 054101.
- [26] Ryu, H., Choi, K., Qu, Y., Kwon, T., Lee, J. S., & Han, J. (2017). Patient-Derived Airway Secretion Dissociation Technique To Isolate and Concentrate Immune Cells Using Closed-Loop Inertial Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 89(10), 5549-5556.
- [27] M. Yamada & M. Seki (2005). Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. *Lab on a Chip*, vol. 5, no. 11, 1233–1239.
- [28] Gascoyne, P. R., & Vykoukal, J. (2002). Particle separation by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 23(13), 1973.
- [29] Doh, I., & Cho, Y. H. (2005). A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process. *Sensors and Actuators A: Physical*, 121(1), 59-65.
- [30] Li, Y., Dalton, C., Crabtree, H. J., Nilsson, G., & Kaler, K. V. (2007). Continuous dielectrophoretic cell separation microfluidic device. *Lab on a Chip*, 7(2), 239-248.
- [31] Johnson, D. A., & Feke, D. L. (1995). Methodology for fractionating suspended particles using ultrasonic standing wave and divided flow fields. *Separations Technology*, 5(4), 251-258.
- [32] Augustsson, P., Magnusson, C., Nordin, M., Lilja, H., & Laurell, T. (2012). Microfluidic, label-free enrichment of prostate cancer cells in blood based on acoustophoresis. *Analytical chemistry*, 84(18), 7954-7962.
- [33] Laurell, T., Petersson, F., & Nilsson, A. (2007). Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles. *Chemical Society Reviews*, 36(3), 492-506.

- [34] Lenshof, A., Magnusson, C., & Laurell, T. (2012). Acoustofluidics 8: Applications of acoustophoresis in continuous flow microsystems. *Lab on a Chip*, 12(7), 1210-1223.
- [35] Evander, M., Lenshof, A., Laurell, T., & Nilsson, J. (2008). Acoustophoresis in wet-etched glass chips. *Analytical chemistry*, 80(13), 5178-5185.
- [36] Kim, M. J., Lee, D. J., Youn, J. R., & Song, Y. S. (2016). Two step label free particle separation in a microfluidic system using elasto-inertial focusing and magnetophoresis. *RSC Advances*, 6(38), 32090-32097.
- [37] Gijs, M. A. (2004). Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(1), 22-40.
- [38] Davis, J. A. (2008). Microfluidic separation of blood components through deterministic lateral displacement. Princeton University.
- [39] Huang, L. R., Cox, E. C., Austin, R. H., & Sturm, J. C. (2004). Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science*, 304(5673), 987-990.
- [40] Holm, S. H., Beech, J. P., Barrett, M. P., & Tegenfeldt, J. O. (2011). Separation of parasites from human blood using deterministic lateral displacement. *Lab on a Chip*, 11(7), 1326-1332.
- [41] Davis, J. A., Inglis, D. W., Morton, K. J., Lawrence, D. A., Huang, L. R., Chou, S. Y., ... & Austin, R. H. (2006). Deterministic hydrodynamics: taking blood apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(40), 14779-14784.
- [42] Beech, J. (2011). Microfluidics Separation and Analysis of Biological Particles. *Fasta Tillståndets Fysik*.
- [43] S. H., Beech, J. P., Barrett, M. P., & Tegenfeldt, J. O. (2011). Separation of parasites from human blood using deterministic lateral displacement. *Lab on a Chip*, 11(7), 1326-1332.
- [44] Holm, S. H., Beech, J. P., Barrett, M. P., & Tegenfeldt, J. O. (2016). Simplifying microfluidic separation devices towards field-detection of blood parasites. *Analytical Methods*, 8(16), 3291-3300.

- [45] Holmes, D., Whyte, G., Bailey, J., Vergara-Irigaray, N., Ekpenyong, A., Guck, J., & Duke, T. (2014). Separation of blood cells with differing deformability using deterministic lateral displacement. *Interface Focus*, 4(6), 20140011.
- [46] Choi, J., Hyun, J. C., & Yang, S. (2015). On-chip extraction of intracellular molecules in white blood cells from whole blood. *Scientific reports*, 5, 15167.
- [47] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*, 1st ed. New York: Oxford University Press, 2008.