



Cinvestav-Monterrey

**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Monterrey

Bio-ARTS Lab

**Análisis *in-silico* de un dispositivo
microfluídico para el estudio de
secreción de célula única
empleando microperlas**

Tesis que presenta

Alberto Missael Solis Serrano

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nuevo León

noviembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la obtención del grado, así como al personal del CINVESTAV Unidad Monterrey por las instalaciones, facilidades y conocimientos otorgados durante el curso del grado.

También, quisiera agradecer al Dr. José Luis García Cordero por la confianza de permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por otorgarme experiencia, consejos y saber en este tiempo, así como la inmensurable paciencia con la que me trató durante mi estancia en el centro.

A mis compañeros de laboratorio, Diana, Roberto, Oriana, Alan, Toño, Ruth, Rocio, Pablo, Samuel y Manolo, por la ayuda dentro del laboratorio y lo vivido fuera de él.

A mis compañeros de generación, por estos dos años de grandes experiencias. Especialmente a Paola M. y Kevin P., por su apoyo durante los momentos más difíciles.

A mi familia, por el respaldo y amor que siempre me han otorgado incondicionalmente.

The crucial lesson was that the scope of things I didn't know wasn't merely vast; it was, for all practical purposes, infinite.

Schwartz, M. A. (2008). The importance of stupidity in scientific research. *Journal of Cell Science*, 121(11), 1771-1771.

CONTENIDO

Contenido	IV
Figuras	V
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
1 Introducción	1
1.1 Secretoma y célula única.....	1
1.2 Modelo computacional	10
1.3 Justificación	17
2 Hipótesis	19
3 Objetivos.....	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos particulares	19
4 Difusión y adsorción de analito	20
4.1 Marco teórico	20
4.2 Condiciones de simulación	24
4.3 Resultados.....	33
5 Flujo a través del dispositivo.....	42
5.1 Marco teórico	42
5.1.1 Flujo	43
5.1.2 Esfuerzo cortante	51
5.2 Condiciones de simulación	52
5.3 Resultados.....	61
6 Propuesta y conclusiones	74
7 Perspectivas	78
8 Referencias.....	79

FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DE LA HETEROGENEIDAD CELULAR.....	3
FIGURA 2 – TÉCNICA iSCAT	5
FIGURA 3 – FUNCIONAMIENTO DEL DISPOSITIVO DE JUNKIN ET AL.	6
FIGURA 4 – DIAGRAMA DEL FUNCIONAMIENTO DE UN NANOPOZO.	8
FIGURA 5 – ESQUEMA DEL DISPOSITIVO DE CEDILLO-ALCÁNTAR.....	9
FIGURA 6 – PROCESO DEL ANÁLISIS DE ELEMENTO FINITO.....	11
FIGURA 7 – FUNCIONAMIENTO DE TRAMPAS HIDRODINÁMICAS DE XU ET AL.....	13
FIGURA 8 – OPTIMIZACIÓN DE TRAMPAS POR SOHRABI & PACKIRISAMY..	14
FIGURA 9 – SIMULACIÓN DE PERLA EN NANOPOZO POR AN ET AL.	15
FIGURA 10 – ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UN SISTEMA LFA POR SIMULACIONES.	16
FIGURA 11 – ESQUEMA DEL PROCESO DE ADSORCIÓN-DIFUSIÓN PARA EL MODELO DE ESTE TRABAJO.....	23
FIGURA 12 – SECRECIÓN DE TNF-A EN RESPUESTA A UN ESTIMULO DE LPS.....	25
FIGURA 13 – ESQUEMA GENERAL DE LA GEOMETRÍA UTILIZADA EN LAS SIMULACIONES.	28
FIGURA 14 – DETECCIÓN DE TNF-A CON PERLAS FUNCIONALIZADAS.	29
FIGURA 15 – COMPORTAMIENTO DE LA SECRECIÓN DE ANALITO UTILIZANDO LA FUNCIÓN STEP.....	31
FIGURA 16 – MODELO CON INCLUSIÓN DE CÁMARA ENTRE TRAMPAS.....	32
FIGURA 17 – CONCENTRACIÓN VOLUMÉTRICA DEL ANALITO EN LOS CANALES Y CONCENTRACIÓN SUPERFICIAL DEL COMPLEJO ANALITO-LIGANDO EN LA SUPERFICIE DE LA PERLA.....	34
FIGURA 18 – CONCENTRACIÓN SUPERFICIAL DEL COMPLEJO ANALITO-LIGANDO EN LA PERLA BLANCO (LÍNEA SOLIDA) Y PERLA CONTIGUA (LÍNEA DISCONTINUA).	35
FIGURA 19 – COBERTURA DE LA PERLA BLANCO (SUPERFICIE SUPERIOR) Y UNA PERLA CONTIGUA (SUPERFICIE INFERIOR) EN FUNCIÓN DEL ANCHO Y ALTO DE LA CÁMARA DEL CANAL PRINCIPAL.	35

FIGURA 20 – CONTAMINACIÓN DE LA PERLA BLANCO Y CONTIGUA EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO DE LA CÁMARA DEL CANAL PRINCIPAL.	36
FIGURA 21 – CONCENTRACIÓN SUPERFICIAL PARA LA PERLA BLANCO (SUPERFICIE SUPERIOR) Y CONTIGUA (SUPERFICIE INFERIOR) RESPECTO A EL ANCHO Y ALTO DE LA CÁMARA EN EL CANAL PRINCIPAL PARA DIFERENTES TIEMPOS CUANDO $KD = 56 \text{ fM}$	37
FIGURA 22 – CONTAMINACIÓN EN FUNCIÓN DEL ALTO Y ANCHO DE LA CÁMARA EN EL CANAL PRINCIPAL EN DOS MOMENTOS, CUANDO $KD = 56 \text{ fM}$	38
FIGURA 23 – CONCENTRACIÓN SUPERFICIAL DE LA PERLA BLANCO (SUPERFICIE SUPERIOR) Y PERLA CONTIGUA (SUPERFICIE INFERIOR) EN FUNCIÓN DEL ANCHO DE CÁMARA Y LOS SITIOS DE UNIÓN EN LAS PERLAS PARA CUATRO COEFICIENTES DE DIFUSIÓN DIFERENTES E.	39
FIGURA 24 – CONTAMINACIÓN EN FUNCIÓN DEL ANCHO DE CÁMARA Y DENSIDAD DE SITIOS DE UNIÓN PARA CUATRO DIFERENTES COEFICIENTES DE DIFUSIÓN.	40
FIGURA 25 – MECANISMOS DE CAPTURA DE MUESTRAS EN SISTEMAS MICROFLUÍDICOS.	42
FIGURA 26 – ESQUEMAS DE FLUJO EN CANALES SIMPLES.	45
FIGURA 27 – ESQUEMA DEL SISTEMA DE FILTRADO EN UN PUNTO DE CONEXIÓN JUNTO A SU EQUIVALENTE ELÉCTRICO.	48
FIGURA 28 – ESQUEMÁTICO DE UNA TRAMPA HIDRODINÁMICA.	49
FIGURA 29 – A LA IZQUIERDA, ESQUEMA PARA LOS CÁLCULOS INICIALES.	52
FIGURA 30 - ESQUEMA DEL SISTEMA DE CANALES CON TRAMPAS DE FORMA SECUENCIAL.	56
FIGURA 31 – GEOMETRÍAS EN COMSOL QUE INCLUYEN UN CANAL LATERAL..	57
FIGURA 32 – DIAGRAMA DEL MODELO DEL DISPOSITIVO PARA OBSERVAR LOS FLUJOS A TRAVÉS DE LOS CANALES.	58
FIGURA 33 – GEOMETRÍAS PARA LA SIMULACIÓN DEL ESFUERZO CORTANTE.	60
FIGURA 34 – LÍNEAS DE FLUJO EN MODELO SIMPLE.	61
FIGURA 35 – LÍNEAS DE FLUJO Y CAMPO DE VELOCIDAD EN LA ENTRADA DE LOS MODELOS GEOMÉTRICOS BIDIMENSIONALES.	62

FIGURA 36 – LÍNEAS DE FLUJO Y CAMPO DE VELOCIDAD PARA EL RESULTADO ACEPTABLE DE LAS SIMULACIONES PARAMÉTRICAS.	62
FIGURA 37 – RAZÓN DE FLUJOS VOLUMÉTRICOS ENTRE EL CANAL CORRESPONDIENTE Y LA ENTRADA EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA EQUIVALENTE DE UN CANAL DE CONEXIÓN.	64
FIGURA 38 – CAMPO DE VELOCIDAD Y LÍNEAS DE FLUJO EN EL PRIMER SEGMENTO DEL MODELO PARA CUATRO EXTREMOS DE LAS CIENTO CONDICIONES DE SIMULACIÓN	66
FIGURA 39 – RAZÓN ENTRE EL FLUJO VOLUMÉTRICO DEL CANAL CORRESPONDIENTE Y EL FLUJO DE ENTRADA EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA TOTAL EQUIVALENTE.	67
FIGURA 40 – RAZONES DE FLUJO EN EL CANAL CORRESPONDIENTE Y EL FLUJO DE ENTRADA EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA DEL CANAL DE CONEXIÓN Y DE LA RESISTENCIA LATERAL.	68
FIGURA 41 – CAMPO DE VELOCIDAD Y LÍNEAS DE FLUJO PARA EL PRIMER SEGMENTO DE MODELO RESULTANTES DE CUATRO CONDICIONES EXTREMAS DE SIMULACIÓN	69
FIGURA 42 – RAZONES DE FLUJO DEL CANAL CORRESPONDIENTE Y EL FLUJO DE ENTRADA EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA DE CONEXIÓN SUPERIOR E INFERIOR.	70
FIGURA 43 – ESFUERZO DE CORTE PARA UNA DIMENSIÓN DE TRAMPA IGUAL A LA ORIGINAL	71
FIGURA 44 – GRÁFICAS DE ESFUERZO CORTANTE EN FUNCIÓN DE LA ALTURA DE LA TRAMPA Y LA PRESIÓN DE ENTRADA.	72
FIGURA 45 – ESFUERZO DE CORTE PARA UNA DIMENSIÓN DE TRAMPA CON ALTURA 12 MM	73
FIGURA 46 – DIAGRAMA DE UN SISTEMA MICROFLUÍDICO DE DILUCIÓN.....	74
FIGURA 47 – ESQUEMA DEL MODELO PROPUESTO.....	77

RESUMEN

El secretoma es una fuente importante de biomarcadores los cuales pueden ser usados para la detección de diferentes patologías, presencia de toxinas y otras alteraciones celulares. Sin embargo, existe un problema con el análisis de estas proteínas: generalmente se encuentran en concentraciones altamente diluidas y algunas tienen un tiempo de vida media muy bajo. Por otro lado, el análisis convencional de secreción de proteínas hace uso de grandes poblaciones de células, lo cual puede enmascarar la heterogeneidad celular, que a su vez evitaría el análisis de subpoblaciones que pueden resultar de vital importancia para el tratamiento de distintas patologías.

En este trabajo se propone que la optimización de un sistema microfluídico de una sola capa que haga uso de perlas conjugadas con anticuerpos, pueda resolver algunos de los desafíos mencionados anteriormente mientras se minimiza el número de pasos, el tiempo de procesamiento, la cantidad de reactivos y el equipo necesario para el análisis.

Lo anterior es realizado a través de simulaciones computacionales generadas en el software COMSOL para dos fenómenos principales en el funcionamiento del dispositivo: la difusión-adsorción del analito en la superficie de las perlas y el flujo de captura de perlas y células. Para el primero, se utiliza el isoterma de Langmuir para modelar la reacción en superficie, así como la ecuación general de convección-difusión para el transporte de masa que ocurre en la secreción del analito. Para el segundo se hace uso de las ecuaciones de Navier-Stokes dentro del módulo CFD para modelar el flujo a través del dispositivo.

Usando los modelos anteriores, se modifican parámetros como concentración de anticuerpo en superficie, la difusividad (para el modelo adsorción-difusión), ancho de canal de conexión y resistencia hidráulica (para el modelo flujo), para encontrar el diseño que permite el funcionamiento aceptable del dispositivo.

ABSTRACT

The secretome is an important source of biomarkers which can be used for the detection of different pathologies, presence of toxins and other cellular alterations. However, there is a problem with the analysis of these proteins: they are usually found in highly diluted concentrations and some have a very low half-life. On the other hand, the conventional analysis of protein secretion makes use of large cell populations, which can mask cell heterogeneity, which in turn would avoid the analysis of subpopulations that can be of vital importance for the treatment of different pathologies.

In this work it is proposed that the optimization of a single layer microfluidic system that makes use of antibody-conjugated beads, can solve some of the challenges mentioned above while minimizing the number of steps, the processing time, the number of reagents and the necessary equipment for the analysis.

The above is done through computational simulations generated in the COMSOL software for two main phenomena present in the operation of the device: diffusion-adsorption of the analyte on the surface of the beads and the capture flow of beads and cells. For the first, the Langmuir isotherm is used to model the surface reaction, as well as the general convection-diffusion equation for the mass transport that occurs in the secretion of the analyte. For the second, the Navier-Stokes equations are used within the CFD module to model the flow through the device.

Using the above models, parameters such as surface antibody concentration, diffusivity (for the adsorption-diffusion model), connection channel width and hydraulic resistance (for the flow model) are modified, to find the design that allows acceptable operation of the device.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 SECRETOMA Y CÉLULA ÚNICA

El secretoma celular está compuesto por el conjunto de proteínas secretadas por las células. Las proteínas secretadas, como hormonas, citocinas, interferones, factores de crecimiento, entre otras, son de gran importancia para diferentes funciones biológicas tales como el crecimiento, la división, la apoptosis y la señalización celular [1].

El propósito de la proteómica funcional es caracterizar la abundancia, modificaciones post-traduccionales y cinética de las proteínas involucradas en la progresión de una enfermedad, respuesta inmune y diferenciación celular, entre otras [2]. En las últimas décadas ha habido un interés creciente de este campo por el estudio del secretoma en diversos rangos de muestras biológicas, desde microorganismos hasta embriones humanos [3].

El secretoma es altamente dinámico y estrictamente regulado; su expresión cambia durante el desarrollo de órganos y su maduración, así como resultado de diversas patologías y estímulos ambientales. De esta manera, las proteínas secretadas por la célula son una fuente valiosa de biomarcadores, ya que éstas reflejan el estado de las células en tiempo real y en situaciones particulares como las comentadas anteriormente [4,5]. Por ejemplo, citocinas, quimiocinas y proteasas secretadas normalmente se asocian con funciones inmunitarias [2].

Usualmente las proteínas secretadas en un medio *in vitro* por células de interés son estudiadas para comprender mejor el mecanismo *in vivo* responsable de esta liberación [4]. La caracterización de las proteínas secretadas ayuda en el diagnóstico y tratamiento de patologías como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, cáncer y diabetes, entre otras, así como en la comprensión de las vías biológicas involucradas y

los efectos que tienen las proteínas en otras células [5]. De los grupos de proteínas mencionados anteriormente, uno muy importante es el de las citocinas. Estas son un grupo de (glico)proteínas solubles que actúan de forma no enzimática para regular la función celular, regularmente en concentraciones de pico a nanomolar. Las citocinas, junto a los neurotransmisores, las hormonas endocrinas y los autacoides, son parte de las cuatro clases principales de moléculas solubles de señalización celular [6].

El estudio del secretoma es desafiante debido a las dificultades en la recolección y preparación de muestra, ya que entre otras cosas, las proteínas secretadas generalmente están altamente diluidas [3] (son secretadas en concentraciones bajas) o tienen una vida media muy corta debido a la degradación proteolítica, así como su absorción por las células durante el periodo de incubación y la asociación con diferentes moléculas solubles [7]. Lo anterior hace que el análisis de concentración de varias citocinas, u otras proteínas, al final de largos tiempos de incubación (como por ejemplo en los ensayos tipo ELISA) pueda no revelar la presencia de moléculas importantes, al encontrarse subrepresentadas [7].

Otros de los desafíos en el análisis del secretoma *in vitro* es la muerte celular y proteólisis inducidas durante la manipulación de la muestra, ya que estos eventos causan la expulsión de proteínas intracelulares, las cuales son difíciles de distinguir de las proteínas secretadas [4].

Por otro lado, las mediciones de células individuales se han convertido en importantes herramientas en el entendimiento y descripción de la heterogeneidad celular. Esta última consiste en la variabilidad entre célula y célula de una misma población respecto a una (o más) característica medible, pudiendo ser desde una simple molécula hasta cualquier parámetro morfológico o funcional cuantificable [8]. La Figura 1 muestra la clasificación de la heterogeneidad celular basada en dicotomías presentada en el trabajo de Huang [8]. La heterogeneidad se ha descrito en diversos tipos celulares y ocurre incluso en linajes celulares de una misma célula progenitora. Aunque

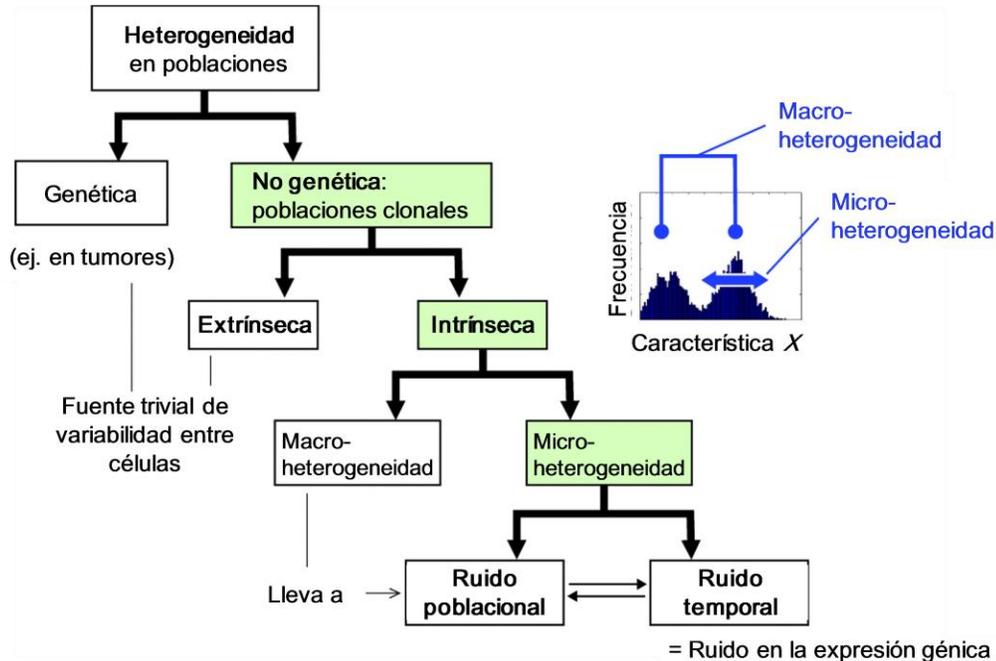


Figura 1 – Esquema de la heterogeneidad celular, organizado en una jerarquía de dicotomías. La heterogeneidad genética se refiere a una diferencia en los genomas de células individuales en una población. La extrínseca es debida a diferentes factores ambientales actuando con diferente intensidad en la población. Es intrínseca por ruido temporal o poblacional. Se tiene macro heterogeneidad cuando existe una variedad discreta de tipos celulares en diferentes estados, manifestándose como una distribución multimodal en un histograma de población. La micro heterogeneidad es dentro de una población celular uniforme y se observa como la variancia de una distribución de campana. Modificado de Huang [8].

aún no está bien entendida, se piensa que la heterogeneidad se debe a factores extrínsecos, tales como el ciclo celular y el microambiente circundante, y factores intrínsecos como fluctuaciones en el ARN y la abundancia proteínica. La medición de señales biológicas en muestras globales puede enmascarar la heterogeneidad individual al promediar las señales de varias células. Lo anterior es perjudicial si el proceso de estudio es dominado por tipos celulares inusuales o si se investiga las vías celulares de señalización y respuesta a estímulos [9].

Además, la heterogeneidad celular no genética ha sido cada vez más reconocida como una característica clave de muchos procesos de interés como metástasis, respuesta tumoral a fármacos, biología del desarrollo, diferenciación de células madre y respuesta inmune [2]. Por ejemplo, en el contexto clínico, poblaciones de células T previamente creídas como homogéneas, contenían diferentes subpoblaciones con diferentes perfiles de

secreción de citocinas a través de un análisis de célula única. Estas diferencias funcionales podrían servir para predecir la respuesta inmune del paciente a ciertas terapias [2].

La posibilidad de aislar subpoblaciones de células resistentes a ciertas drogas, como en el tratamiento de cáncer y patogénesis microbiana, ha ayudado a entender que conjuntos de células que constituyen menos del 1% de la población total pueden ser las más importantes a erradicar durante el tratamiento [10]. En años recientes, el análisis de célula única de alto rendimiento ha realizado diversos descubrimientos: raras subpoblaciones genéticas en tumores, mecanismos de resistencia antibiótica en bacterias, variaciones célula-célula durante la diferenciación de células madre y la respuesta inmune a patógenos [10]. Por lo tanto, mediciones de célula única son críticas para un mejor entendimiento de la heterogeneidad, señalización celular, diferenciación y respuesta inmune. Los métodos tradicionales para la medición de proteínas, tales como *Western blot*, espectrometría de masa y ELISA, son enfoques basados en población que pueden enmascarar la heterogeneidad molecular subyacente, ya que incluso células genéticamente idéntica responden de forma variable al mismo estímulo [2,11].

Uno de los mayores retos para la medición de proteínas en células únicas es la pequeña cantidad de proteína. En ciertas condiciones, proteínas con una función relevante, tales como las fosfoproteínas están presentes en bajas concentraciones (10^2 - 10^4 copias por célula). En determinados casos clínicos, células recolectadas en sangre o tejido tienen un menor número de proteínas que células provenientes de cultivos secundarios. Las mediciones en célula única requieren de análisis extremadamente sensibles y de la minimización del error técnico [2]. Se han desarrollado distintas tecnologías para medir ADN y ARN de muestras de células únicas, debido a la posibilidad de amplificar la cantidad de analito de este tipo. Sin embargo, la medición de proteína en célula única se ha dificultado debido a la incapacidad de aumentar la concentración de la muestra, por lo que técnicas que utilizan volúmenes grandes, en el rango

de microlitros, no son capaces de realizar mediciones en células individuales [9].

Nuevos métodos deben ser desarrollados para estudiar células de forma individual y a su vez enriquecer la concentración de proteínas secretadas en el medio a analizar [1]. La microfluídica combinada con inmunoensayos puede resolver algunos de los desafíos mencionados anteriormente, además de minimizar el número de pasos, el tiempo de procesamiento, la cantidad de reactivos y el equipo necesario para el análisis [7].

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosos dispositivos para el análisis proteómico de células individuales. Métodos basados en microfluídica han ido emergiendo como herramientas para las mediciones proteómicas de células individuales [9]. Por ejemplo, McDonald *et al.* [12] desarrollan una herramienta que permite la detección de proteínas individuales secretadas por células individuales sin necesidad de marcadores. La técnica utilizada está basada en la dispersión interferométrica (iSCAT, por sus siglas en inglés). Esta consistía en enfocar el haz de un diodo láser a una región cercana a la célula, la luz dispersada por la proteína pasa a través de múltiples cristales y espejos

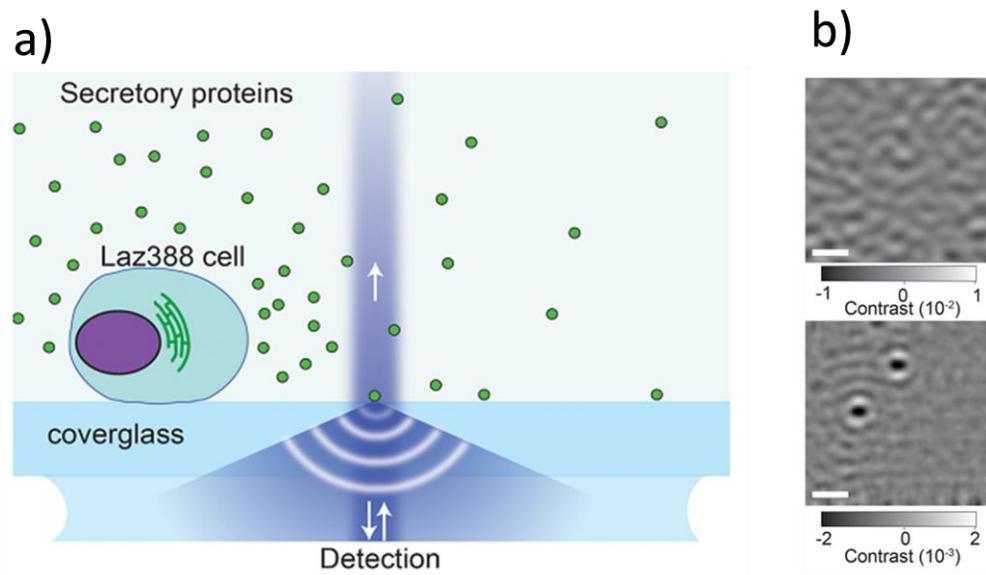


Figura 2 – Técnica iSCAT. (a) Esquema de la región detectada por el láser. (b) imagen filtrada espaciotemporalmente (arriba) e imagen de iSCAT correspondiente. Barras de escala: 1 μm . Modificado de McDonald *et al.* [12].

hasta llegar al módulo iSCAT, como se aprecia en la Figura 2. En este método no se tiene una separación física entre células, sino que un concentrado de muestra es depositado sobre el cubreobjetos y la célula de interés es posicionada cerca de la región de análisis con el uso de posicionadores piezoeléctricos [12]. Aunque su tecnología elimina la necesidad de marcadores y periodos de incubación largos, el equipo necesario no es común, su operación requiere capacitación y el análisis de los datos crudos es complejo.

En otro caso, Junkin *et al.* [13] diseñaron un chip microfluídico para el análisis células individuales dentro de cámaras aisladas de 1.35 nL. El dispositivo utiliza cientos de válvulas para atrapar y mantener a las células, mientras provee de estímulos dinámicos y mediciones no destructivas de secreción, posición y morfología. La medición de moléculas secretadas es lograda con

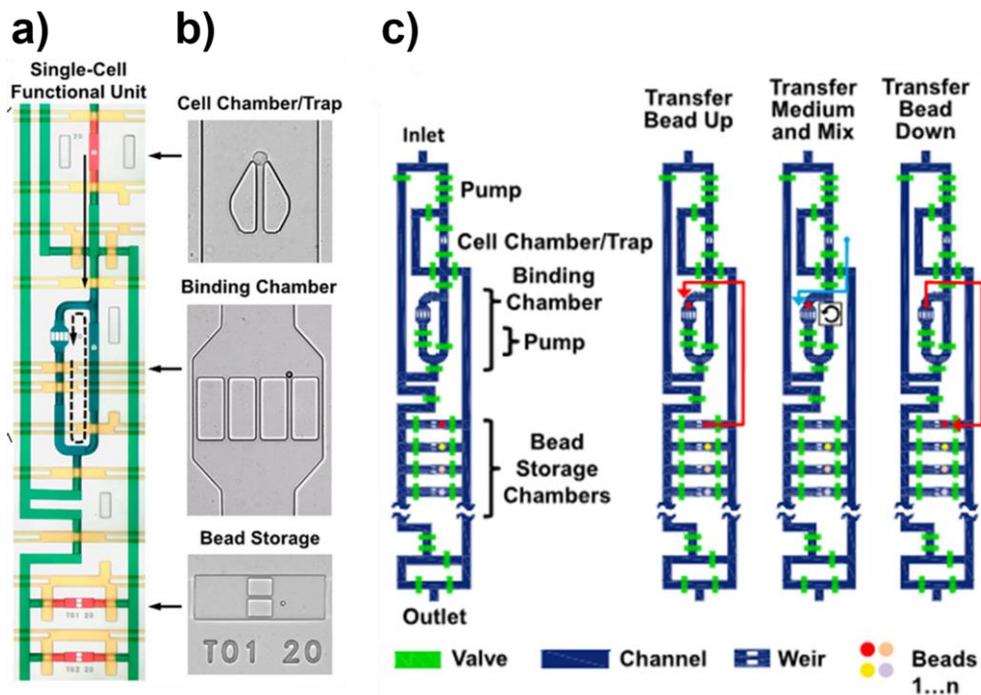


Figura 3– Funcionamiento del dispositivo de Junkin *et al.* (a) Acercamiento a una de las decenas de columnas funcionales. La flecha sólida indica el movimiento de medio y la punteada el movimiento de mezclado. (b) Acercamiento a la cámara de captura con una célula atrapada (arriba), cámara de unión con una perla (en medio) y cámaras de almacenamiento con otras perlas (abajo). (c) Secuencia de operación del ensayo. Las perlas se cargan en las cámaras de almacenamiento, para ser movidas a la cámara de unión. Estas se exponen al medio proveniente de la célula atrapada y una vez acabado el proceso, las perlas son movidas de vuelta a las cámaras de almacenamiento. El proceso se repita para subsecuentes perlas, por lo que cada una de estas representa un instante diferente de tiempo. Modificado de Junkin *et al.* [13].

un inmunoensayo fluorescente tipo *sandwich* basado en perlas. Estas perlas son mantenidas en una sección diferente a la de las trampas de células y cuando son requeridas, las primeras son desplazadas por la acción de diversas válvulas a través del dispositivo hacia una cámara de unión. De la misma forma, el medio, junto a lo secretado por la célula atrapada, es movido hacia la cámara de unión. Es entonces cuando en esta última se produce un mezclado gracias a una bomba peristáltica circular, lo cual logra aumentar la eficiencia de captura. Al terminar el mezclado, la cámara es lavada y las perlas regresan a la sección inicial. Ahí se proporcionan los anticuerpos de detección necesarios para completar el ensayo *sandwich* y la intensidad de fluorescencia obtenida es relacionada con el número de proteínas liberadas por la célula. La cámara de unión puede albergar varias perlas, lo que posibilita la detección de diferentes tipos de proteínas de una sola célula al utilizar perlas con distintos anticuerpos. El proceso anterior se representa en la Figura 3. Además, las perlas pueden ser cambiadas después de una medición inicial para así poder extender el tiempo de medición [13]. Este dispositivo es bastante versátil; sin embargo, utiliza técnicas de fabricación bastante complejas ya que se hace uso de cientos de válvulas para su funcionamiento. Además, esta misma complejidad reduce la capacidad de análisis de células individuales al solo ser posible utilizar 40 cámaras de aislamiento.

Biosensores basados en perlas y arreglos de nanopozos son utilizados por An *et al.* [14] para estudiar cientos de células NK *ex vivo*, revelando que el fenotipo CD16⁺ es responsable de la secreción temprana de IFN- γ , lo cual muestra la existencia de subpoblaciones de células NK polifuncionales (secreción de citotoxinas e IFN- γ), lo cual podría ser de interés en inmunoterapia. Los autores utilizan nanopozos (denominados así por su capacidad volumétrica, ~ 0.2 nL) con un área de $50 \times 50 \mu\text{m}$ y una profundidad aproximada de $84 \mu\text{m}$ fabricados en PDMS en los cuales depositaron perlas de $3 \mu\text{m}$ de diámetro funcionalizadas con anti-IFN- γ . El uso de esta configuración de nanopozos abiertos permite un mejor monitoreo del destino celular al permitir un intercambio de gases y nutrientes continuo, evitando al mismo tiempo el

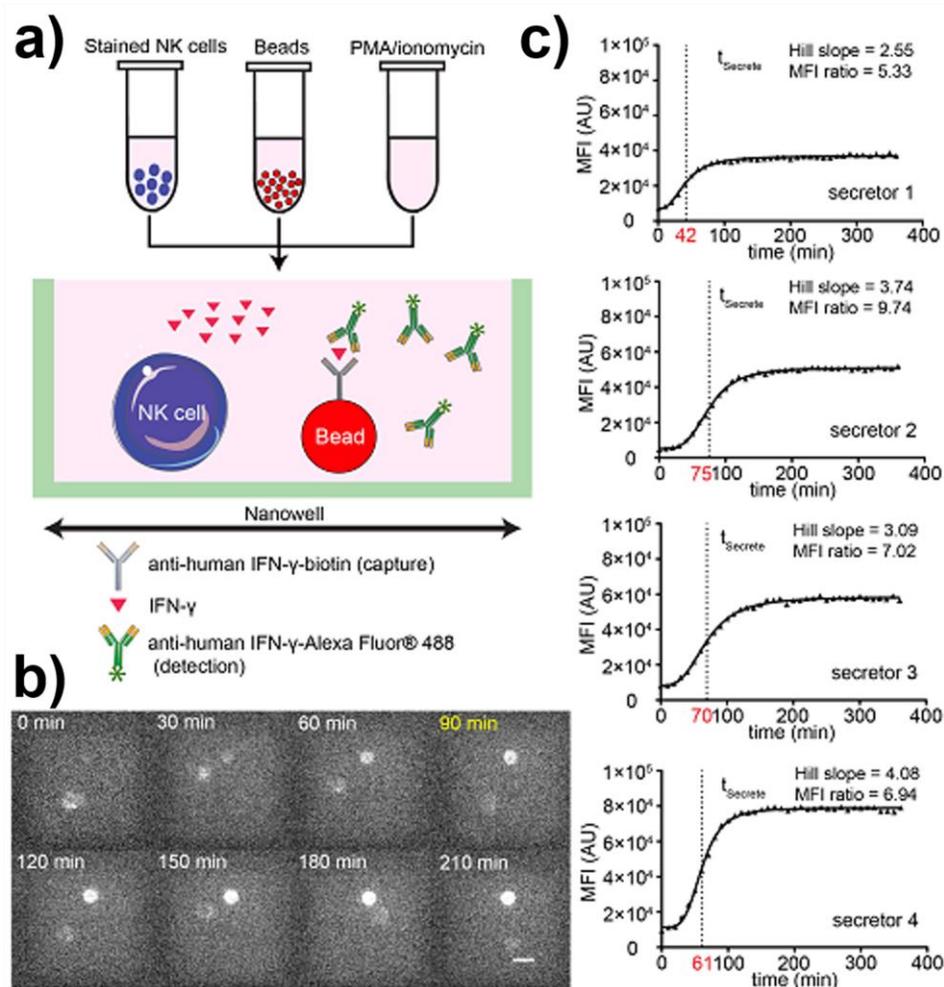


Figura 4– Diagrama del funcionamiento de un nanopozo. (a) Esquema para la detección de IFN- γ secretado por células NK individuales utilizando nanopozos. (b) Seguimiento de la actividad secretora de una célula NK dentro de un nanopozo. El tiempo de secreción es a los 90 min. Barra de escala: 10 μ m. (c) Ejemplos representativos de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las perlas al activarse las células individuales. Modificado de An et al. [14].

aumento artificial en zonas localizadas de analitos, característica común de sistemas cerrados. A todo esto se agrega la posibilidad de estudiar más de 3 500 células individuales [14]. La muestra Figura 4 un esquema del funcionamiento del principio de este dispositivo, así como datos obtenidos experimentalmente.

Por parte de nuestro laboratorio, Cedillo-Alcántar [15] desarrolló un dispositivo microfluídico basado en trampas hidrodinámicas para la captura de células y perlas individuales, donde éstas últimas pueden ser utilizadas como

biosensores, con la posibilidad de detectar proteínas secretadas por las células atrapadas. El sistema microfluídico se esquematiza en la Figura 5 y como se puede ver consiste en tres canales paralelos: el canal central es el más ancho y sobre sus bordes se localizan las trampas, las cuales se comunican con los dos canales laterales a través de un pequeño conducto de conexión. Los canales laterales y de conexión sirven para dirigir el flujo y de esta manera direccionar las perlas o células hacia el lado deseado del canal central. Para el diseño de este dispositivo se hizo uso de simulaciones en el software COMSOL para validar el sistema de direccionamiento por los canales laterales y encontrar el esfuerzo cortante al que estarían sometidas las células dentro de las trampas. Estas simulaciones confirmaron la posibilidad de dirigir el flujo hacia un lado del canal central y mostraron que el esfuerzo de corte sobre las células capturadas es menor a 250 Pa, valor mucho mayor al rango de 1-70 Pa encontrado normalmente en arterias [16]. No obstante, la autora realizó pruebas con células monocíticas THP-1 y encontró que la viabilidad celular era del 97%, aunque con una eficiencia de captura de perlas y células del 58% [15].

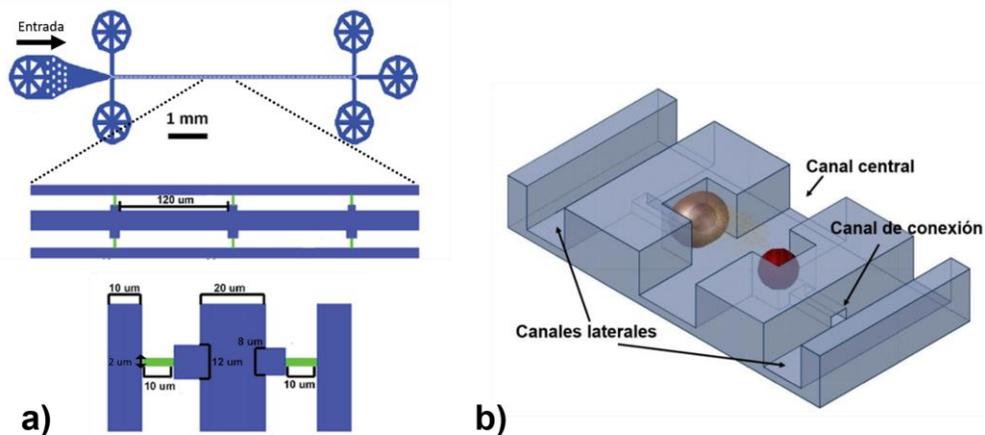


Figura 5 – Esquema del dispositivo de Cedillo-Alcántar. (a) Diagrama del dispositivo completo (arriba), acercamiento a los tres canales paralelos con trampas (en medio) y acercamiento a las trampas (abajo). (b) Esquema tridimensional del sistema con tres canales paralelos. El canal central tiene trampas a sus lados, de uno para células y del otro para perlas. Las trampas se concentran a los canales laterales por canales estrechos llamados de conexión. Modificado de Cedillo-Alcántar [15].

El sistema propuesto por Cedillo-Alcántar [15] es sencillo y factible de producir, aunque se tienen aspectos a mejorar como la disminución del esfuerzo cortante al que se ven sometido las células, aumentar la eficiencia de captura tanto de perlas como de células, así como disminuir la contaminación entre trampas, ya que el dispositivo no provee de un confinamiento a las células y perlas, por lo que no se asegura que no haya un intercambio de partículas entre distintas trampas.

1.2 MODELO COMPUTACIONAL

El modelado computacional es el uso de computadoras para simular y estudiar el comportamiento de sistemas complejos utilizando como base un modelo matemático. Los resultados de las simulaciones ayudan a realizar predicciones sobre que podría pasar en el sistema real estudiado en respuesta a condiciones cambiantes. Estas simulaciones facilitan la investigación al realizar cientos de experimentos con distintas variables en un tiempo relativamente corto, a partir de donde se podrán identificar los experimentos físicos que tienen mayor probabilidad de ayudar a encontrar la solución del problema estudiado [17].

La creación del modelo matemático a partir de un problema físico requiere ciertas suposiciones que llevan a la definición de ecuaciones diferenciales que lo gobiernan bajo ciertas condiciones iniciales y de frontera. Estas últimas son valores físicamente significativos que la solución debe tener en ciertos puntos del dominio para ser válida [18]. Sin embargo, la solución exacta para este sistema de ecuaciones, que satisfaga todas las condiciones de frontera, es posible solo para modelos matemáticos relativamente simples. En general, procedimientos numéricos deben ser empleados para resolver el problema [17].

El análisis de elemento finito (FEA, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos utilizados para la solución de estos modelos [17]. El concepto general de este es la discretización del dominio de interés, utilizando una malla

conformada usualmente por triángulos, para poder encontrar soluciones locales en estos componentes más pequeños. El conjunto de soluciones locales es entonces reagrupado para conformar una solución global [18]. En un inicio, el método de elemento finito fue desarrollado para el análisis de problemas de mecánica estructural en ingeniería. Sin embargo, pronto se reconoció que la técnica podría ser aplicada a la solución de otras clases de problemas, tales como el flujo de fluidos y transferencia de calor [17].

La solución obtenida por elemento finito resolverá únicamente el modelo matemático y todas las suposiciones en este se verán reflejadas en la respuesta predicha, es decir, la información obtenida solo será la que se encuentre en el modelo, el cual puede no corresponder a la realidad física. Es por esto que la elección del modelo matemático es crucial para el entendimiento obtenido del fenómeno [17]. De manera general, el diagrama de la Figura 6 muestra el proceso de resolución de un problema a través del elemento finito.

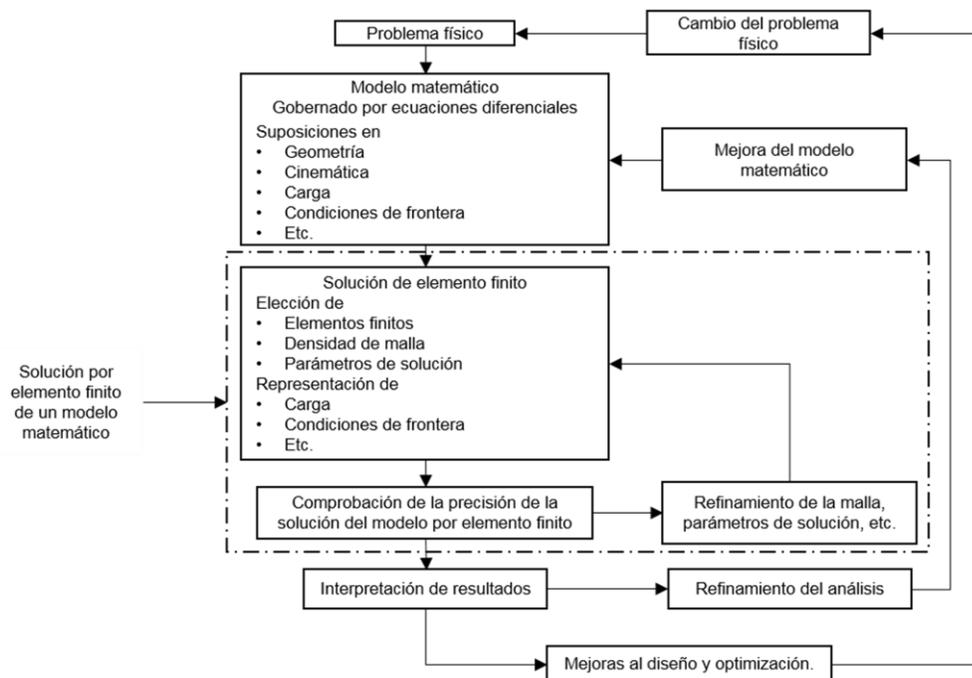


Figura 6 – Proceso del análisis de elemento finito. Modificado de Bathe [17].

En el campo de la microfluídica, el empleo de modelos computacionales se ha utilizado en distintas ocasiones para la medición del desempeño de un dispositivo antes de su fabricación. Por ejemplo, Xu *et al.* [19] utilizan simulaciones de dinámica de fluidos computacional (CFD, por sus siglas en inglés) para determinar los parámetros óptimos de geometría y velocidad en su dispositivo de trampas hidrodinámicas. Un esquema del dispositivo de estos autores, así como una simulación utilizada para comprobar la efectividad de su análisis, se muestra en la Figura 7. Como se observa, la trampa tiene como base un canal rectangular con una entrada a la izquierda y salida a la derecha. Al centro del canal se tienen una matriz de trampas trapezoidales. Un modelo computacional en COMSOL Multiphysics fue desarrollado para este dispositivo, el cual resuelve el fluido que desplaza a la partícula, la dinámica elástica de la partícula y la interacción entre el flujo y sólidos. A través de una selección adecuada de malla, pasos de tiempo, los autores obtienen los resultados mostrados en Figura 7(b). Estos muestran el desplazamiento de una partícula en el canal y se usa para validar la simulación al compararse con resultados experimentales. Este modelo es entonces utilizado para estudiar diversas variables que no son fácilmente medibles en modelos experimentales. Por ejemplo, estos autores estudiaron el esfuerzo de von Mises en la partícula en diferentes tiempos. El esfuerzo de von Mises representa una cuantificación de la falla de un sólido ante determinada carga. La Figura 7(c) muestra los resultados en el tiempo final, en donde es posible observar un esfuerzo máximo en los puntos de contacto de la partícula con la trampa. La investigación de esfuerzos es útil si la partícula representa componentes biológicos (ej. células sanguíneas), pues estos son sensibles a la deformación causada por estos esfuerzos. Xu *et al.* concluyen que su modelo resulta útil para estudiar no solo el desplazamiento de la partícula, sino diversos parámetros difícilmente cuantificables por experimentos, como lo son el esfuerzo, el campo de presión y de velocidad [19].

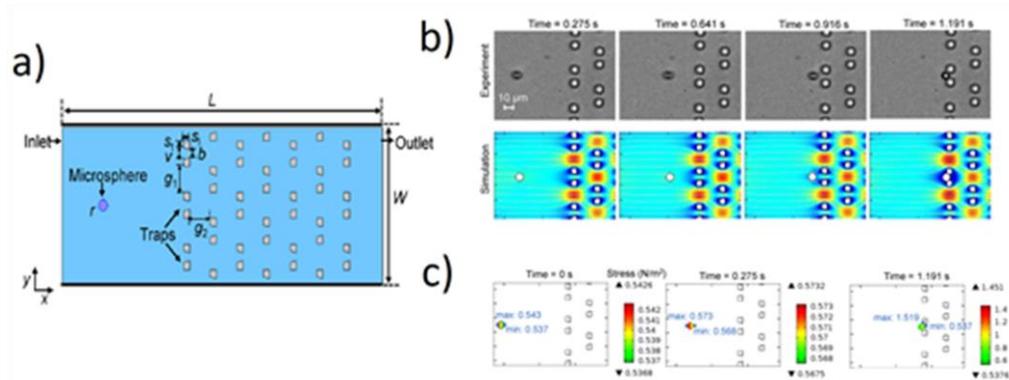


Figura 7 – Funcionamiento de trampas hidrodinámicas de Xu et al. (a) Diagrama esquemático del dispositivo microfluídico de trampas hidrodinámicas. Las trampas tienen una geometría de surcos trapezoidales y se encuentran dispuestas en una matriz periódica. Una solución líquida transporta las partículas desde la entrada a la izquierda, a través del canal, hasta la salida a la derecha. Los símbolos en el esquema representan: L , longitud del canal; W , ancho del canal; H , altura del canal; v , ancho de entrada de la trampa; b , ancho de salida de la trampa; s_t , ancho de las paredes de trampa; s_l , longitud de las trampas; g_1 , distancia entre trampas de una misma fila; g_2 , distancia entre filas de trampas. (b) Posición de la partícula en cuatro tiempos diferentes en experimento y simulación. La simulación muestra además el campo de velocidad en color y las líneas de flujo en blanco. (c) Esfuerzo de von Mises en la partícula al segundo 1.191. El color representa la distribución de la magnitud del esfuerzo y los puntos, el máximo y mínimo esfuerzo en la partícula. Modificado de Xu et al. [19].

Un dispositivo de trampas hidrodinámicas también fue diseñado por Sohrabi & Packirisamy [20] con ayuda de un modelo computacional. El esquema del dispositivo se muestra en la Figura 8(a). Este consiste en un canal principal, donde se encuentra dos filas de trampas trapezoidales opuestas, con una entrada y salida. El principio bajo el cual estas trampas funciona es el de la trayectoria con menor resistencia (explicado en mejor detalle en el capítulo 5), donde la sección detrás de las trampas tiene una resistencia fluidica menor a la del canal principal, por lo que las partículas tenderán a ir hacia este lugar, quedando atrapadas en su intento. Los autores desarrollan un modelo CFD para encontrar los parámetros geométricos que optimizaran el desempeño del dispositivo. Tres conjuntos de parámetros son probados, y entre otras cosas, se obtiene la probabilidad de captura de partículas para cada uno de los diseños utilizados. Esta probabilidad fue calculada utilizando la razón entre el flujo volumétrico pasando a través de la n -ésima trampa y el flujo total de entrada. Los resultados se muestran en la Figura 8(b). Como se aprecia, el diseño 3 es el que obtuvo la mayor cantidad de captura. Experimentalmente,

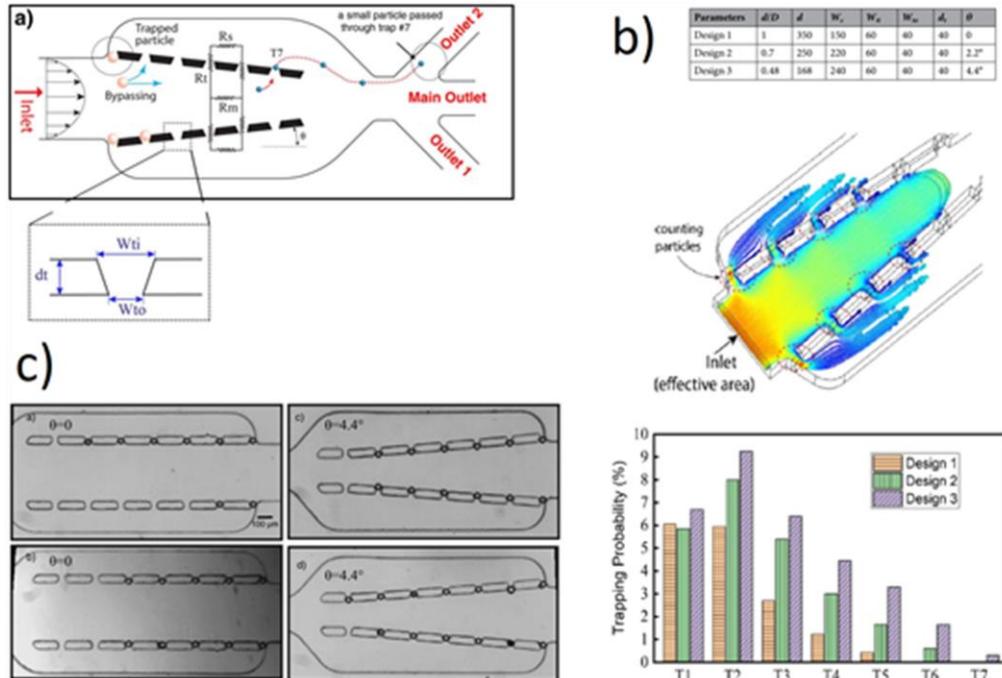


Figura 8 – Optimización de trampas por Sohrabi & Packirisamy. (a) Esquema que muestra el concepto de funcionamiento del dispositivo de resistencias fluidicas, donde R_m es la resistencia del canal principal, la cuál es mayor a la resistencia de los canales laterales R_s . También se muestran las dimensiones en el dispositivo: W_{ti} , ancho de entrada de la trampa; W_{to} , ancho de la salida de la trampa; d_t , longitud de la trampa; D , ancho de entrada; d , ancho de salida; L , longitud del canal; W_s , máximo ancho del canal lateral; y θ , ángulo de la fila de trampas. (b) Parámetros geométricos para cada diseño (arriba), muestra de simulación de donde se obtienen las partículas a la entrada y las que pasan por las trampas (abajo, izquierda) y probabilidad de captura para cada trampa en cada diseño. (c) Micrográficas de la captura de partículas para el diseño 1 y 3 después de 15 minutos bajo las mismas condiciones de flujo. Modificado de Sohrabi & Packirisamy [20].

se comparó el diseño 1 y 3 y lo obtenido de los resultados es que hay una mejor eficiencia en las trampas del último diseño, tal como lo predijo la simulación [20]. imágenes del experimento se pueden ver en la Figura 8(c). El uso del modelo computacional es de nuevo validado por los experimentos, lo que permite utilizar al primero para el estudio de diferentes propiedades del sistema.

Por otro lado, en microfluídica no solo se han utilizado los modelos computacionales para entender la dinámica de fluidos en los dispositivos, también se han creado modelos para estudiar el comportamiento de biosensores. Por ejemplo, en el trabajo de An *et al.* [14] hablado anteriormente, donde se integran arreglos de nanopozos y biosensores basados en perlas, se hizo uso de simulaciones de elemento finito para encontrar la concentración

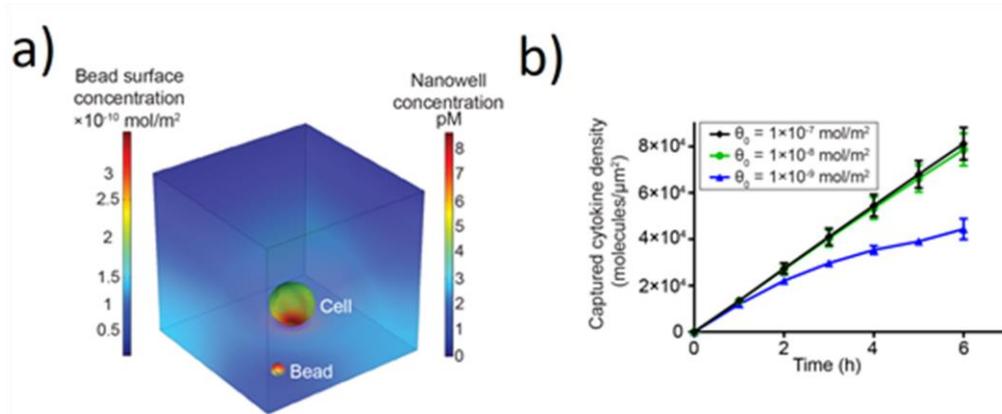


Figura 9 – Simulación de perla en nanopozo por An *et al.* (a) Resultado de la simulación después de 5 horas. En el volumen representado se tienen inmersos la célula secretora (10 moléculas/s) y una perla donde se encuentran los anticuerpos en diferentes concentraciones superficiales. En color se indican la concentración volumétrica y la concentración superficial de citocinas capturadas por anticuerpos. (b) Variación en la densidad de citocinas capturadas de acuerdo con la densidad de anticuerpos sobre la perla en función del tiempo. Modificado de An *et al.* [14].

de anticuerpos sobre las perlas que permitiera una captura óptima de citocinas. La solución se encontró utilizando el módulo de reacción química de COMSOL Multiphysics, el cual resuelve el modelo de balance de masas que involucra la difusión de analito en el medio y su adsorción sobre la superficie de las perlas. Los resultados mostraron que el incremento de densidad de anticuerpos en la perla no aumentaba significativamente la captura de analito después de un rango de 10^{-8} - 10^{-7} mol/m², por lo que este fue el rango de densidad de analitos para cubrir las perlas. Además, en este rango, la densidad citocina capturada incrementa linealmente con el tiempo, como se observa en la Figura 9.

Un ejemplo más de modelamiento en biosensores es el trabajo realizado por Zhan *et al.* [21]. Los ensayos de flujo lateral (LFA, por sus siglas en inglés) son una clase de pruebas diagnósticas que utilizan nanopartículas de oro (GNP, por sus siglas en inglés) cubiertas de anticuerpos para detectar un analito de interés al quedar atrapados en una membrana de captura, el complejo es visible y es usado para determinar el resultado de la prueba. El funcionamiento general se observa en la Figura 10(a). Zhan *et al.* Desarrollaron un modelo computacional para estudiar la importancia del tamaño de las GNP en el mejoramiento de un LFA. El modelo describe dos fenómenos principales de la

prueba, el flujo por capilaridad a través del dispositivo y la reacción entre el analito, las GNP y la membrana de captura. Un primer caso se simuló sin reacción con el analito, para determinar la captura de las GNP por la membrana. Los resultados se presentan en la Figura 10(b) y (c). Se observa como el modelo predice que las GNP serán capturadas en forma de arco menguante debido a la alta afinidad del anticuerpo en la membrana. Esta misma geometría se observa también en pruebas experimentales, validando el modelo. En la misma simulación, se varió paramétricamente la constante de reacción efectiva, la cual se definió de manera proporcional a la superficie de las GNP. Los resultados indican que una mayor superficie provoca una mejor

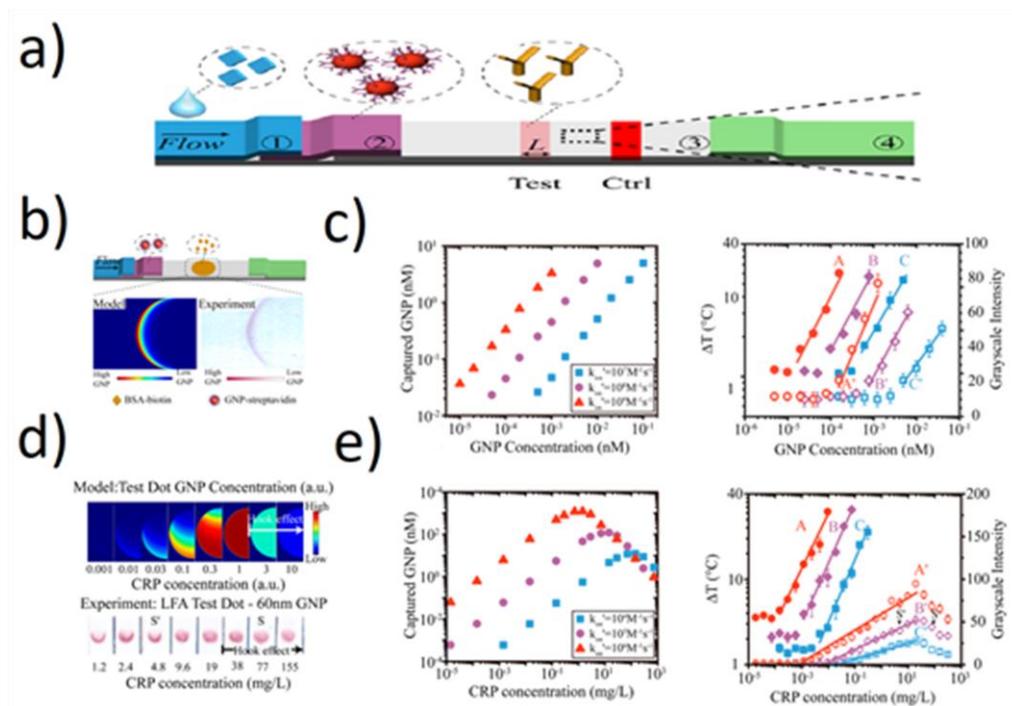


Figura 10 – Estudio del comportamiento de un sistema LFA por simulaciones. (a) Esquema de un LFA: (1) Zona de muestra, (2) zona de GNP, (3) membrana y (4) zona evaporativa. La membrana de captura se encuentra indicada en rosa; la membrana de captura de control en rojo. (b) Esquema del modelo solo con la reacción GNP-membrana. A la izquierda los resultados de la simulación y a la derecha el experimento. Una mayor tonalidad roja indica mayor presencia de GNP capturadas. (c) A la izquierda, resultados del modelo para la captura de GNP para diferentes constantes de reacción efectiva en función de la concentración inicial de GNP; a la derecha, resultados experimentales de señales térmicas para GNP de 30, 60 y 100 nm de diámetro. La comilla después de la letra indica señal visual y su ausencia señal térmica. (d) A la izquierda, resultados del modelo para la captura de GNP en función de la concentración de analito inicial para diferentes constantes de reacción efectiva; a la derecha, resultados experimentales de señales térmicas para GNP de 30, 60 y 100 nm de diámetro. (e) Resultados visuales del modelo y del experimento. Modificado de Zhan et al. [21]

captura de las GNP por la membrana. El segundo caso implicó la unión tipo sándwich entre el analito, GNP y membrana. Los resultados del modelo muestran de nuevo que una mayor constante de reacción efectiva aumenta la captura de GNP en la membrana, aunque, ahora se presenta un efecto “gancho” para ciertas concentraciones de analito. Sin embargo, la simulación también predice una captura no homogénea en la membrana de captura, lo cual puede ser usado semicualitativamente para evitar el efecto gancho también predicho [21]. Experimentos realizados después comprueban ambas predicciones, mostrándose en la Figura 10(d).

Algo presente en todos los trabajos descritos anteriormente y otros tantos más en la literatura [22,23], es el uso del software COMSOL para el modelado del fenómeno de interés en cada investigación. COMSOL es un paquete computacional para el análisis de elemento finito aplicado a diversos problemas físicos y de ingeniería, especialmente aquellos con fenómenos acoplados o de multifísica [23]. La versatilidad, flexibilidad y usabilidad de COMSOL se deben a la facilidad con la que se pueden utilizar sus módulos “*add-on*” (ej. módulo de reacción química y CFD), así como por la manipulación de las ecuaciones subyacentes de la física utilizada [24]. Esto ha posicionado al software como uno de los preferidos cuando se trata de modelar un sistema microfluídico y por la cual fue utilizado en la elaboración del presente trabajo.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó en párrafos anteriores, el interés por realizar estudios que tomen en cuenta la heterogeneidad celular ha propiciado el desarrollo de tecnologías capaces de realizar ensayos sobre células individuales, solucionando los problemas que este análisis implica. En este trabajo, se ha hablado específicamente de desarrollos para el análisis del secretoma. Estos hacen uso de métodos como la dispersión interferométrica [12] e inmunoensayos [13,14] para la detección de analito (proteínas) y utilizan trampas hidrodinámicas [15,19,20], nanopozos [14] y cámaras operadas por válvulas [13] como técnicas de captura.

Los trabajos antes mencionados logran su objetivo, algunos con resultados comparables a técnicas convencionales [14]. Es posible atribuir tal eficiencia al uso de métodos computacionales que permitieron a los autores probar y mejorar sus dispositivos en cuestiones como el diseño geométrico de las trampas hidrodinámicas [19,20], los flujos de entrada [20,21], la concentración de anticuerpos en las superficies de detección [14,21], sus constantes de disociación [21], entre otras.

De la misma forma, se pretende realizar un procedimiento similar con el dispositivo de captura y análisis de célula única con perlas propuesto por Cedillo-Alcantar [15], optimizando su diseño a partir de modelos computacionales para así lograr mejores resultados.

2 HIPÓTESIS

El uso de simulaciones permitirá analizar el desempeño de un dispositivo de trampas hidrodinámicas para el análisis de célula única por medio de perlas funcionalizadas con anticuerpos y la posibilidad de optimizar su función.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Entender la cinética de adsorción del entorno microfluídico con biosensor basado en perlas para el análisis de célula única y el sistema de captura hidrodinámica a través de simulaciones para la optimización del dispositivo microfluídico.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar el análisis del modelo computacional para la secreción y adsorción de analito, por parte de la célula y perla en el dispositivo.
- Modificar los parámetros pertinentes a la geometría del canal principal, las tasas de adsorción/desorción, números de sitios de unión y difusividad en el modelo para sugerir una mejora en el diseño que aumenta la cobertura y disminuya la contaminación.
- Realizar el análisis del modelo computacional para el flujo de captura en el dispositivo.
- Modificar parámetros geométricos del canal principal y los canales laterales en el modelo para sugerir una mejora en el diseño que aumente la tasa de captura de perlas y células, así como reducción del esfuerzo cortante.

4 DIFUSIÓN Y ADSORCIÓN DE ANALITO

4.1 MARCO TEÓRICO

Una gran parte de las mediciones realizadas en biología requieren de una reacción del analito en solución con receptores sobre una superficie. Por ejemplo, los microarreglos de ADN y proteínas, la resonancia plasmónica de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) y los inmunoensayos [25]. En estos últimos, existen ciertas tecnologías en donde los receptores (también llamados ligandos o, más específicamente, anticuerpos) se encuentran anclados a partículas que proveen una fácil detección y manipulación. Estas partículas biofuncionalizadas son entonces utilizadas para la captura de biomarcadores específicos (analitos) [26], función ejemplificada en trabajos como [13,14,21], que se describen en la sección anterior.

El principio de estas tecnologías puede representarse como reacciones en una superficie funcionalizada con receptores en una interfaz sólida-líquida. En lo anterior es posible diferenciar dos eventos principales: la reacción de superficie y el transporte de masa [22].

En la reacción de superficie, el analito se une a los ligandos sobre esta última, formando un complejo ligando-analito:



Mientras que, en el transporte de masa, el analito se mueve de la solución en el volumen hacia la superficie de reacción:



donde $[A]_b$ es la concentración de analito en el volumen, $[A]_s$ es la concentración de analito en la superficie, $[B]$ es la concentración de ligando funcionalizado en la superficie y $[AB]$ es la concentración de ligando-analito en la superficie.

En el caso de biología molecular, se asume que la mayoría de las reacciones que involucran uniones reversibles obedecen al isotermino de Langmuir, por lo que este es el utilizado para modelar los fenómenos de adsorción/desorción [27]. El isotermino de Langmuir es esencialmente un sistema de primer orden entre las moléculas en el volumen en la interfaz (es decir, las moléculas sobre la superficie, $[A]_s$) y los sitios disponibles para adsorción (receptores o ligandos libres, $[B]_0 - [AB]$), con una tasa de adsorción k_{on} y una tasa de desorción k_{off} [28]. Este sistema puede ser escrito como:

$$\frac{\partial[AB]}{\partial t} = k_{on}[A]_s([B]_0 - [AB]) - k_{off}[AB], \quad (4.3)$$

cuyas variables $[AB]$, $[A]$ y $[B]_0$ tienen unidades de concentración (ej. M), k_{on} tiene unidades de eficiencia $((M \cdot s)^{-1})$ y k_{off} de tiempo inverso (s^{-1}) [29].

Si se asume que $[A]_s$ es un valor constante, la ecuación (4.3) es fácilmente resuelta, obteniendo lo siguiente:

$$[AB] = [AB]_{max}(1 - \exp(-t/\tau_R)), \quad (4.4)$$

en donde $[AB]_{max} = [A]_s[B]_0/([A]_s + K_D)$ es la concentración de complejo alcanzada en el equilibrio, $K_D = k_{off}/k_{on}$ es la constante de disociación y $\tau_R = (k_{on}[A]_s + k_{off})^{-1}$ es el tiempo característico de la reacción [25].

La constante de disociación, K_D , representa la concentración de analito a la cual los sitios de unión estarán ocupados en un 50%, por lo que esta es una medida de la fuerza de interacción: una baja K_D representa una alta afinidad. Preferente, esta constante debe estar dentro del rango dinámico del sensor, es decir, dentro de las concentraciones de analito que se desean detectar [30]. Por otro lado, el tiempo característico τ_R describe el tiempo para que la reacción alcance el equilibrio. En concentraciones altas ($[A] \gg K_D$), el tiempo característico refleja cuanto tiempo necesita la tasa k_{on} para entregar suficientes moléculas a la reacción, mientras que en soluciones diluidas ($[A] \ll K_D$) expresa el tiempo requerido para la desunión [25].

Lo anterior es una simplificación que asume que las moléculas de analito son puestas en contacto inmediato con la superficie de reacción, siendo la tasa de reacción obtenida la más rápida posible para el sistema [31]. Sin embargo, rara vez la tasa de reacción intrínseca (como se le llama a esta) es la observada, puesto que el transporte de masa juega un papel crítico en la cinética de reacción, especialmente en bajas concentraciones [32].

El transporte de masa puede describirse a través de la ecuación general de conservación:

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{N} + R_b, \quad (4.5)$$

donde $\mathbf{N} = -D \cdot \nabla[A] + \mathbf{u}[A]$ es la tasa de flujo molar, D es el coeficiente de difusión de analito en el solvente, \mathbf{u} es el perfil de velocidad del fluido y R_b es la tasa de reacción de analito en el volumen [27]. El lado izquierdo de la ecuación (4.5) representa el cambio de concentración local, mientras que el lado derecho al transporte por difusión y convección.

La tasa de flujo molar del analito hacia la superficie reactiva se encuentra acoplada a la tasa de reacción en la superficie, dando lugar a la siguiente condición de frontera:

$$\hat{\mathbf{r}} \cdot \mathbf{N} = \frac{\partial[AB]}{\partial t}, \quad (4.6)$$

para la cual, $\hat{\mathbf{r}}$ es el vector unidad de la superficie, perpendicular y apuntando hacia el medio.

En un caso simplificado, se considera una convección nula y ausencia de reacciones en el volumen, por lo que el flujo molar se da puramente por difusión. Esta última representa el flujo de partículas en cierta dirección del volumen como consecuencia de un movimiento aleatorio o Browniano. El movimiento está caracterizado por la ecuación de distancia:

$$\langle x \rangle^2 = qDt, \quad (4.7)$$

donde $\langle x \rangle^2$ es el desplazamiento cuadrático medio y q es una constante numérica que depende de la dimensionalidad ($q = 4$ para 2 dimensiones y 6 para 3 dimensiones). El coeficiente de difusión D es característico para cada tipo de molécula y el solvente donde se encuentra, siendo afectado por diferencias en el tamaño del soluto e interacciones no covalentes. El D se encuentra definida formalmente por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{\bar{f}}, \quad (4.8)$$

para la cual k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y \bar{f} es el coeficiente de arrastre [31].

Un número característico que emerge de un sistema de transporte de masa y de reacción es el número de Damkohler, Da . Este número puede definirse cómo:

$$Da = \frac{k_{on}[B]_0 \delta'}{D}, \quad (4.9)$$

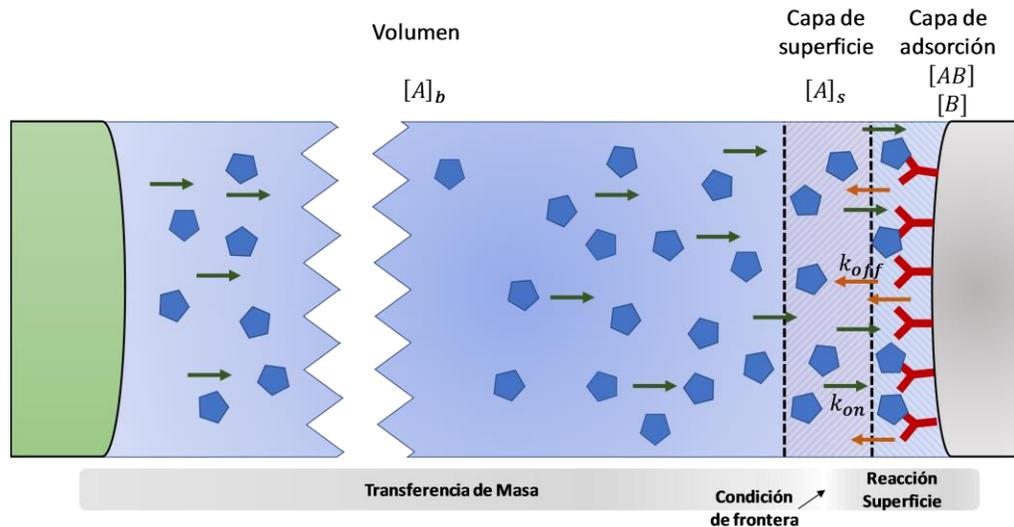


Figura 11 – Esquema del proceso de adsorción-difusión para el modelo de este trabajo. A la izquierda en verde, la célula secretora de analito (A). Por difusión, el analito se mueve por el volumen hasta llegar a la denominada capa de superficie, a la derecha. Esta capa actúa como interfaz entre el flujo provocado por la difusión y el flujo provocado por la reacción en la capa de adsorción.

donde δ' es la distancia característica del sistema. Este número representa una razón entre el flujo difusivo y el flujo reactivo. Si $Da \gg 1$, el sistema está limitado por el transporte de masa (la reacción es muy rápida) y, por el contrario, si $D \ll 1$ la reacción será la limitante (transporte rápido) [25].

Las ecuaciones **(4.3)** y **(4.5)**, junto a la condición de frontera **(4.6)** forman un sistema no lineal de ecuaciones diferenciales parciales, de tal complejidad que usualmente no es posible resolver analíticamente. El objetivo del modelo computacional es describir la evolución espaciotemporal de los componentes moleculares del soluto disuelto en un medio homogéneo a través de la solución por métodos numéricos dado el sistema de ecuaciones diferenciales descrito anteriormente.

4.2 CONDICIONES DE SIMULACIÓN

Las simulaciones fueron realizadas en COMSOL Multiphysics 4.2, utilizando el módulo de ingeniería química de reacción, con las interfaces de transporte de especies diluidas (*tds*) y de reacción de superficie (*sr*). La interfaz *tds* permite calcular el campo de concentración de un soluto diluido en una concentración al menos 10 veces menor al solvente, donde el transporte del primero puede ser por difusión, convección (ligado a flujo fluídico) y migración (referente a un campo eléctrico). En las simulaciones descritas a continuación solo se utiliza el transporte por difusión. Por otro lado, la interfaz de reacción de superficie se utiliza para modelar las reacciones químicas entre especies de volumen y superficie.

Para lograr condiciones similares a las esperadas en la realidad, se encontraron tres valores constantes a través de todas las simulaciones: la tasa de secreción de proteína por la célula, las tasas de asociación/disociación del complejo antígeno-anticuerpo y la constante de difusión de la proteína. La proteína que se decidió tomar como modelo es el tumor de necrosis alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) secretado por leucocitos, debido a la facilidad de

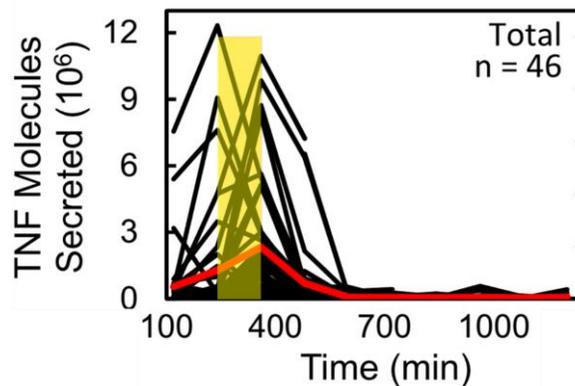


Figura 12 – Secreción de TNF- α en respuesta a un estímulo de LPS (barra amarilla) por dos horas en 46 células. La línea roja representa el promedio. Modificado de Junkin *et al.* [13].

obtener células primarias de este tipo y la facilidad con la que el primero es secretado por las células ante diversos estímulos proinflamatorios.

El trabajo realizado por Junkin *et al.* [13] fue utilizado como referencia en la tasa de secreción, cuyos experimentos involucran un dispositivo microfluídico capaz de medir secreciones de célula única utilizando perlas. En una de sus pruebas, se utilizan macrófagos (RAW 264.7) para estudiar su secreción de TNF- α por 14 horas, durante las cuales se estimula a las células con LPS¹ (500 ng/mL) por dos horas. En las gráficas de la Figura 12, se observa una secreción dispar entre las 46 células estudiadas al final del estímulo con LPS, con un pico promedio de secreción de aproximadamente 3×10^6 moléculas de TNF- α , lo cual obtiene tasas de secreción en el rango de centenas de moléculas por segundo.

Por otro lado, simulaciones realizadas por Han *et al.* hacen uso de magnitudes similares refiriéndose a la secreción en linfocitos para citocinas de manera general [33]. Autores diferentes utilizan valores en ordenes inferiores para simulaciones similares ([14,34]), sin embargo, por lo expuesto en los experimentos de Junkin *et al.* [13], se considera que utilizar una tasa de secreción de 100 moléculas/s es adecuado para el propósito de este trabajo.

¹ Lipopolisacárido bacterial

Debido a que las ecuaciones de transporte y reacción en superficie describen el proceso en términos de flujos molares, se realizó una conversión de la tasa de secreción en partículas por segundo de la siguiente manera:

$$T_S \left(\frac{1}{N_A} \right) \left(\frac{1}{A_S} \right) = T_{FM}, \quad (4.10)$$

en donde T_S es la tasa de secreción en partículas/s, N_A es la constante de Avogadro en mol^{-1} , A_S es el área superficial de la célula secretora (suponiendo un diámetro de $8 \mu\text{m}$) y T_{FM} es la tasa de flujo molar de secreción en $\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.

La tasa de asociación/disociación para el $\text{TNF-}\alpha$ y el anti $\text{TNF-}\alpha$ fueron obtenidas del trabajo de Choi et al. [35]. En este, Choi et al. utilizan un dispositivo microfluídico con un sensor de cristal fotónico integrado para determinar las constantes cinéticas de las curvas de asociación y disociación obtenidas de un cambio en el valor pico de la longitud de onda de la luz reflejada sobre la superficie del sensor [36]. El anticuerpo fue biotinilado para que de esta manera se pudiera unir a una capa de estraptavidina funcionalizada sobre la superficie del sensor. Los resultados del trabajo dan un valor de 0.0176 s^{-1} para la tasa de desorción (k_{off}) y un valor de $0.121 \mu\text{M}$ para la constante de disociación [35]. De acuerdo con la relación entre estas constantes, se obtiene la constante de asociación con un valor de $1.45 \times 10^2 \text{ m}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$.

Las condiciones de difusión generales se consideraron en un medio acuoso, en donde el volumen de $\text{TNF-}\alpha$ es mucho mayor que el de otros solutos. Edelstein-Keshet & Spiros [37] establecen la constante de difusión del $\text{TNF-}\alpha$ con un valor de $3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ con base en el trabajo de Goodhill [38] donde se obtiene de manera experimental la constante de difusión para esta citocina en el citoplasma. El valor de Edelstein-Keshet & Spiros proviene de la ecuación modificada de Polson, la cual es una alternativa semiempírica a la ecuación de Stokes-Einstein (4.8) y que establece directamente una relación entre el peso molecular y la constante de difusión:

$$D = \frac{(9.4 \times 10^{-15})T}{\mu M_w^{1/3}}, \quad (5.11)$$

donde T es la temperatura del medio, μ es la viscosidad del solvente y M_w es el peso molecular del solvente.

La constante de difusión mencionada anteriormente es para una difusión del TNF- α en citoplasma, por lo que se debe encontrar la constante para un medio acuoso. Goodhill [38] hace mención de la relación entre D_{agua} y $D_{citoplasma}$ para dos moléculas de diferente peso molecular: sacarosa (0.324 kDa) y BSA (68 kDa) con una razón $D_{agua}/D_{citoplasma}$ igual a 2 para el primero y 71 para el segundo. Interpolando en función del peso molecular, se sugiere que el TNF- α (17 kDa) tiene una razón de difusión aproximada a 10, por lo que su coeficiente de difusión en agua sería del orden de $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. El valor anterior es comparable con otros trabajos [14,33,34], por lo que un valor de $3 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ fue seleccionado para realizar las simulaciones.

El modelo del dispositivo en las simulaciones fue bidimensional, debido a la facilidad con la que se trabaja reduciendo el número de dimensiones, al disminuir de manera considerable el tiempo de resolución por el software. De acuerdo con los tiempos de difusión, esta no debería verse afectada por un cambio en la profundidad ya que, con la ecuación de distancia (4.7) y con la constante de difusión mencionada en párrafos anteriores se tiene un tiempo de difusión de aproximadamente 1.6 segundos, como se observa en la Figura 13. Esto implica que valores suficientemente mayores a este tiempo, no verán una diferencia significativa en el transporte por difusión, pues ya se abran desplazado las moléculas en esta dirección.

Con esto, se muestra en la Figura 13 el esquema general del modelo utilizado en las simulaciones, con modificaciones específicas para cada una. Las partes del modelo relevantes en la reacción de superficie son las células, vistas en la parte inferior, de las cuales solo una secreta la proteína al medio; las perlas que se encuentran en la parte superior, donde todas tienen las mismas

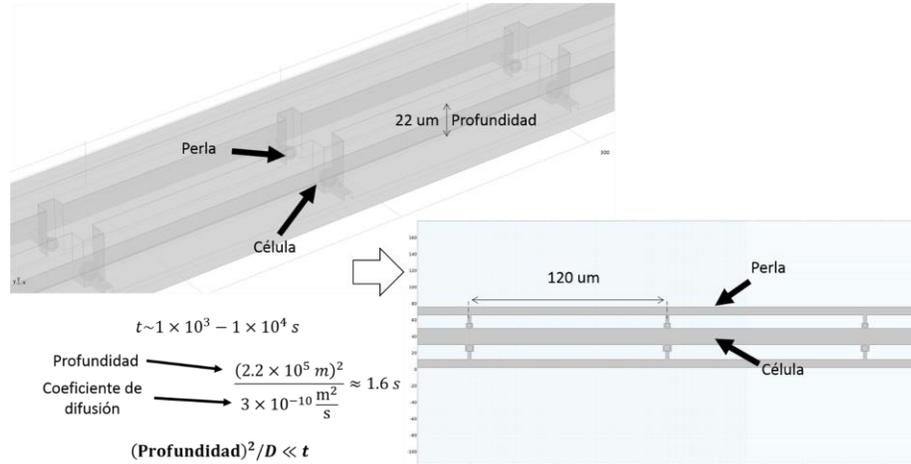


Figura 13 – Esquema general de la geometría utilizada en las simulaciones. Los componentes principales en la reacción de superficie son las células, con una única célula secretora y las perlas, diferenciadas únicamente en su posición relativa a la célula secretora. El volumen del sistema lo comprenden el canal principal, los canales laterales, de conexión y las trampas.

características de adsorción y solo se diferencian por su posición relativa a la célula secretora. El volumen del modelo lo componen el canal principal al centro y que sirve como separación entre perlas y células, las trampas donde residen las perlas y células, los canales laterales y los canales de conexión que conectan las trampas con los canales laterales.

De las simulaciones se tomaron dos valores específicos para la evaluación de los modelos. El primero de estos representa la cobertura de la superficie de la perla con complejos TNF- α y antiTNF- α , cuyo valor numérico proviene de la concentración superficial de analito-ligando ($[AB]$) en el contorno del círculo representante de la perla correspondiente. El segundo valor es la contaminación entre trampas aledañas, que se obtiene de la siguiente expresión:

$$S = (1 - (\phi_{Pb} - \phi_{Pc}))^2 \quad (4.12)$$

donde ϕ_n es una razón entre la concentración superficial $[AB]$ en la perla respectiva y la concentración superficial mínima detectable por inmunofluorescencia:

$$\phi_n = \frac{[AB]_n}{200 \left(3.024 \times 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{m}^2} \right)} \quad (4.13)$$

El valor de la concentración superficial mínima detectable se obtuvo a partir de experimentación con perlas recubiertas con estraptividina (3×10^6 perlas/mL, SVP-60-5, Spherotech Inc.). Estas perlas fueron funcionalizadas con antiTNF- α (biotinilado, 250x antiTNF detection Ab, Thermo Fisher Scientific Inc.) y sumergidas en soluciones con diferentes concentraciones de proteína TNF- α . La adsorción de la proteína al anticuerpo fue medida utilizando un anticuerpo secundario, antiTNF- α con ficoeritrina para el marcaje fluorescente. Las imágenes de fluorescencia y la curva de calibración resultante se observan en la Figura 14. La concentración de 5.5 ng/mL (3.67×10^{-7} mol/m³) de TNF- α mostró la fluorescencia mínima detectable al tener esta un valor distinguible del fondo en la gráfica.

Asumiendo que las perlas tienen una concentración superficial de anticuerpo en una magnitud próxima a 10^{-7} mol/m² y de acuerdo con la ecuación para complejo analito-ligando en estado estacionario, la concentración de TNF- α capturado por el anticuerpo en la superficie de la perla para la concentración de proteína mínima detectable debió ser:

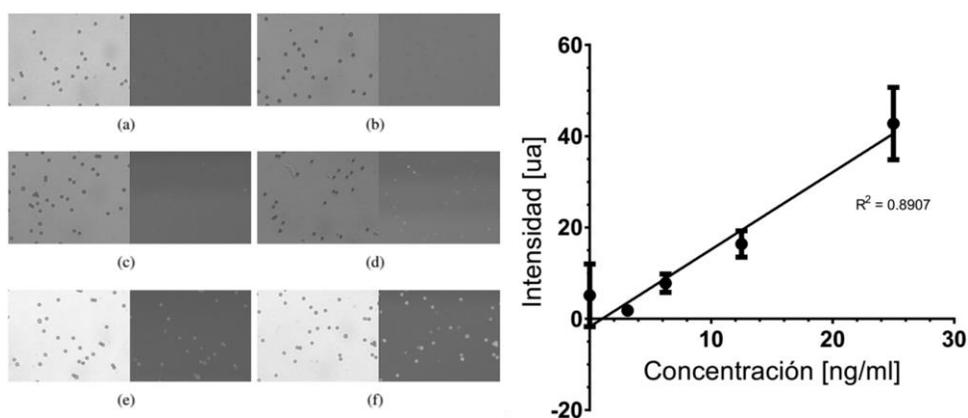


Figura 14 – Detección de TNF- α con perlas funcionalizadas. A la izquierda, micrografías en campo claro y fluorescencia para soluciones con TNF- α en concentraciones de a) 0, b) 1.56, c) 3.12, d) 6.25, e) 12.5 y f) 25 ng/mL. A la derecha, la curva de calibración resultante del análisis de estas imágenes. Los resultados para 1.56 ng/mL fueron descartados por presentar valores atípicos.

$$b_s = \frac{\left(3.67 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right) \left(1 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{m}^2}\right)}{3.67 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} + 1.21 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}} = 3.024 \times 10^{-10} \frac{\text{mol}}{\text{m}^2} \quad (4.14)$$

De esta manera, la expresión **(4.13)** representa la fracción de *visibilidad* en la perla, con mayor contaminación provocando una mayor visibilidad que no es deseada.

A continuación, se describen las condiciones de simulación generales en los modelos utilizados, utilizando como referencia la Figura 13. Estos utilizan las mismas condiciones topológicas, variando solo en sus valores numéricos y en el tamaño de la geometría.

En el módulo de ingeniería química de reacción se establecen como especies a monitorear, el analito en volumen y el complejo analito-ligando en la superficie de reacción. En la interfaz de *tds* se establece el volumen material como agua (de la librería por defecto de COMSOL), y el transporte se considera difusión pura, donde la constante difusiva que se uso fue $1 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ (a menos que se especifique de otra manera). La condición inicial del volumen, representado por la luz de los canales y delimitado por sus paredes y el contorno de las perlas y células, se establece con analito cero. Los límites descritos anteriormente tienen una condición de frontera de tasa de flujo nula (*no flux*), a excepción de los contornos de las perlas y células. En estos, se utilizaron tasas de flujo distintas de cero, en donde la célula secretora tiene un *flux* positivo al volumen de 100 de acuerdo con lo obtenido por la ecuación (9). La circunferencia de las perlas tiene un *flux* que depende de la tasa de reacción, la cual está descrita por la ecuación (3), de manera que se tiene:

$$Flux_{Perla} = -k_{on}c\Gamma\theta_{free} + k_{off}\Gamma(1 - \theta_{free}), \quad (4.15)$$

donde c es la concentración de analito obtenida de la interfaz *tds*, Γ es la concentración superficial de sitios de unión inicial ingresada en la simulación y θ_{free} es la fracción de sitios libres obtenida de la interfaz *sr*.

Por otro lado, la interfaz de *sr* hace también uso del último valor de *flux* en el mismo lugar, pero con un signo negativo. La condición inicial aquí también es una concentración cero en la superficie de las perlas. Además, se desprecia la difusión lateral entre los complejos, por lo que la constante de difusión superficial se coloca en cero.

De manera general, se utiliza un estudio dependiente del tiempo, en donde se selecciona un tamaño de paso *libre*, es decir, escogido por el algoritmo de solución del software de acuerdo con parámetros internos, con un tamaño máximo de paso de 250 segundos. El tiempo para el cual fue resuelto fue de 14,400 segundos, con un paso inicial de 0.001 segundos.

La tasa de flujo molar para la secreción fue establecida con una función *step*, la cual mantenía un valor igual a 1 durante los primeros 7,200 segundos, para cambiar a un valor de cero en el tiempo restante. Al multiplicar esta función por la tasa de secreción, se tiene una liberación de la proteína solo durante el inicio de la simulación, por lo que en el modelo se tiene un máximo de 7.2×10^5 proteínas en el volumen. La Figura 15 muestra el comportamiento de la secreción.

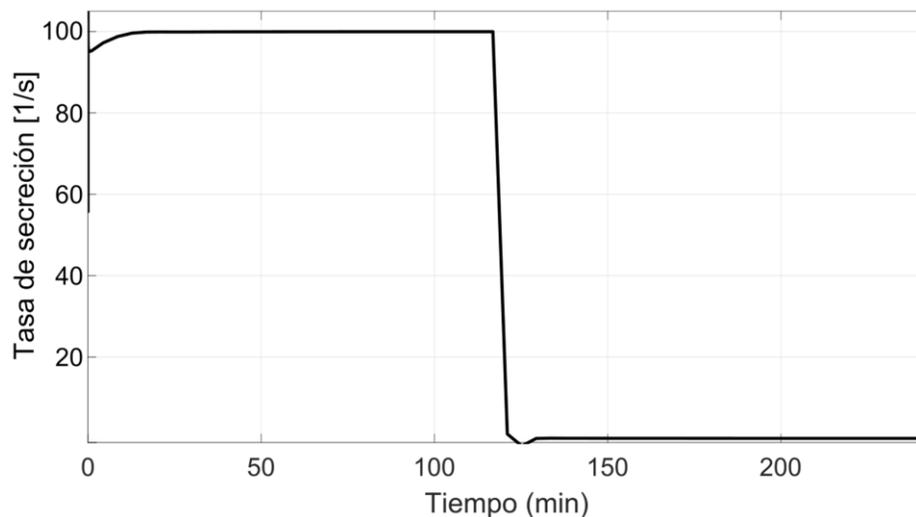


Figura 15– Comportamiento de la secreción de analito utilizando la función *step*, con un valor unitario en los primeros 7 200 segundos y un valor cero en el tiempo restante.

Como primera simulación, se eligió utilizar el modelo de diseño original en el cual se tenía, como ya se mencionó, una configuración igual a la de la Figura 13 pero con las dimensiones características del espaciado entre trampas igual a $160\ \mu\text{m}$ y un ancho de canal central de $20\ \mu\text{m}$. De otra manera, el modelo poseía las mismas condiciones que se describen en párrafos anteriores.

Los siguientes modelos representan modificaciones en el diseño original, en donde se modifican de manera individual diferentes parámetros geométricos y condiciones del sistema. El primero de estos cambios es la inclusión de una cámara entre trampas modificando el canal central como se muestra en la Figura 16. Esto obedece al hecho que al incluir un espacio mayor donde la proteína pueda difundir, esta tardara mayor tiempo en alcanzar el entorno de otra trampa.

La simulación es de tipo paramétrico, donde se cambiarán de forma gradual los valores para el ancho y largo de la cámara, desde 0 hasta $3\ 000\ \mu\text{m}$ en ambos casos. Se obtuvieron los valores de concentración superficial para la perla blanco y una perla contigua. Con base en estos resultados y la función de contaminación anterior, se construyó un mapa de calor que indica la

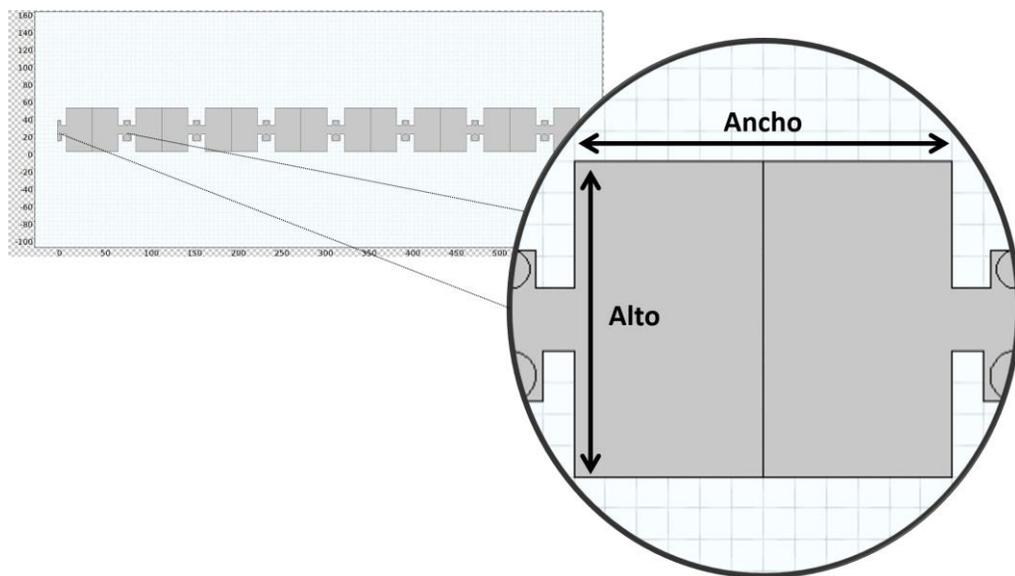


Figura 16 – Modelo con inclusión de cámara entre trampas. Está cámara es producto de la modificación del canal central a una distancia de $10\ \mu\text{m}$ desde ambas trampas.

combinación óptima de largo y ancho. Los datos fueron tomados para los segundos 7 200 y 14 400.

El modelo siguiente es idéntico al anterior, pero se modificó además los parámetros para las tasas de asociación/disociación, utilizando ahora un valor similar al de la biotina/estraptavidina ($K_D = 56$ fM, una de las uniones bioquímicas no covalentes más fuerte [39]). De nueva cuenta, se utilizarán los datos obtenidos de la variable de concentración superficial en la perla blanco y una contigua. De esta manera, se observó si el óptimo de largo y ancho cambia con una nueva K_D .

El ultimo lote de simulaciones omite modificaciones en las dimensiones del alto y solo se modifica el ancho. El primero se mantiene con una distancia de $20 \mu\text{m}$ por los resultados de simulaciones anteriores y consideraciones de construcción. Las tasas de asociación/disociación utilizadas corresponden a lo establecido previamente ($0.121 \mu\text{M}$). La parametrización del ancho se dio con un cambio en las tasas de difusión: 10^{-11} , 10^{-10} y $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ y en la concentración de sitios de unión: 10^{-8} , 10^{-7} , $10^{-6} \text{ mol}/\text{m}^2$. Estos cambios representan una modificación de analito (y por consecuencia, en su peso molecular) en el caso del primero y la obtención de mejores perlas o un perfeccionamiento de la técnica de funcionalización de estas en el del segundo.

4.3 RESULTADOS

La primera simulación muestra el comportamiento del analito y su unión en el anticuerpo sobre las perlas para las dimensiones del diseño original. En la Figura 17 se puede observar la concentración volumétrica del analito, así como la concentración superficial de analito conjugado con anticuerpo sobre las perlas en diferentes momentos de la simulación. Arriba, se tiene el inicio de la simulación, donde la secreción no se ha realizado y por lo tanto no hay analito ni en el volumen ni en la superficie de las perlas. La figura de en medio es en el segundo 7 200, y para este punto se han secretado las 7.2×10^6 moléculas

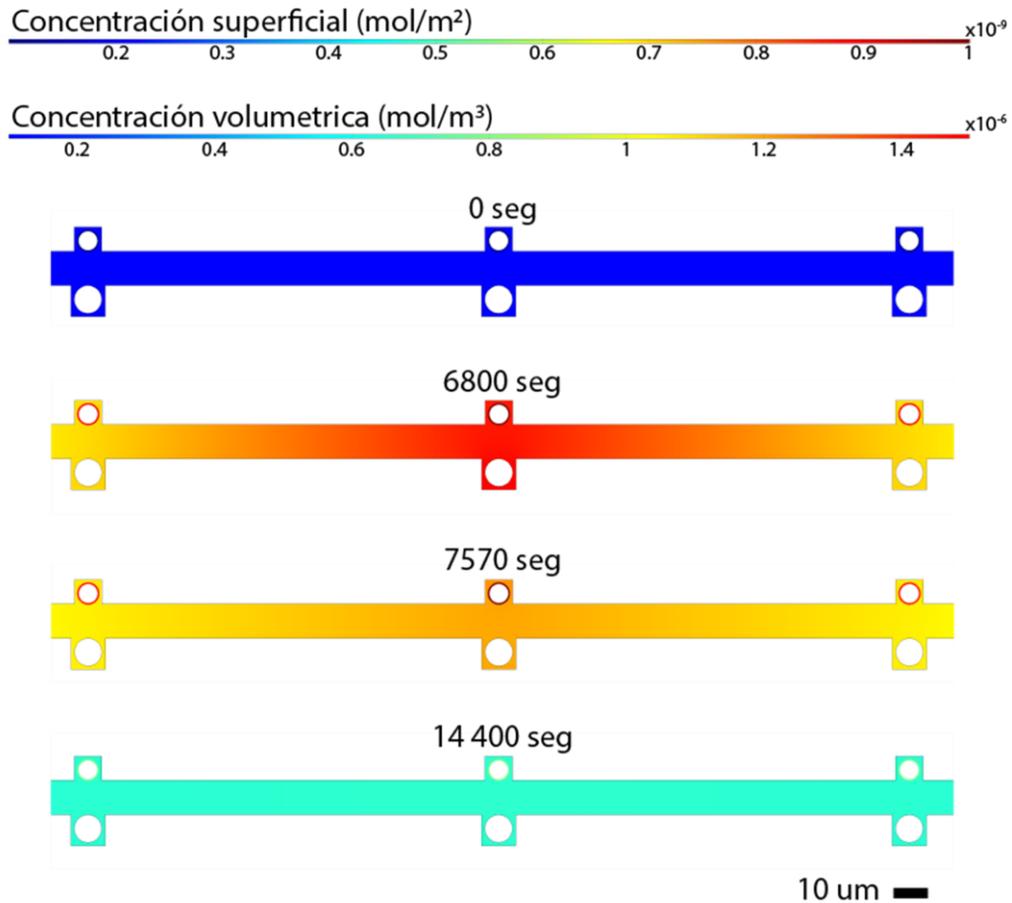


Figura 17 – Concentración volumétrica del analito en los canales y concentración superficial del complejo analito-ligando en la superficie de la perla en diferentes momentos de la secreción: durante la secreción (0 y 6800 seg) y después de terminar la secreción (7570 y 14 400 seg).

de analito totales, teniendo una concentración volumétrica y de superficie máxima, en los ordenes de 10^{-8} mol/m³ y 10^{-9} mol/m², respectivamente. Como se observa, la diferencia de color es mínima entre la superficie de las tres perlas, lo que indica una alta contaminación. Por otro lado, la figura abajo es al final de la simulación, en el segundo 14 400. En este momento la secreción ha sido detenida por la mitad del tiempo, y las partículas secretadas se difunden en todo el volumen no observable, lo que implica una disminución en la concentración volumétrica del analito. Esta disminución de concentración volumétrica significa que la reacción en la superficie comienza a liberar más analito del que adsorbe, por lo que la concentración en la superficie de las perlas es menor y, como se ve, prácticamente igual en las perlas blanco y

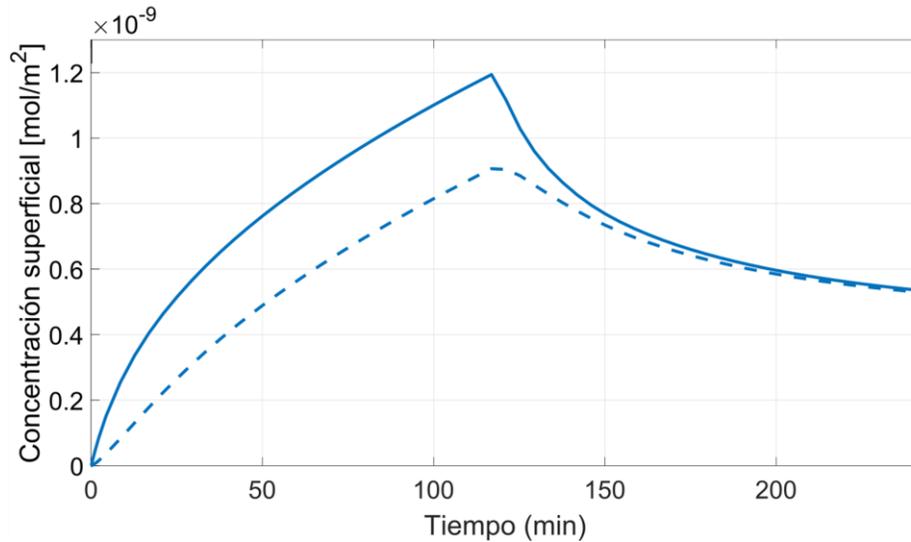


Figura 18 – Concentración superficial del complejo analito-ligando en la perla blanco (línea sólida) y perla contigua (línea discontinua) durante el tiempo de toda la simulación.

contiguas. La Figura 18 muestra de mejor manera el cambio en la concentración superficial, y aquí es posible identificar la disminución y tendencia hacia un mismo valor cuando la secreción es detenida.

El resultado anterior hace ver que el diseño del dispositivo original tendría graves problemas para mantener la secreción de una célula individual confinada a la medición por una sola perla correspondiente, incluso en los periodos de secreción. Los resultados siguientes representan lo obtenido de las simulaciones que se hicieron variando parámetros de diseño con la

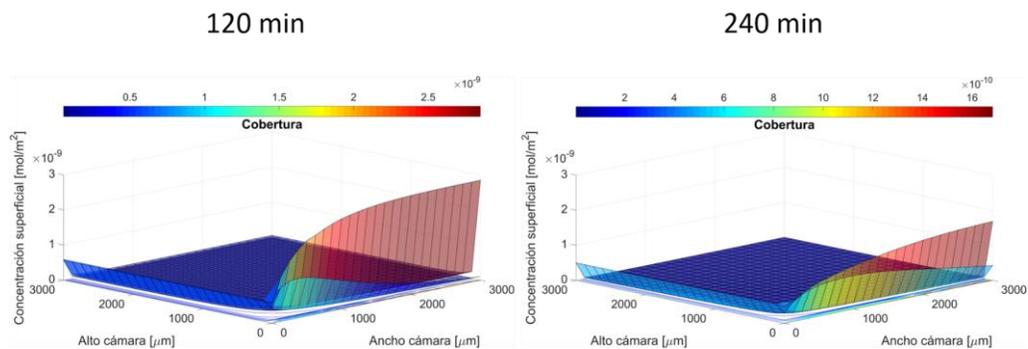


Figura 19 – Cobertura de la perla blanco (superficie superior) y una perla contigua (superficie inferior) en función del ancho y alto de la cámara del canal principal para dos momentos.

finalidad de encontrar los que otorgan las mejores características de cobertura y contaminación, como se mencionó en la sección anterior.

Los primeros resultados obtenidos son los correspondientes a la inserción de una cámara en el canal principal, entre trampas. La Figura 19 muestra los resultados para la cobertura de la perla blanco y una perla contigua en dos tiempos diferentes en función del tamaño de esta cámara. La superficie que representa a la perla blanco se encuentra en todos los casos encima de la superficie de la perla contigua, lo que representa una mayor concentración en la primera respecto a la segunda, sin embargo, los valores de ambas concentraciones son prácticamente idénticos para casi todo el rango de tamaños de la cámara. La única sección donde la diferencia es notable se encuentra cuando el alto de la cámara es nulo y el ancho de la cámara se va haciendo progresivamente más grande. Esto último implica que aumentar la distancia entre perlas permitirá a la perla blanco adsorber una mayor cantidad de analito, pues este estará disponible por un mayor tiempo en el área circundante. Caso contrario, cuando el alto es mayor, pues el analito difundirá hacia un espacio que no está en contacto con ninguna de las perlas, causando la región de concentración baja mostrada en la figura.

Agregado a esto, en la Figura 20 se puede apreciar la distribución de la contaminación en función del tamaño de la cámara. En esta figura podemos apreciar un patrón muy similar al de la figura anterior, donde existe una gran región de alta contaminación cuanto mayor es el alto de la cámara, sin importar

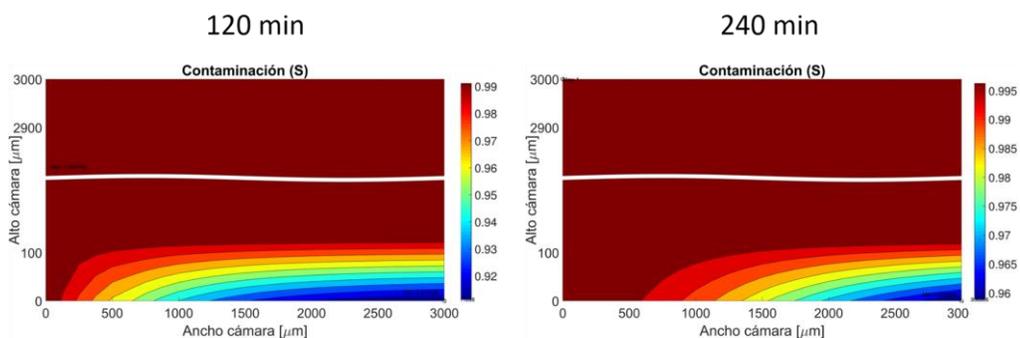


Figura 20 – Contaminación de la perla blanco y contigua en función del tamaño de la cámara del canal principal para dos momentos.

el ancho de esta. En la figura se indica el punto mínimo de contaminación, en donde la cámara tiene un ancho máximo y un alto nulo. Esto se puede explicar de igual manera que con la figura anterior, aumentar el ancho implica un mayor tiempo de difusión lateral, por lo que el analito no se acercará a la perla contigua dentro del tiempo de simulación, mientras que, si el alto es grande, se impedirá el acceso al analito por ambas perlas, reduciendo su concentración superficial de ambas perlas, ocasionando una disminución en la diferencia relativa entre perlas.

A pesar de que se mencionó un punto mínimo en la contaminación cuando el ancho era el máximo establecido en la simulación, este punto aún tiene valores grandes. Tanto la Figura 19 como la Figura 20 muestran una tendencia hacia una mayor distancia entre perlas; sin embargo, esta se ve limitada por consideraciones de construcción y miniaturización del dispositivo. Es por esto, que se exploran nuevas condiciones que disminuyan la contaminación, así como un aumento en la concentración superficial de la perla blanco.

Las tasas de adsorción/desorción son otro de los parámetros que pueden afectar en gran medida al sistema, por lo que esta fue la siguiente modificación. Los resultados siguientes muestran cómo la cobertura y contaminación en el sistema si el complejo analito-ligando tuviera una K_D similar a la del complejo biotina-estraptividina.

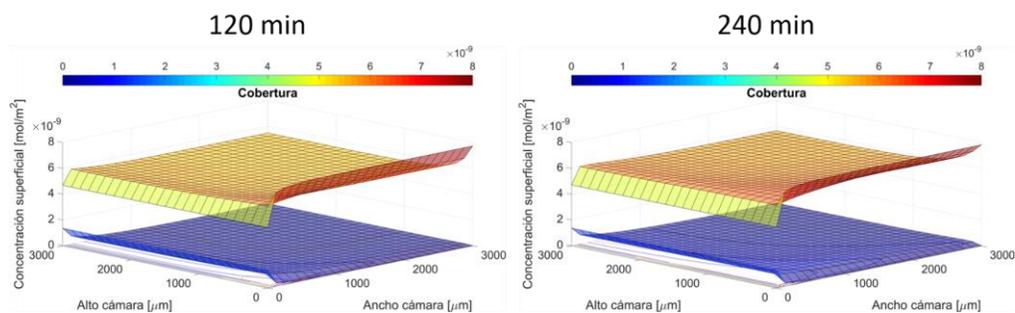


Figura 21 – Concentración superficial para la perla blanco (superficie superior) y contigua (superficie inferior) respecto a el ancho y alto de la cámara en el canal principal para diferentes tiempos cuando $K_D = 56 \text{ fM}$.

Como se observa en la Figura 21, el cambio en la cobertura es bastante notorio, las superficies que representan la concentración superficial en la perla blanco y contigua son lo suficientemente distinguibles entre si, con ningún punto de similitud. De acuerdo con la ecuación (4.9) y asumiendo la distancia característica como el ancho del canal principal, el número de Damkohler para una K_D igual a 56 fM es de 3.6×10^6 ($Da \gg 1$), lo cual representa una difusión relativamente lenta e implica que la reacción ocurre de manera lo suficientemente rápida como para atrapar gran parte del analito y evitar que este se dirija hacia la otra perla. Como comparación, el número de Damkohler para la otra K_D utilizada ($0.121 \mu\text{M}$) es de $Da = 0.95$.

Lo anterior se puede observar también en la Figura 22, donde la contaminación ha sido reducida en su punto mínimo cerca de 25 puntos porcentuales respecto al máximo de las pruebas anteriores. Algo constante en estas simulaciones respecto a las pasadas, es la influencia del ancho del canal, pues este mejoró los resultados al tener una mayor dimensión. Sin embargo, para este caso con una K_D muy pequeña, el beneficio parece ser mínimo, pudiendo lograr distancias más cortas entre las trampas, manteniendo así el tamaño reducido del dispositivo completo.

Otros supuestos que se estudiaron a través de las simulaciones fueron una mejora en la funcionalización de las perlas, asumiendo el uso de perlas con una mayor densidad de sitios de unión. También se tomó en cuenta un cambio en la difusión, explicado por el uso de anticuerpos con diferente peso

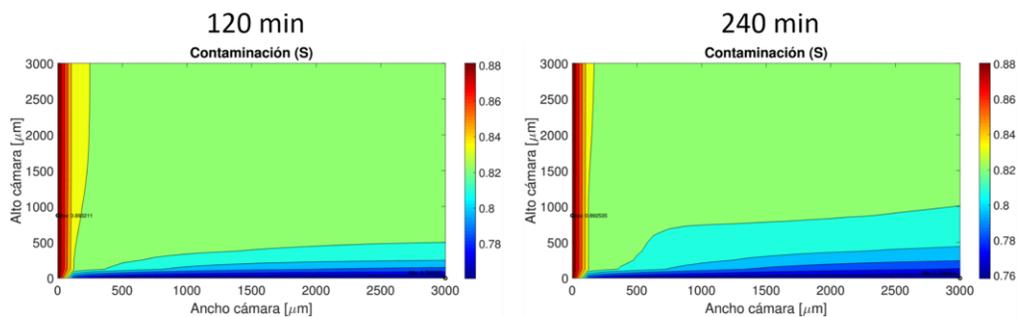


Figura 22 – Contaminación en función del alto y ancho de la cámara en el canal principal en dos momentos, cuando $K_D = 56 \text{ fM}$.

molecular o la adición de compuestos de marcaje que agregan un mayor peso a los primeros.

La Figura 23 muestra los resultados de la simulación que incluyó el cambio en el ancho de la cámara, la densidad de sitios de unión en las perlas y cuatro diferentes coeficientes de difusión. En las gráficas se observan dos superficies, correspondientes a la perla blanco y una perla contigua, donde la superficie correspondiente a la primera tiene siempre valores de concentración mayores a la segunda. De manera general, se observa que en todas las gráficas un aumento en los sitios de unión es beneficioso pues la concentración superficial de la perla blanco se ve aumentada en gran medida. Añadiendo a esto, se ve que esto se ve ayudado con una disminución del coeficiente de difusión, pues para el coeficiente más bajo probado, se tiene una región de máxima concentración que es prácticamente independiente de la distancia.

Para explicar lo ocurrido con el cambio de sitios de unión, se puede utilizar de nueva cuenta la solución de estado estable para la ecuación (4.4). Aquí puede observarse que, al igual que la disminución de la constante de adsorción, un aumento en los sitios de unión resulta en un mayor número de complejos

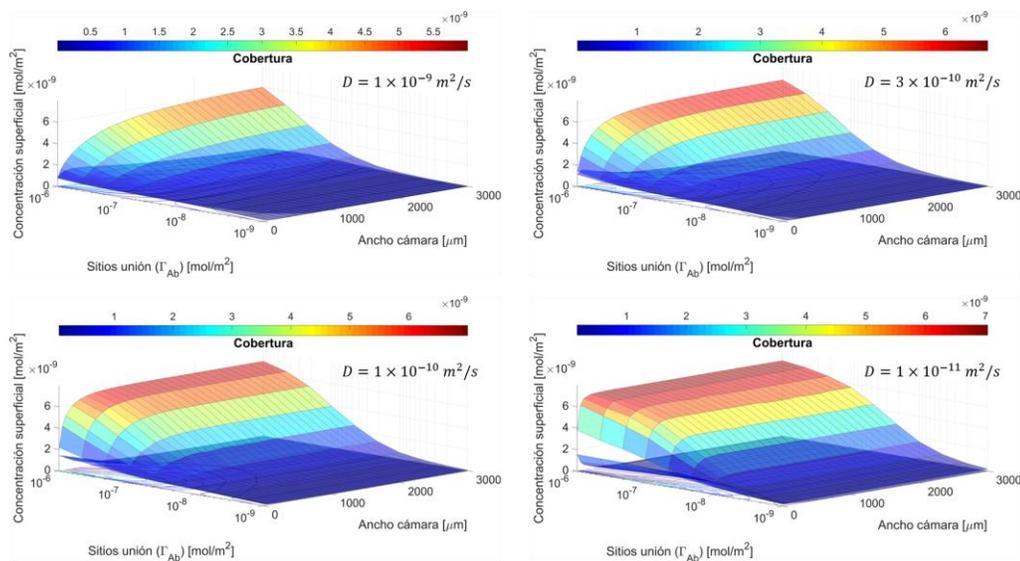


Figura 23 – Concentración superficial de la perla blanco (superficie superior) y perla contigua (superficie inferior) en función del ancho de cámara y los sitios de unión en las perlas para cuatro coeficientes de difusión diferentes en el segundo 7 200.

formados en la superficie. Por otro lado, al disminuir la constante de difusión (ej. aumentar el peso molecular del analito) se tiene que se requiere un mayor tiempo para difundir a lo largo del canal principal, por lo que se da un mayor tiempo de contacto en la región de la perla blanco, respecto a las áreas de otras perlas.

Todo esto puede observarse en la contaminación, donde las gráficas de la Figura 24 muestran regiones con un mayor rango de acción donde la contaminación se ve reducida. Sin embargo, de nueva cuenta, la contaminación solo se reduce en alrededor del 20%.

Los resultados presentados en esta sección dan cuenta del comportamiento de adsorción por parte de la superficie de las perlas y las modificaciones que sufre en condiciones diferentes: aumento en el espacio de difusión (Figuras 19 y 20), una disminución considerable en la constante de disociación (Figuras 21 y 22), un cambio en la densidad de sitios de unión y de la constante de difusión (Figuras 23 y 24).

Lo encontrado en estas simulaciones da cuenta de la gran cantidad de contaminación existente en el sistema, debido a la difusión del analito hacia

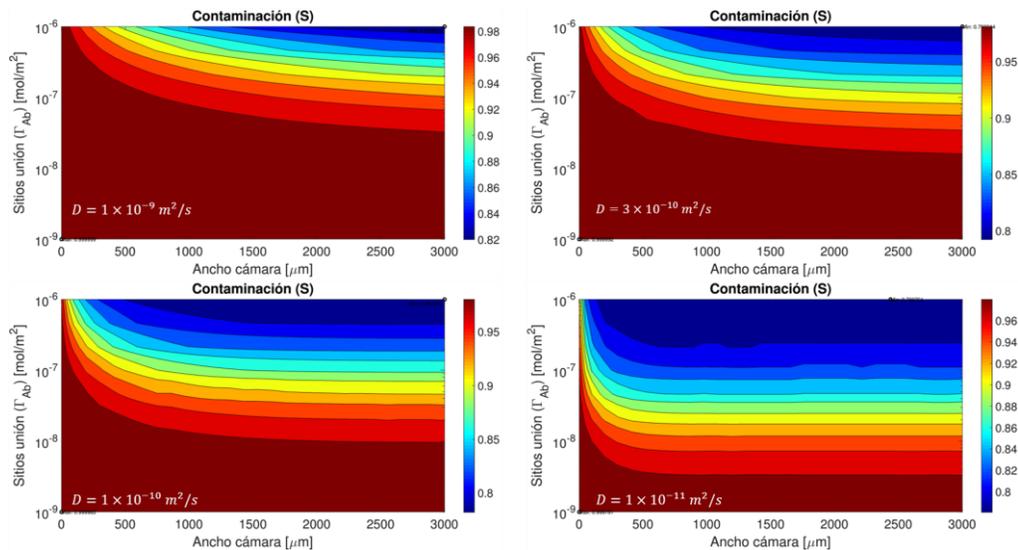


Figura 24– Contaminación en función del ancho de cámara y densidad de sitios de unión para cuatro diferentes coeficientes de difusión en el segundo 7 200.

las trampas contiguas. Esta contaminación representaría un sesgo al momento de utilizar dispositivo. Las modificaciones de los factores mencionados en el párrafo anterior muestran que para reducir esta contaminación y aumentar la adsorción por la perla blanco, se requiere de: un incremento en la distancia entre trampas (aumento en el espacio de difusión), el uso de anticuerpos con mejor eficiencia de captura (disminución constate de disociación), un aumento en el número de estos sobre la superficie de la perla (densidad de sitios de unión) y/o disminuir la difusividad del analito (constante de difusión).

Con esto, se concluye el estudio en este trabajo referente al capítulo de adsorción-difusión del analito en el dispositivo, para proseguir con el análisis del flujo en los canales como medida de la eficiencia de captura de perlas y células en las trampas hidrodinámicas.

5 FLUJO A TRAVÉS DEL DISPOSITIVO

5.1 MARCO TEÓRICO

El flujo que atravesará al dispositivo influirá en la captura de las perlas y células, además de tener efectos sobre estas una vez que hayan sido atrapadas. Es por esto por lo que es necesario el estudio del comportamiento del fluido que fluirá por los canales del dispositivo.

La captura de muestra ha sido realizada de diferentes maneras, utilizando diferentes fenómenos físicos para lograr este fin. Por ejemplo, Rousset *et al.* [40] nos presenta un pequeño resumen sobre algunos de los métodos utilizados para capturar muestras biológicas, en donde se mencionan cuatro sistemas principales: dielectroforesis, donde las partículas son guiadas a la trampa utilizando campos electromagnéticos; sedimentación, se hace uso de la gravedad para lograr la captura; inercial, sistema en el cual se usan las fuerzas inerciales para lograr el objetivo; y resistivo, donde la diferencias en resistencia hidráulica entre la trampa y el canal causan la captura de la partícula [40].

Otro aspecto de medición importante es la tasa de flujo critica en el dispositivo para evitar un esfuerzo de corte dañino. Rousset *et al.* [40] realizan la medición del esfuerzo cortante al utilizar una simulación y encontrar la tasa de

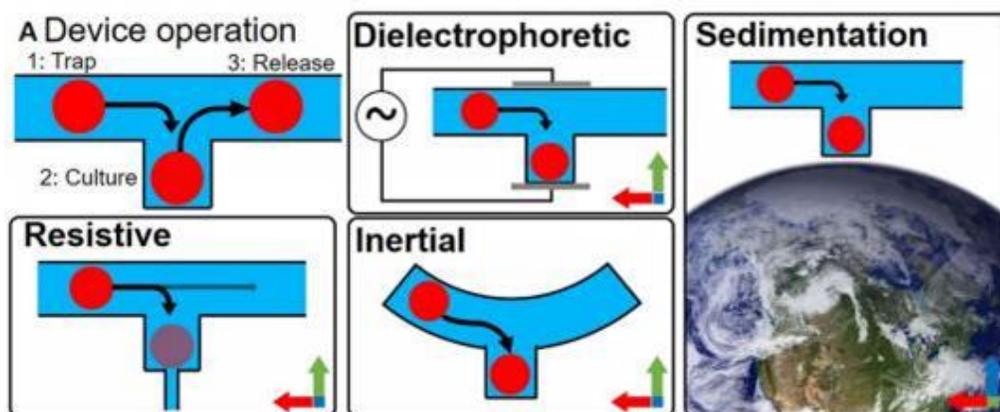


Figura 25 – Mecanismos de captura de muestras en sistemas microfluídicos. De Rousset *et al.* [40].

deformación sobre la superficie de la muestra, valor que al multiplicarlo por la viscosidad dinámica del fluido es igual al esfuerzo cortante, que proviene de la definición de esfuerzo cortante por la ley de Newton para la viscosidad [31]. La obtención de la tasa de flujo óptima es entonces encontrada a través de un barrido paramétrico de esta variable donde el esfuerzo cortante es menor a 1 Pa [40].

Todo lo anterior se realiza gracias al modelado del fluido en el dispositivo, por lo que a continuación se explica con más detalle el desarrollo del modelo para el flujo y el esfuerzo cortante.

5.1.1 Flujo

El modelado de un fluido Newtoniano en movimiento obedece a las ecuaciones de Navier-Stokes, las cuales representan la conservación del momento lineal en un elemento fluido:

$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{u} + \mathbf{F} \quad (5.1)$$

Donde \mathbf{u} es la velocidad del fluido, p es la presión del fluido, ρ es la densidad del fluido. El término a la izquierda de la igualdad representa las fuerzas inerciales, mientras que del otro lado se tienen los términos para las fuerzas aplicadas en el cuerpo por presión, viscosidad y externas.

El flujo laminar es una condición en la cual la velocidad de una partícula en un flujo no es una función aleatoria del tiempo, es decir, no presenta un comportamiento turbulento [41]. En estos casos, las fuerzas viscosas dominan sobre las fuerzas inerciales [42].

El número de Reynolds es un número adimensional que determina la razón entre la inercia y las fuerzas viscosas de un flujo. Una de las definiciones de este número es la siguiente:

$$Re = \frac{UD}{\nu} \quad (5.2)$$

Donde U es la velocidad promedio del fluido, D es la dimensión característica del canal y $\nu = \mu/\rho$ es la viscosidad cinemática del fluido[42].

Este número aparece naturalmente al realizar un análisis dimensional de la ecuación (5.3). Al escalar las expresiones de coordenadas y velocidad con la distancia característica D del canal y la velocidad promedio U del flujo, respectivamente, así como la presión con el término $\mu U/D$ se tiene la siguiente expresión adimensional de la ecuación (5.1) sin fuerzas externas:

$$Re \left(\frac{\partial \tilde{\mathbf{u}}}{\partial \tilde{t}} + \tilde{\mathbf{u}} \cdot \nabla \tilde{\mathbf{u}} \right) = -\nabla \tilde{p} + \nabla^2 \tilde{\mathbf{u}} \quad (5.3)$$

Aquí es posible observar claramente que para $R \ll 1$ el término de viscosidad domina, mientras que para $R \gg 1$ el término inercial es el más importante [43].

El número de Reynolds para la mayoría de los dispositivos microfluídicos puede estimarse entre órdenes de magnitud de 10^{-6} y 10^1 . Estos bajos Re indican que las fuerzas viscosas superan a las inerciales, resultando en los flujos lineales de las tecnologías microfluídicas [44].

En la práctica, es común encontrar flujos impulsados por la diferencia de presión entre la entrada y salida del canal por el que se mueven, esta clase de flujo se conoce como flujos de Hagen-Poiseuille [43]. Haciendo uso de las simplificaciones otorgadas por la ecuación de Stokes, se pueden encontrar soluciones analíticas para casos simples en este tipo de flujos y soluciones aproximadas para otros. En microfluídica, las soluciones para canales con sección transversal rectangular son generalmente las más apropiadas para el estudio del flujo en estos dispositivos, aunque también pueden existir dispositivos con canales de otras geometrías [42]. A continuación, se muestran estas soluciones.

En uno de los casos más simples se tiene un flujo a través de dos placas paralelas infinitas. Considerando el sistema de coordenadas de la Figura 26, la simetría permite eliminar la coordenada y , por lo que, junto a la condición de no deslizamiento en las paredes del canal, se tienen las siguientes ecuaciones:

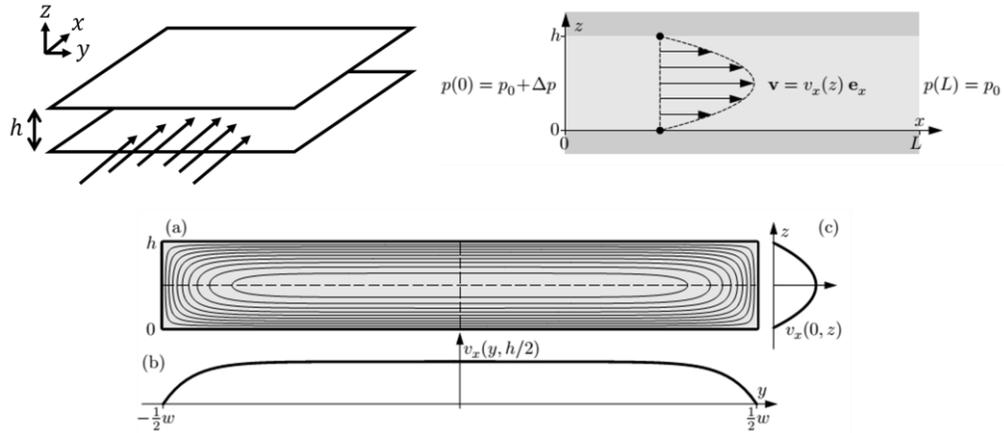


Figura 26 – Esquemas de flujo en canales simples. Arriba a la izquierda, flujo a través de un canal de placas paralelas. Arriba a la derecha, campo de velocidad para este mismo canal visto desde el plano xz . Abajo, campo de velocidad en un canal rectangular. Adaptado de Bruus [43].

$$\partial_z^2 u_x(z) = -\frac{\Delta p}{\mu L}$$

$$u_x(0) = 0 \tag{5.4}$$

$$u_x(h) = 0$$

Cuya solución es una parábola:

$$u_x(z) = \frac{\Delta p}{2\mu L} (h - z)z \tag{5.5}$$

El caso anterior es una situación idealizada; sin embargo, es aproximada en canales rectangulares con una relación de aspecto lo suficientemente grande. Para el caso general de canales, no se conoce una solución analítica, no obstante, existe una representación aproximada a través de una suma de Fourier:

$$u_x(y, z) = \frac{4h^2 \Delta p}{\pi^3 \mu L} \sum_{(n, \text{impar})}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi y}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right] \sin\left(\frac{n\pi z}{h}\right) \tag{5.6}$$

Una vez determinado el campo de velocidad, es posible calcular el flujo volumétrico a través del canal, el cual está definido como el volumen de fluido descargado en el canal por unidad de tiempo según la siguiente ecuación:

$$Q = \int_S dy dz u_x(y, z) \quad (5.7)$$

Para el campo de velocidad descrito por la ecuación (5.6), el flujo volumétrico es:

$$Q = \frac{h^3 w \Delta p}{12 \mu L} \left[1 - \sum_{n, \text{impar}}^{\infty} \frac{1}{n^5} \left(\frac{192}{\pi^5} \right) \left(\frac{h}{w} \right) \tanh \left(\frac{n \pi w}{2h} \right) \right] \quad (5.8)$$

La ecuación anterior puede simplificarse para casos donde la razón de aspecto tiende a cero: $h/w \rightarrow 0$, es decir, una configuración de placas paralelas:

$$Q \approx \frac{h^3 w \Delta p}{12 \mu L} \left[1 - 0.630 \left(\frac{h}{w} \right) \right] \quad (5.9)$$

La aproximación anterior es bastante buena, pues en el peor de los casos ($h = w$), se tiene un error del 13% respecto a la suma de Fourier, mientras que para una razón de aspecto de la mitad ($h = w/2$) el error ha disminuido hasta 0.2% [43].

Por otro lado, si se utiliza el campo de velocidad para placas paralelas (ecuación (5.5)) para encontrar el flujo a través de una sección de ancho w , se tiene lo siguiente:

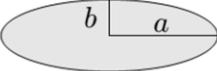
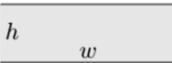
$$Q = \frac{h^3 w}{12 \mu L} \Delta p \quad (5.10)$$

La cual es útil para obtener los órdenes de magnitud estimados del flujo en canales rectangulares anchos, pues el error con una razón de aspecto de una décima es cercano al 7% y para un tercio es de 23% [43].

Las soluciones anteriores pueden resumirse en la ley de Hagen-Poiseuille, en donde se introduce el concepto de resistencia hidráulica en una analogía a los sistemas eléctricos:

$$Q = \frac{\Delta p}{R_H} \quad (5.11)$$

Tabla 1 – Expresiones de resistencia hidráulica para canales con diferentes áreas transversales. Adaptado de Bruus [43]

Forma		Expresión
Círculo		$\frac{8}{\pi} \eta L \frac{1}{a^4}$
Elipse		$\frac{4}{\pi} \eta L \frac{1 + (b/a)^2}{(b/a)^3} \frac{1}{a^4}$
Triángulo		$\frac{320}{\sqrt{3}} \eta L \frac{1}{a^4}$
Placas paralelas		$12 \eta L \frac{1}{h^3 w}$
Rectángulo		$\frac{12 \eta L}{1 - 0.63(h/w)} \frac{1}{h^3 w}$
Cuadrado		$\frac{12 \eta L}{1 - 0.63(0.917)} \frac{1}{h^4}$

En donde R_H depende de la geometría del canal. En la Tabla 1 se muestran las expresiones para la resistencia hidráulica de algunas de las secciones transversales más comunes. Estas expresiones provienen de soluciones a las ecuaciones de Stokes como las presentadas anteriormente.

El uso de la resistencia hidráulica en analogía con los sistemas eléctricos no solo se limita a la familiaridad de la ley de Poiseuille con la ley de Ohm, sino también a la forma de tratar las conexiones entre canales y la resistencia resultante de estas. Así, canales conectados en serie tienen una resistencia equivalente igual a la suma de las resistencias individuales, mientras que el inverso de la suma del inverso de cada una de las resistencias individuales de canales conectados en paralelo es igual a su resistencia equivalente:

$$R_H(\text{serie}) = R_{H1} + R_{H2} + \dots + R_{Hn} \quad (5.12)$$

$$R_H(\text{par}) = \left(\frac{1}{R_{H1}} + \frac{1}{R_{H2}} + \dots + \frac{1}{R_{Hn}} \right)^{-1} \quad (5.13)$$

De esta manera, se pueden tratar los circuitos hidráulicos como circuitos eléctricos, para de esta manera resolver sistemas con diferentes canales y sus

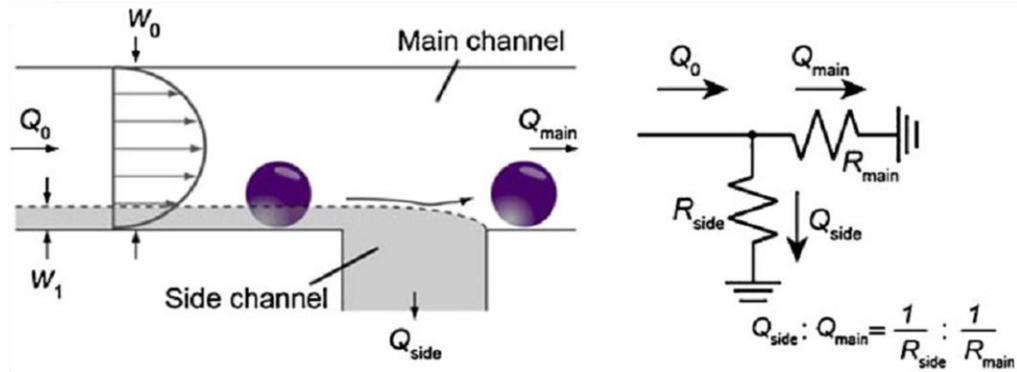


Figura 27– Esquema del sistema de filtrado en un punto de conexión junto a su equivalente eléctrico. Los flujos volumétricos determinan la captura o filtración de partículas específicas, por lo que las resistencias deben ser modificadas de tal manera que se obtengan los flujos volumétricos deseados. Adaptado de Toyama et al. [46].

conexiones. Por ejemplo, el equipo de Yamada ha construido dispositivos microfluídicos para la separación de componentes biológicos en donde se tienen canales angostos en paralelo, conectados a un canal principal. La cantidad de flujo que se dirige hacia estos canales en paralelo determina las partículas que serán guiadas hacia este trayecto, por lo que es necesario encontrar las resistencias de los canales adecuadas que dirijan el flujo volumétrico necesario para filtrar las partículas deseadas [45,46].

En los sistemas anteriores se hace uso de una de las características de los flujos laminares: las líneas de flujo (o corriente) se mantienen separadas una de otra y no se cruzan en ningún punto. Una partícula que pase por una línea de flujo se mantendrá en esta todo el tiempo. De esta manera, el objetivo es encontrar el flujo volumétrico delimitado por la línea de flujo correspondiente al tamaño de la partícula de interés. El diagrama de la Figura 27 muestra estas variables en el caso del trabajo de Yamada [46].

Por otro lado, Guan *et al.* [47] presentan un diseño para la captura de células únicas tomando en cuenta las líneas de flujo en el dispositivo, sin que la resistencia de los canales se vea involucrada directamente en el análisis. El sistema de captura de estos autores involucraba un canal de entrada el cual se dividía en tres, en la parte central se encontraba una abertura un poco más pequeña que el tamaño de la célula objetivo y la cual cumple el objetivo de

capturarla, a los lados se encontraban dos canales de circunvalación. Estas trampas se repetían múltiples veces a lo largo del dispositivo, una conectada

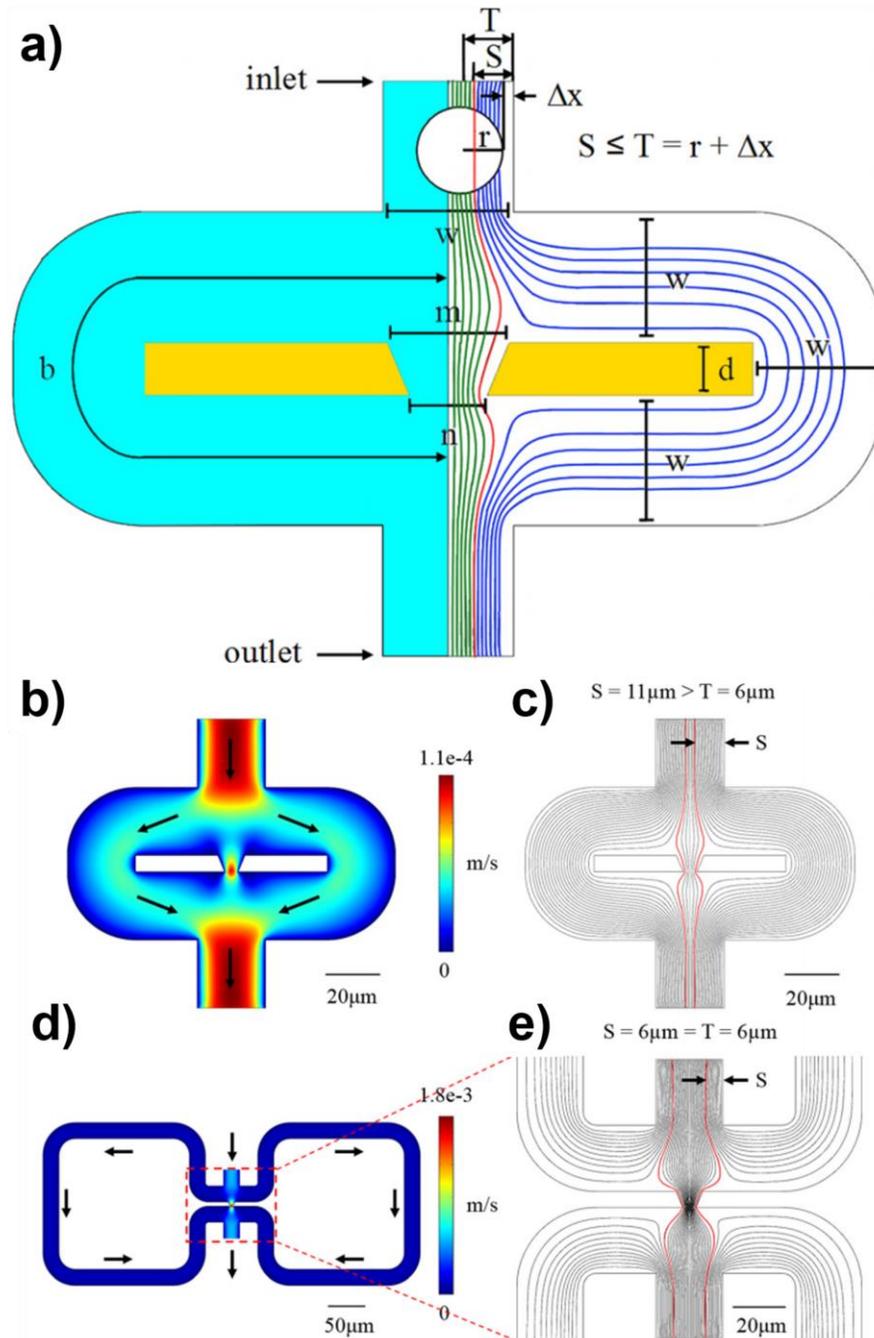


Figura 28 – Esquemático de una trampa hidrodinámica. A la izquierda, diagrama del diseño basado en líneas de flujo. La línea roja muestra el límite entre el flujo de captura (líneas verdes) y el flujo de circunvalación (líneas azules). El objetivo de los autores es establecer este límite de acuerdo con el tamaño de la partícula de interés. A la derecha, simulaciones de elemento finito para el diseño original (arriba) y para el diseño optimizado (abajo). Adaptado de Guan et al. [47].

detrás de otra. La Figura 28 muestra este segmento de captura junto a las variables involucradas en el análisis de los autores.

El objetivo de [47] es obtener las dimensiones de los canales de circunvalación tales que el límite mostrado por la línea roja en la Figura 28 tenga una distancia S desde las paredes del dispositivo igual a T , parámetro definido como la suma del radio de la partícula (r) y una tolerancia Δx . De esta manera, el centro de masa de la partícula estaría dentro del volumen correspondiente al flujo de captura.

Para lo anterior, Guan *et al.* [47] establecen los flujos a través del canal de captura y de circunvalación a partir de la definición de flujo mostrada en la ecuación (5.7) y asumiendo un perfil de velocidad rectangular definido con una ecuación equivalente a la ecuación (5.6):

$$Q_c^* = 4 \int_0^{\frac{w}{2}-T} \int_0^{\frac{h}{2}} dx dy u(x, y) = \frac{(w-2T)h^3 \Delta p}{12\mu L} \left[1 - 6 \left(\frac{h}{w-2T} \right) \sum_{(n=0)}^{\infty} \frac{\lambda_n^{-5} \sinh\left(\frac{\lambda_n(w-2T)}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{\lambda_n w}{h}\right)} \right] \quad (5.14)$$

$$Q_b^* = 4 \int_{\frac{w}{2}-T}^{\frac{w}{2}} \int_0^{\frac{h}{2}} dx dy u(x, y) = \frac{Th^3 \Delta p}{6\mu L} \left[1 - 3 \left(\frac{h}{T} \right) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\lambda_n^{-5} \sinh\left(\frac{\lambda_n w}{h}\right) - \sinh\left(\frac{\lambda_n(w-2T)}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{\lambda_n w}{h}\right)} \right] \quad (5.15)$$

donde Q_c^* es el flujo de captura, Q_b^* es el flujo de circunvalación y $\lambda_n = (2n+1)\pi/2$.

Los flujos anteriores representan el límite en el cuál $S = T$. Según Guan *et al.* [47], para obtener una captura determinista, se deben obtener flujos cuya razón sea mayor a la razón de los flujos límites, es decir:

$$K = \frac{Q_c}{Q_b} \geq K^* = \frac{Q_c^*}{Q_b^*} \quad (5.16)$$

Esto se logra al modificar los parámetros utilizados para calcular el flujo. En el caso del trabajo de [47], se modifican el largo del canal de circunvalación (L), cambiando de una distancia de 113 μm a 900 μm , como se muestra en la figura 6 derecha.

Por lo anterior, se siguió una estrategia similar a la de [47] para encontrar las dimensiones del dispositivo necesarias para tener líneas de flujo en dirección a la trampa delimitadas por un tamaño de acuerdo con las partículas y células. Añadiendo que para simplificar este análisis se realizan también una parte como analogías a los circuitos eléctricos, como se habló en párrafos anteriores.

5.1.2 Esfuerzo cortante

Cuando fuerza tangencia actual sobre una superficie, se genera un esfuerzo cortante con unidades de presión. En fluidos incomprensibles, la ecuación constitutiva de Newton define este esfuerzo τ con la expresión:

$$\tau = \mu\dot{\gamma}, \quad (5.17)$$

en donde μ es la viscosidad dinámica y $\dot{\gamma}$ es la tasa de cizallamiento entre las paredes del fluido [31]. La tasa de cizallamiento expresa el cambio de velocidad a través del eje normal al esfuerzo cortante calculado:

$$\dot{\gamma} = \nabla^2 \mathbf{u}. \quad (5.18)$$

De esta manera, se observa como el esfuerzo cortante es un componente principal en la expresión de Navier-Stokes (ecuación (5.1)) [48].

En un caso simplificado, como el mostrado en la Figura 26, donde se tiene flujo paralelo a una pared sólida, la expresión (5.17) para esfuerzo cortante se simplifica como:

$$\tau = \mu \frac{du}{dy}. \quad (5.19)$$

A continuación, se describen los pasos para llegar a esto y las condiciones de las simulaciones que se utilizaron para comprobar el diseño.

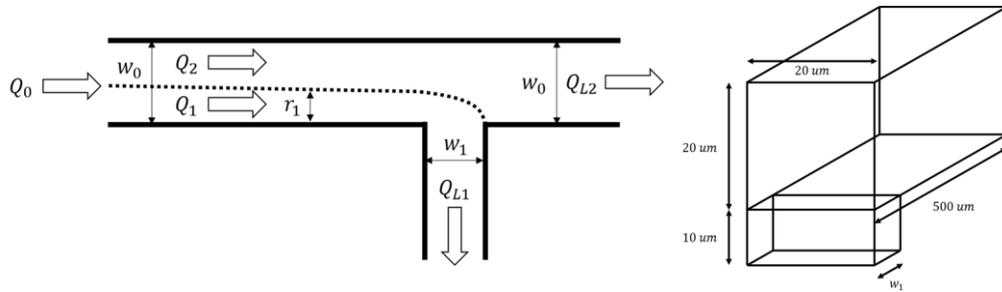


Figura 29 – A la izquierda, esquema para los cálculos iniciales. El flujo de entrada (Q_0) se divide en los flujos Q_1 y Q_2 por la línea de flujo límite cuya distancia desde la pared correspondiente a la trampa es igual al radio de la partícula de interés. Estos flujos reciben el nombre de Q_{S1} y Q_{S2} en la salida. El ancho del canal de entrada es w_0 , mientras que el de la trampa es w_1 . La profundidad en todo el esquema es de h . A la derecha, diagrama de la geometría utilizada para las simulaciones.

5.2 CONDICIONES DE SIMULACIÓN

Las simulaciones hacen uso de la interfaz *Creeping Flow* del módulo de CFD de COMSOL, la cual permite simular el flujo de un fluido a bajos número de Reynolds. Como se mencionó anteriormente, en estos flujos el término viscoso impera sobre las fuerzas inerciales por lo que estas pueden ser omitidas, permitiendo la solución del sistema utilizando la ecuación linealizada de Stokes para la conservación del momento lineal y la ecuación de continuidad para la conservación de masa.

En un inicio se utilizó el esquema izquierdo de la Figura 29 para desarrollar el análisis del sistema y después comprobarlo en el modelo de la derecha de la Figura 29. El esquema a la izquierda es una representación simplificada de nuestro dispositivo, en donde se trabaja con la sección final del dispositivo con una trampa, ignorando la trampa contraria a la mostrada y los canales laterales, asumiendo que las salidas están abiertas a la atmósfera. Aquí, se tiene un flujo de entrada Q_0 a través de un canal de entrada con ancho w_0 y profundidad h , el cual es dividido en dos (Q_1 y Q_2) por la línea de flujo límite con una distancia a la pared correspondiente a la trampa de r_1 . Esta distancia es obtenida del radio de la partícula y el sistema de coordenadas con centro en la mitad de la entrada: $r_1 = (w_0/2) - R$. El flujo Q_1 se dirige hacia la trampa, la cual tiene un ancho w_1 , y pasa a ser el flujo Q_{S1} , mientras que el Q_2 mantiene

la dirección por el canal principal hacia la salida, donde se considera como flujo Q_{s2} .

Al tener flujos a la entrada como [47], definidos sus límites arbitrariamente y no con base en las paredes, estos son obtenidos de acuerdo con la definición de flujo presentada en (5.7), en donde los límites de integración se establecen siguiendo la línea de flujo límite:

$$Q_1 = 2 \int_{r_1}^{\frac{w_0}{2}} \int_0^{\frac{h}{2}} u \, dy \, dx \quad (5.20)$$

$$Q_2 = 2 \int_{-\frac{(w_0)}{2}}^{r_1} \int_0^{\frac{h}{2}} u \, dy \, dx. \quad (5.21)$$

Por sencillez al resolver las integrales, se asume un perfil de velocidad de placas paralelas, ecuación (5.5), obteniendo lo siguiente:

$$Q_1 = \frac{1}{24} \left(\frac{\Delta p h}{\mu L} \right) (w_0 - 2r_1)^2 (r_1 + w_0) \quad (5.22)$$

$$Q_2 = -\frac{1}{24} \left(\frac{\Delta p h}{\mu L} \right) (r_1 - w_0) (2r_1 + w_0)^2. \quad (5.23)$$

Por otro lado, los flujos en las salidas se encuentran delimitados en su totalidad por las dimensiones de sus respectivos canales, por lo que su cálculo se simplifica al poder utilizar la ley de Hagen-Poiseuille descrita en la ecuación (5.11). Asumiendo que el canal de entrada tiene una longitud despreciable y que la presión en la región de entrada es igual, se tiene que:

$$Q_{s1} = \frac{\Delta p}{R_{trampa}} \text{ y } Q_{s2} = \frac{\Delta p}{R_{salida}}. \quad (5.24)$$

Al tener canales rectangulares, la expresión en ambos denominadores se puede sustituir por la expresión de resistencia correspondiente mostrada en la Tabla 1.

Como se mencionó anteriormente, las razones de los flujos de entrada y salida deben ser iguales, por lo que, de acuerdo con las expresiones para flujos y simplificando, esta igualdad es:

$$\frac{Q_1}{Q_2} = -\frac{(w_0 - 2r_1)^2(r_1 + w_0)}{(r_1 - w_0)(2r_1 + w_0)^2} = \frac{R_{salida}}{R_{trampa}} = \frac{Q_{S1}}{Q_{S2}}, \quad (5.25)$$

en esta expresión, el lado izquierdo establece la distancia de la línea de flujo limite a la pared, mientras que en el lado derecho se tienen las dimensiones de los canales de salida a través de la definición de resistencia. Entonces, de acuerdo la dimensión que se pretenda modificar se resolverá la igualdad anterior.

En el caso de prueba, se decidió modificar el ancho de la trampa, por lo que la igualdad era manipulada para obtener la resistencia de trampa (R_{trampa}) adecuada al límite de línea de flujo establecido. En la expresión de resistencia se encontraba entonces el ancho adecuado para obtener el mismo valor que el obtenido de la igualdad de razones.

La obtención del ancho a partir de la definición de resistencia en canal rectangular no se obtuvo de manera analítica debido a que, como ya se dijo, la expresión solo es viable si $w > h$ y en nuestro caso esto no se cumple. Esto se soluciona al girar el sistema de coordenadas y definir w como h y viceversa. Sin embargo, el verdadero problema se presenta por la dificultad de despejar h de la expresión. La solución que se dio fue el utilizar métodos numéricos para encontrar los parámetros (h o w) que cumplen con la función de minimización:

$$\min \left[R_{trampa} - \frac{12\mu L}{\left(1 - 0.63 \left(\frac{h}{w}\right)\right) h^3 w} \right]. \quad (5.26)$$

Establecida la función y utilizando la geometría presentada a la derecha en la Figura 29, se encontró que el ancho w_1 de la trampa debía ser de $3.48 \mu\text{m}$ para una longitud límite de línea de flujo de $8 \mu\text{m}$.

Para comprobar esto, se utilizó esta geometría con el ancho de trampa encontrado en un modelo de COMSOL con la física descrita al inicio de la sección. En este modelo, se establecieron como condiciones de frontera un flujo impulsado por diferencia de presión donde la entrada es la mostrada en el diagrama de la figura, con una presión de 123 kPa y una entrada de estabilización de $500 \mu\text{m}$. La presión de 123 kPa fue seleccionada pues esta caería a través de la entrada de estabilización hasta los 20 kPa en la entrada del sistema modelo. Este último valor de presión se encuentra cercano a la presión utilizada en diferentes dispositivos microfluídicos. Ambas salidas tenían una presión nula. La interacción con las paredes fue de no deslizamiento. Al ser una geometría tridimensional, la malla utilizada fue tetraédrica con un tamaño mínimo de elemento de definido por la opción predeterminada *fine*. La solución se dio para un estado estacionario.

$$P(0, y, z) = 123 \text{ kPa}$$

$$P(x, 20 \mu\text{m}, z) = P(500 \mu\text{m}, y, z) = 0$$

$$u(x, y, 0 \mu\text{m}) = u(x, y, 10 \mu\text{m}) = u(x, 0 \mu\text{m}, z) = u(x, 20 \mu\text{m}, z) = 0$$

$$v(x, y, 0 \mu\text{m}) = v(x, y, 10 \mu\text{m}) = v(x, 0 \mu\text{m}, z) = v(x, 20 \mu\text{m}, z) = 0$$

$$w(x, y, 0 \mu\text{m}) = w(x, y, 10 \mu\text{m}) = w(x, 0 \mu\text{m}, z) = w(x, 20 \mu\text{m}, z) = 0$$

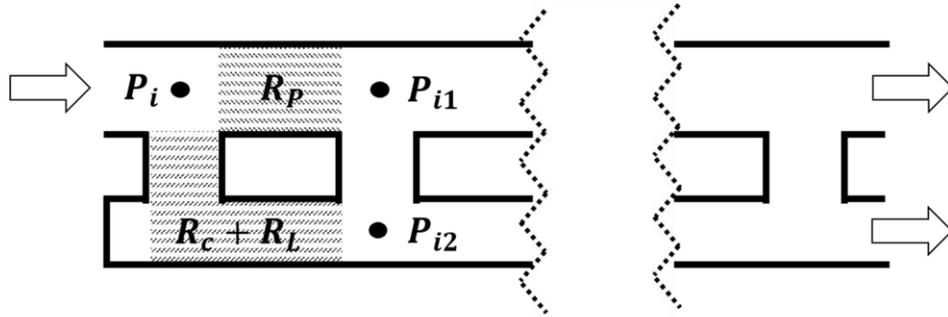


Figura 30 - Esquema del sistema de canales con trampas de forma secuencial. Estas son repetidas a lo largo de $5\,000\ \mu\text{m}$. Este modelo se puede dividir en múltiples segmentos que consisten en un canal principal, un canal de conexión y un canal lateral. En el diagrama se encuentran sombreadas las partes que componen uno de estos segmentos, además se indican las resistencias hidráulicas y las presiones a la entrada y salidas de este.

Lo siguiente fue establecer un modelo cuya geometría fuera más parecida al dispositivo del proyecto. Para esto se diseñó el esquema mostrado en la Figura 30, el cual se compone de un canal principal continuo con la entrada, que se une a un canal lateral por medio de múltiples canales de conexión. Ambos canales (principal y lateral) tienen salida a la atmósfera. El esquema entonces representa una situación similar a la de nuestro dispositivo.

Como se observa en el diagrama, el segmento del dispositivo está compuesto por una parte del canal principal y del lateral, junto al canal de conexión correspondiente. Sus resistencias se denominan R_p , R_L y R_c , respectivamente. A la entrada y las salidas del segmento se tienen tres presiones denominadas P_i (a la entrada), P_{i1} (a la salida del segmento, en el canal principal) y P_{i2} (a la salida del segmento, en la unión del canal de conexión y el lateral). Para adaptar esta geometría al modelo de líneas de flujo anterior, se asume que las caídas de presión a través del canal principal y del canal de conexión más el canal lateral son iguales. Así mismo, la resistencia de trampa se obtiene de la suma de las resistencias hidráulicas del canal de conexión y lateral tal como se muestra en el diagrama.

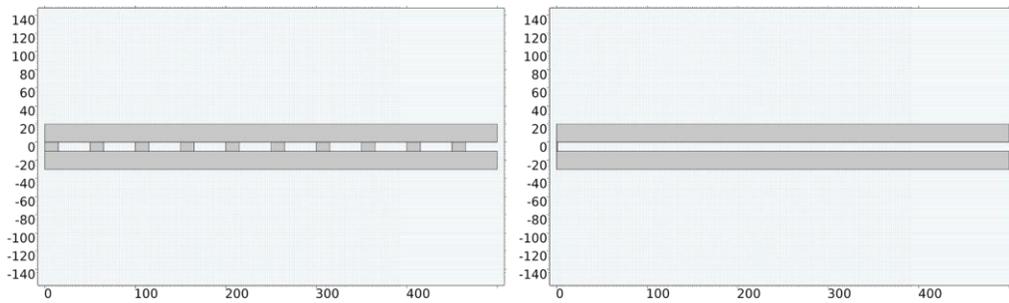


Figura 31 – Geometrías en COMSOL que incluyen un canal lateral. La imagen de la izquierda es un modelo similar al propuesto con múltiples canales conectando al canal principal y al lateral. La imagen derecha muestra un modelo más simple con un solo canal de conexión.

Para la simulación, se eligió un modelo bidimensional debido a la complejidad que agregaban los múltiples canales de conexión. Esta tenía los mismos parámetros de simulación que lo descrito anteriormente para el modelo tridimensional. La diferencia con estos modelos es el uso de la opción canal somero (*shallow channel*) en la física de flujo laminar, la cual permite tomar en cuenta los efectos de la profundidad en canales pequeños a través de la declaración de la variable de profundidad d_z , que en nuestro caso representaría la altura. Esta opción es importante, ya que de otra manera COMSOL utiliza una profundidad de 1 unidad de longitud como profundidad general en los modelos bidimensionales. La opción de canal somero involucra los efectos de la profundidad agregando un término fuerza de volumen a las ecuaciones de momento que representa el arrastre por la resistencia de las paredes:

$$F_\mu = -\frac{12\mu u}{d_z^2}. \quad (5.27)$$

La simplificación al modelo bidimensional también permitió el uso de elementos de malla más finos. De esta manera, se tiene una malla con la opción predeterminada *Extra Fine*. Así, se resolvió el modelo descrito para un estado estacionario y con un ancho del canal de conexión de $16 \mu\text{m}$, medida obtenida resolviendo (5.25) y (5.26) para un r_1 igual a $8 \mu\text{m}$. Estas mismas

condiciones de simulación se utilizaron para la geometría de la Figura 31, con la única diferencia de la existencia de un solo canal de conexión.

Los resultados obtenidos de estas simulaciones mostraron que la predicción de la línea de flujo limite no se cumplió. Por esta razón se realizó un estudio paramétrico de las mismas, en donde se varió el ancho de los canales de conexión en un intervalo de 1 a 40 μm , con el fin de comprobar que realmente existiera un ancho determinado el cual permitiría el paso del flujo debajo de la línea de flujo objetivo.

Debido a que los resultados del modelo de líneas de flujo no coinciden con lo obtenido en simulaciones para geometrías relativamente simples (Figura 31) del dispositivo, se optó por realizar estudios paramétricos sobre un modelo

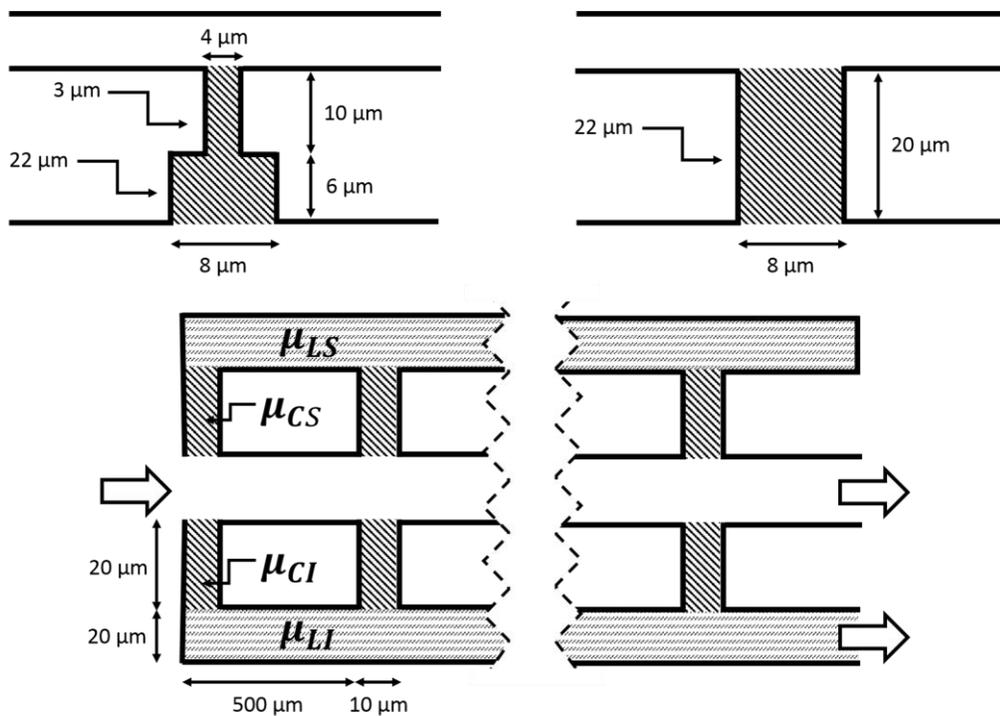


Figura 32 – Diagrama del modelo del dispositivo para observar los flujos a través de los canales. Arriba, representación de la resistencia hidráulica ocasionada por el estrecho canal de conexión que une a la trampa con el canal lateral y su equivalencia con una misma profundidad. Abajo, representación del dispositivo de forma cuasi-simétrica, con canales laterales y de conexión a ambos lados del canal principal. La diferencia radica en la salida del flujo, solo se da en el canal principal y el canal lateral inferior.

más cercano al dispositivo, variando diversas dimensiones de este, para de este modo estudiar el comportamiento de los flujos en los segmentos de canal de interés (canal de conexión o trampa).

La geometría utilizada es mostrada en la Figura 32. Al utilizar el modelo bidimensional, aun con la opción de canal somero, se supone una sola profundidad. Esto no es así en el dispositivo original, pues los canales que conectan la trampa con el canal lateral tienen una profundidad mucho menor a la de los demás canales, lo cual ocasiona una resistencia mucho más grande en esta parte del dispositivo. Para representar esta diferencia de resistencias entre los canales manteniendo una misma profundidad, se modifica la viscosidad en los segmentos correspondientes de acuerdo con la ecuación de resistencia para canales rectangulares.

De esta manera, se realizaron barridos para las siguientes condiciones:

- Cambio de viscosidad de 1×10^{-4} hasta 1×10^0 Pa · s y anchos de 8 y 20 μm para los canales de conexión. El total de resultados es de 40.
- Cambios de viscosidades de 1×10^{-5} hasta 1×10^{-1} Pa · s para los canales laterales y 1×10^{-5} hasta 1×10^1 Pa · s para los de conexión, siendo en total 100 resultados.
- Variación independiente de la viscosidad de los canales de conexión (divididos en superior cuando el canal lateral correspondiente está cerrado e inferior donde el canal lateral respectivo está abierto a la atmosfera) de 1×10^{-5} hasta 1×10^0 Pa · s , con un total de 400 resultados.

Las condiciones generales son las mismas que se utilizaron en simulaciones previas: flujo dirigido por diferencia de presión, entrada en por el canal principal con una presión de 123 kPa y una entrada de estabilización de 500 μm ; salida del flujo en el canal principal y lateral inferior como se indica en el diagrama; no deslizamiento en paredes y canal somero con una profundidad de 22 μm .

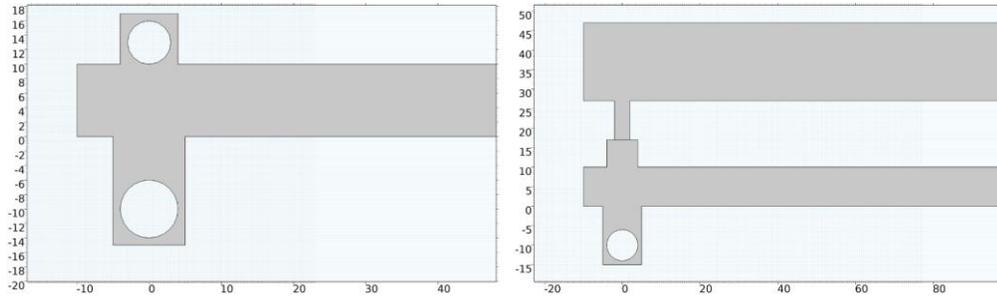


Figura 33 – Geometrías para la simulación del esfuerzo cortante. El círculo en la parte inferior de ambas figuras representa la célula atrapada. La posición de centro su centro respecto a la pared inferior del canal principal representa un cambio en el alto de la trampa. A la izquierda, el sistema con una perla atrapada en la trampa opuesta, bloqueando el acceso al canal lateral. A la derecha, la misma trampa vacía, con acceso al canal lateral opuesto.

La malla utilizada es triangular con un tamaño de elemento *Finer*. La solución se da para el estado estacionario.

Por otro lado, de manera independiente se realizaron simulaciones para el esfuerzo cortante que presentarían las células bajo dos condiciones principales: cuando la trampa de la perla correspondiente a la célula este vacía y cuando este ocupada. Lo anterior implicaría que, en el primer caso, exista flujo hacia el canal lateral opuesto, mientras que, en el segundo, la perla bloquearía el acceso hacia este y no habría flujo hacia ningún canal lateral.

Para lograr las condiciones anteriores, se utilizaron las geometrías presentadas en la Figura 33. A la izquierda se observa que no existen canales laterales, por lo que el flujo se conducirá solo por el canal principal. En la derecha, se tiene un canal lateral cuyo ancho es mayor al del canal principal para otorgar una menor resistencia a este. El canal principal tiene una longitud de $1500 \mu\text{m}$ que no se encuentra dentro de la vista presentada. Ambas condiciones se realizaron utilizando una presión de entrada que varió de 0.6 a 13.8 kPa, así como la posición del centro de la célula respecto a la pared, suponiendo con esto último un cambio en la altura de la trampa de 4 a $14 \mu\text{m}$. La trampa en este modelo tiene una altura de $15 \mu\text{m}$ para permitir el movimiento del centro en el estudio paramétrico. El sistema tiene una entrada de estabilización de $250 \mu\text{m}$, para compensar el cambio del ancho del canal principal y la viscosidad es igual en todo el sistema ($\mu = 0.0010093 \text{ Pa} \cdot \text{s}$). La

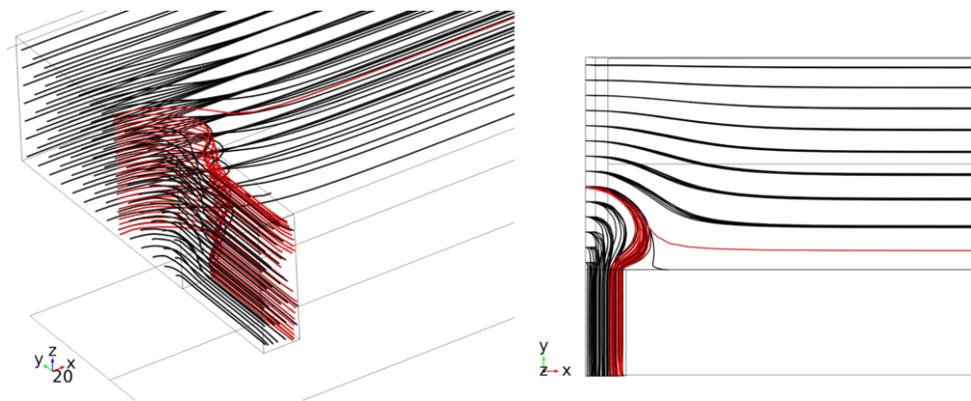


Figura 34 – Líneas de flujo en modelo simple. Las líneas de flujo en rojo son aquellas que inician a una altura de 8 μm desde la entrada, es decir, son las líneas de flujo límite en la prueba.

La malla utilizada fue triangular con un tamaño estándar *fine*. De igual manera, la solución es en el estado estacionario.

En la siguiente sección se muestran y discuten los resultados obtenidos por las simulaciones descritas anteriormente.

5.3 RESULTADOS

El uso de las ecuaciones (5.25) y (5.26) para encontrar el ancho de conexión necesario para una línea de flujo límite deseada resultó exitoso, pues como se muestra en la Figura 34, la gran mayoría de las líneas de flujo que existen debajo de la línea límite en rojo se dirigen hacia el canal de conexión como se esperaba. Esto nos indicaba la posible utilización del modelo anterior para la futura elección de las dimensiones de los canales en el dispositivo.

Para continuar observando el desempeño de la estrategia anterior, se utilizaron los modelos geométricos que se muestran en la Figura 31. La primera simulación fue realizada con el modelo de múltiples canales de conexión y como se observa en la Figura 35, existen líneas de flujo debajo de

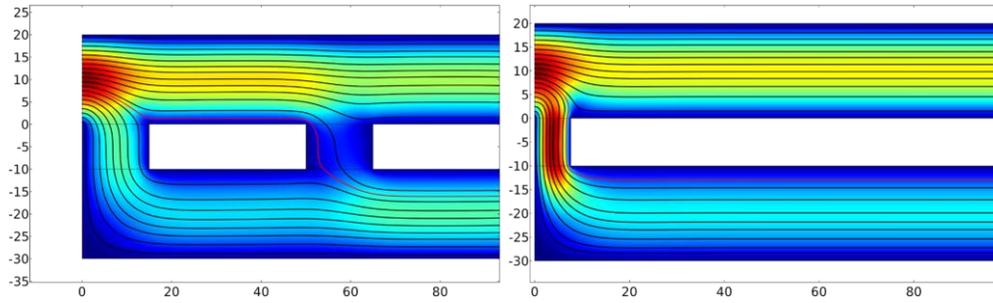


Figura 35 – Líneas de flujo y campo de velocidad en la entrada de los modelos geométricos bidimensionales. La línea roja representa la línea de flujo limite que inicia a $8 \mu\text{m}$ del origen del eje vertical. A) Modelo con múltiples canales de conexión, b) modelo con un solo canal de conexión.

la línea de flujo limite en rojo que no se dirigen en dirección del primer canal de conexión como se esperaba, sino hasta el segundo.

Por otro lado, las simulaciones para el modelo con un solo canal de conexión resultan exitosas, pues como se observa en la derecha de la Figura 35, ésta establece la interfaz entre el flujo que mantiene su dirección en el canal principal y el que se dirige hacia el canal lateral por el canal de conexión.

Para tener certeza que existe un ancho del canal de conexión tal que se tengan las condiciones de flujo anteriores (una línea de flujo limite que inicie a $8 \mu\text{m}$),

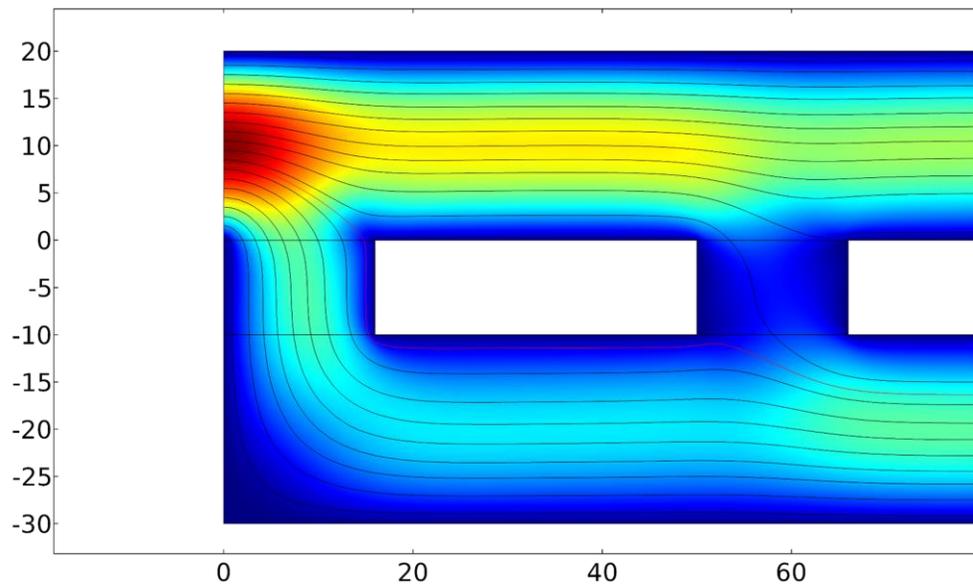


Figura 36 – Líneas de flujo y campo de velocidad para el resultado aceptable de las simulaciones paramétricas donde se variaba el ancho del canal de conexión. La línea de flujo en rojo inicia a una distancia vertical de $8 \mu\text{m}$ desde el origen y sigue una trayectoria por el primer canal de conexión.

se realizó la simulación paramétrica descrita en la sección precedente. Los resultados de esta mostraron que, efectivamente, un canal de conexión con ancho $17\ \mu\text{m}$ producirá el flujo deseado en la geometría con múltiples canales tal como se ve en la Figura 36.

Con lo anterior se tiene entonces que el planteamiento del cual se obtuvo las relaciones de flujos en párrafos más arriba contiene suposiciones equivocadas o que no son ciertas cuando existen múltiples canales de conexión, modelo que se aleja de la inicial con uno solo canal. Una de las ideas erróneas que tendría mayor peso en estos resultados es la diferente caída de presión entre las secciones del canal principal y las del canal de conexión y lateral estudiado, en donde la suposición utilizada en **(5.24)** ya no es válida. Además, también se tiene que las resistencias equivalentes utilizadas (señaladas en la Figura 30) no sean correctas, pues, aunque solo se quiere estudiar una sección del dispositivo, los canales en esta parte se encuentran unidos a todo el sistema, teniendo una resistencia equivalente diferente y más compleja al involucrar uniones en paralelo y en serie, por lo que al utilizar la suposición inicial en este modelo se omiten los efectos causados por el resto del sistema. Esto contrasta con los resultados del modelo derecho de la Figura 35 en donde las suposiciones iniciales son cumplidas, ya que solo se agrega una resistencia en serie: el canal lateral.

Un modelo matemático similar al descrito inicialmente, pero para sistemas con múltiples canales en serie y paralelo, requiere de una mejor definición de las resistencias involucradas, así como establecer las caídas de presiones de manera exacta para poder encontrar sus ecuaciones de diseño como la que se presenta en **(5.27)**.

Debido a la incapacidad de utilizar el modelo matemático anterior para deducir las dimensiones del dispositivo óptimas para los objetivos propuestos, se realizaron simulaciones paramétricas similares a la descrita en los últimos resultados en un modelo más cercano a la geometría del dispositivo, en donde

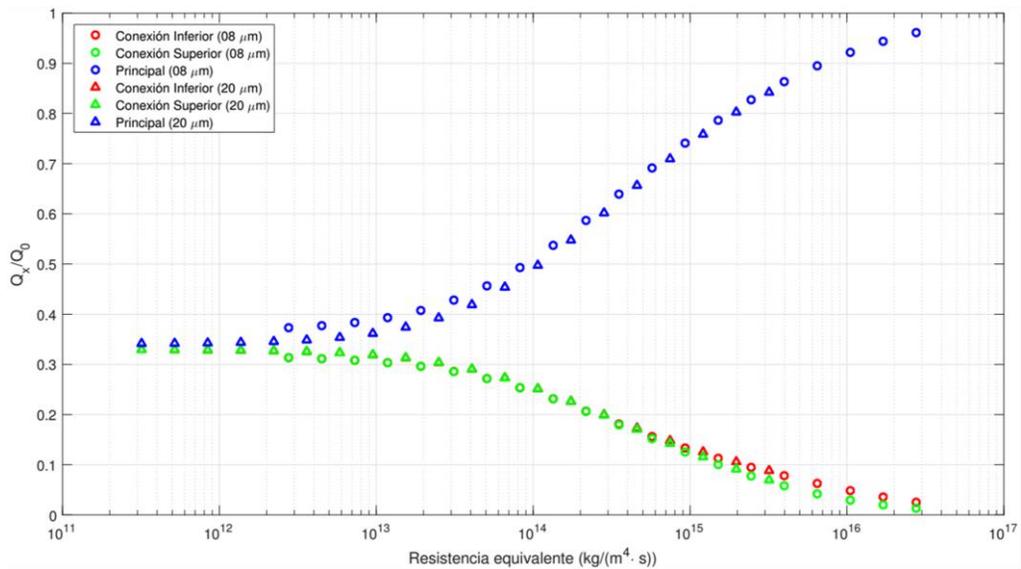


Figura 37 – Razón de flujos volumétricos entre el canal correspondiente y la entrada en función de la resistencia equivalente de un canal de conexión. La resistencia equivalente de los canales es modificada a través del cambio en la viscosidad en la región de estos canales y en el ancho de estos (8 y 20 μm).

se varían ciertos parámetros del modelo tal como se describe en la sección 5.2 condiciones de simulación.

En la primera de estas simulaciones se tienen los efectos causados por la alteración en la resistencia de los canales de conexión en ambos lados del canal principal. En la gráfica de la Figura 37 se tiene las razones entre el flujo del canal correspondiente y el flujo de entrada respecto a la resistencia equivalente de un canal de conexión. Inicialmente se puede observar que los cambios en el ancho del canal de conexión muestran un comportamiento similar en resistencias grandes, sin embargo, conforme esta disminuye existe un desfase entre estos. Esto se puede atribuir a una combinación de dos factores: 1) el uso de la ecuación de resistencia para canales rectangulares se vuelve más inexacta cuanto más se acerca el ancho a la profundidad del canal y 2) la viscosidad deja de contribuir a la resistencia cuanto menor sea su valor. De esta manera, las resistencias pequeñas son causadas por una viscosidad menor, cuando es así, la viscosidad deja de ser un factor relevante en la ecuación y los efectos de las dimensiones del canal se vuelven evidentes. A pesar de esto, se considera que el comportamiento general de las resistencias

es lo suficientemente similar en ambos casos (anchos 8 y 20 μm) como para validar el uso de la equivalencia por viscosidad en subsecuentes simulaciones.

Algo que también puede observarse es la tendencia de los flujos de conexión y principal a converger a una misma razón cuanto menor sea la resistencia de los canales de conexión. Esto se puede entender si se considera el caso en donde los canales de conexión son inexistentes ($R_c = 0$) y la variación de presión solo es significativa en dirección paralela al flujo principal ($\Delta p_y = \Delta p_z = 0$). Aquí, la caída de presión del canal principal y en ambos canales laterales es la misma por lo que se tiene que:

$$Q_{Li} = \frac{\Delta P}{R_{Li}}; Q_{Ls} = \frac{\Delta P}{R_{Ls}}; Q_P = \frac{\Delta P}{R_P}; Q_{Li}R_{Li} = Q_{Ls}R_{Ls} = Q_P R_P \quad (5.26)$$

Y si las resistencias de ambos canales laterales son iguales a la del central (como en el modelo de la simulación), se encuentra que los flujos serán iguales. Asimismo, de aquí se deduce que en el modelo utilizado se tendrá un mayor flujo hacia los canales laterales (y por consiguiente las trampas/canales de conexión) cuando la resistencia de estos sea menor a la del principal.

De manera general, puede observarse que existen dos regiones en la gráfica: una donde los flujos en los tres canales son similares y una de cierre donde el flujo hacia los canales de conexión disminuye drásticamente respecto al flujo en el principal, donde el límite entre estas regiones es una zona difusa alrededor de $1 \times 10^{14} \text{ kg}/(\text{m}^4 \cdot \text{s})$.

Algo destacable también en estos resultados es la similitud en las razones de flujo que tienen ambos canales laterales, cuando se esperaba que el cierre de la salida del canal lateral superior supusiera un impedimento para el flujo hacia este. En la gráfica observamos como esta diferencia solo es apreciable en resistencias bastante altas, muy dentro de la región de cierre, por lo que se puede interpretar que el cierre de una salida no es suficiente para disminuir el flujo hacia el canal correspondiente. Lo anterior puede entenderse debido a

las múltiples conexiones que comparten los canales laterales y principal, siendo la última sección del dispositivo donde difieren ambos canales laterales.

Por lo tanto, la siguiente simulación fue realizada con el fin de encontrar los efectos resultantes de una variación en los canales laterales y de conexión. En la Figura 38 se muestran cuatro de los cien resultados obtenidos de esta simulación, siendo estos los casos extremos de las condiciones utilizadas: mínima resistencia lateral y de conexión, mínima resistencia lateral y máxima de conexión, máxima resistencia lateral y mínima de conexión y máxima resistencia lateral y de conexión. Como se ve, en tres de los casos no existe flujo hacia los canales laterales, solo el que tiene menor resistencia total permite un flujo hacia estos.

En la gráfica de la Figura 39 se tiene la razón entre el flujo de los canales de conexión o principal y el flujo de entrada con respecto a la resistencia equivalente del primer segmento del canal lateral y de conexión

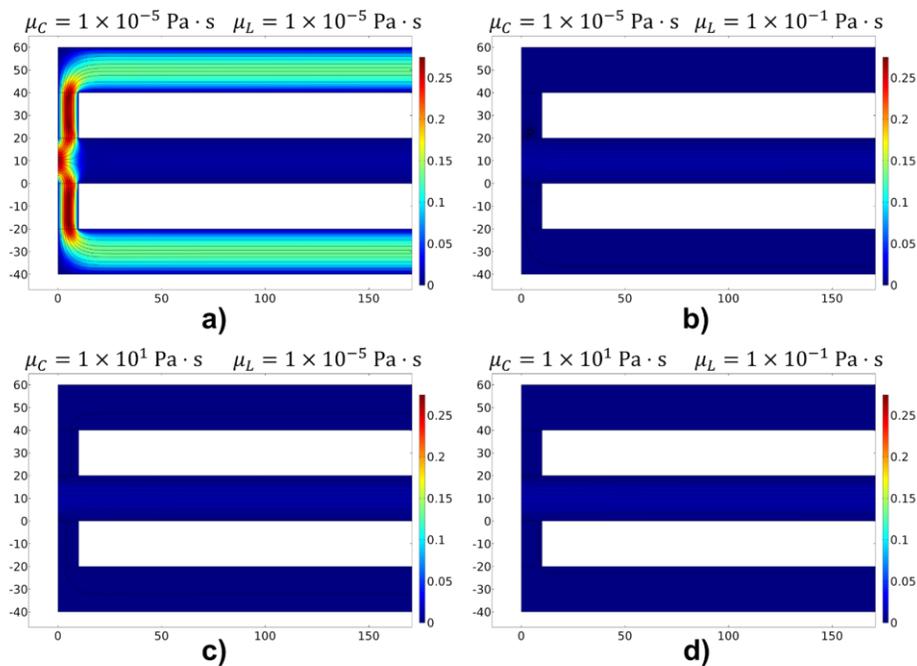


Figura 38 – Campo de velocidad y líneas de flujo en el primer segmento del modelo para cuatro extremos de las cien condiciones de simulación: a) resistencia total mínima, b) resistencia lateral máxima y de conexión mínima, c) resistencia lateral mínima y de conexión máxima y d) resistencia total máxima. Solo existe flujo hacia los canales laterales en el primer caso.

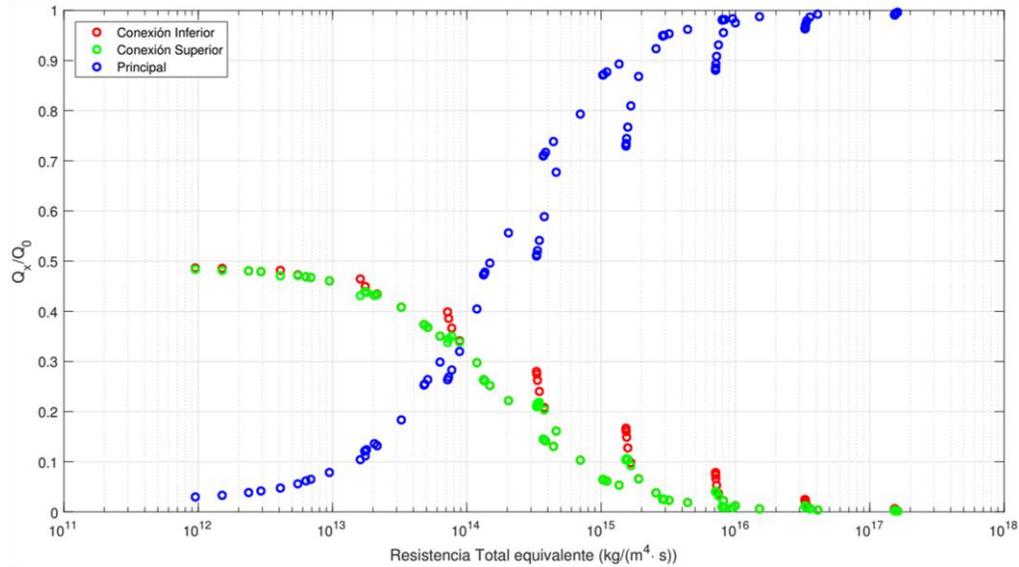


Figura 39 – Razón entre el flujo volumétrico del canal correspondiente y el flujo de entrada en función de la resistencia total equivalente, definida como la suma de las resistencias de un segmento del canal lateral más el canal de conexión respectivo.

correspondiente para las cien condiciones. En la gráfica se puede observar que, de nuevo, un aumento en la resistencia de ambos canales produce un flujo nulo hacia los canales de conexión/laterales, pero se encuentra un desplazamiento de la región de apertura de los canales de conexión, en donde ya no existe la tendencia a un mismo flujo entre los canales laterales y principal debido a una resistencia nula, en su lugar, este punto se encuentra en medio de ambas regiones. Según lo escrito en párrafos anteriores, en esta zona se encontraría una resistencia equivalente del conjunto canal de conexión/lateral igual a la del segmento de canal principal correspondiente. Agregando también, que la resistencia mínima causa un flujo nulo hacia el canal principal, con el flujo repartiéndose entre los canales laterales.

Además, en la gráfica se pueden observar rizados que se generan a lo largo de las tres curvas principales. Las curvas correspondientes a los canales de conexión son idénticas a lo largo del gráfico, sin embargo, su diferencia radica en estos rizados, donde los correspondientes al lado inferior alcanzan valores mayores que su contraparte superior. Dado que la única diferencia entre los canales de conexión y los canales laterales respectivos es la abertura de salida en estos últimos, podemos suponer que esto se debe esta salida y al cambio

de resistencia de los canales de conexión, pues son estos últimos los que conectarían al canal lateral superior (cerrado) con las otras salidas, lo que significa que el flujo superior verá una resistencia mayor a los flujos con salidas propias (los canales principal y lateral inferior no deben atravesar de nuevo los canales de conexión para salir del sistema). Entonces, como se ve también en la primera simulación, el dejar cerrado el canal superior parece otorgar una diferencia significativa en los flujos si las resistencias de los canales son altas.

La Figura 40 muestra de nuevo la razón de flujo del canal correspondiente y del flujo de entrada, pero esta vez en función de las resistencias independientes lateral y de conexión. Como se aprecia, el aumento de cualquiera de las resistencias ocasiona una disminución del flujo hacia los canales laterales y un efecto contrario cuando la resistencia disminuye. Lo anterior es fácilmente visible en las figuras anteriores, sin embargo, en esta gráfica es posible observar que la resistencia de los canales de conexión requiere ser un orden de magnitud más grande que la resistencia de canales laterales para lograr un efecto similar.

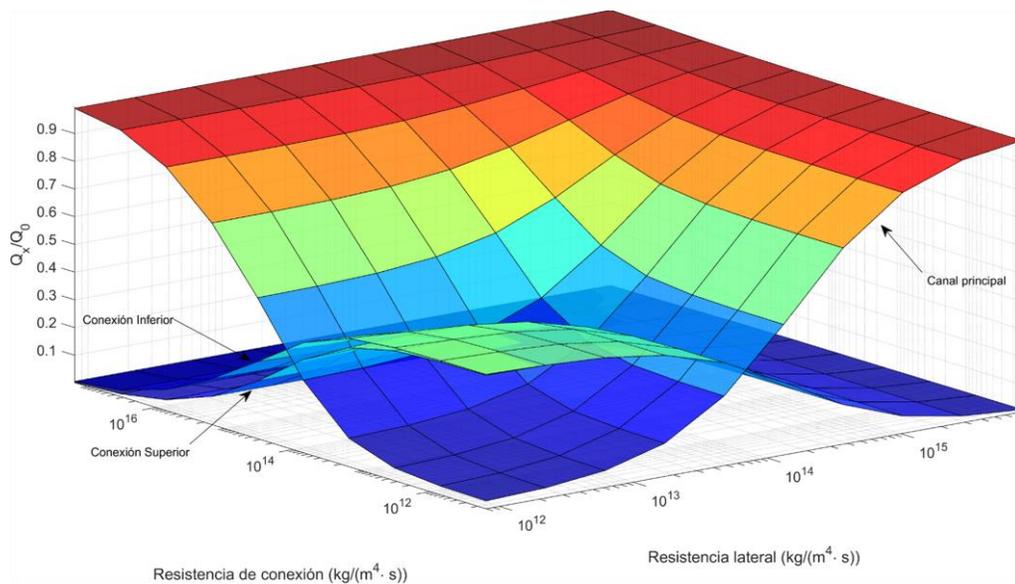


Figura 40 – Razones de flujo en el canal correspondiente y el flujo de entrada en función de la resistencia del canal de conexión y de la resistencia lateral. Las flechas indican la pertenencia de las superficies.

En la parte izquierda de la Figura 40 puede verse con mayor claridad la región desigual en flujos entre la parte inferior y superior. Aquí, se tiene que la diferencia es máxima cuando se tiene un valor más pequeño de la resistencia lateral, en un rango intermedio de la resistencia de conexión. Sin embargo, esta diferencia no es mayor a dos décimas del flujo de entrada, lo cual cuestiona la utilidad de cerrar el canal superior para promover la dirección del flujo en sentido opuesto.

Hasta ahora, las simulaciones implicaron una variación simétrica entre las resistencias de los canales, es decir, el canal lateral o de conexión superior tenían la misma resistencia que su contraparte inferior. Las siguientes simulaciones asumen que ambas regiones tienen diferentes propiedades con el fin de lograr un mejor direccionamiento del flujo.

La Figura 41 muestra los casos extremos en el primer segmento del modelo donde las resistencias de conexión son variadas independientemente. Los canales laterales son iguales a ambos lados del modelo, sin embargo, estos

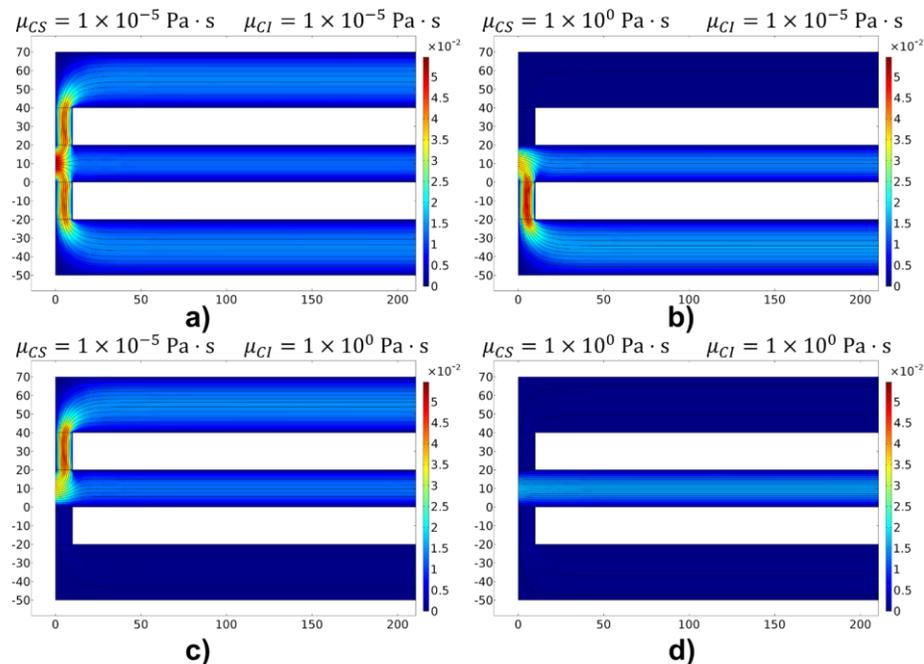


Figura 41 – Campo de velocidad y líneas de flujo para el primer segmento de modelo resultantes de cuatro condiciones extremas de simulación: a) resistencias iguales y mínimas, b) resistencia superior máxima e inferior mínima, c) resistencia superior mínima e inferior máxima y d) resistencias iguales y máximas.

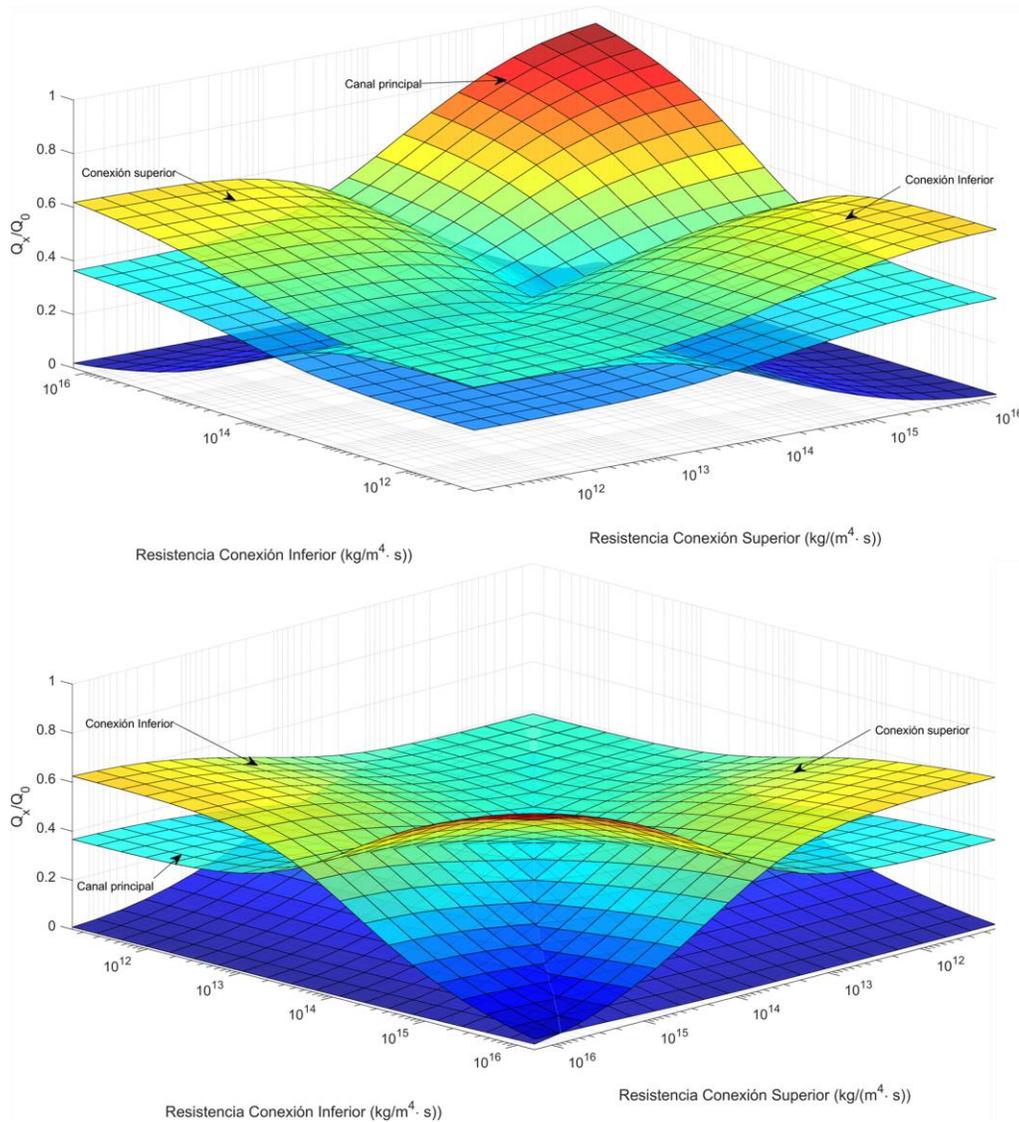


Figura 42 – Razones de flujo del canal correspondiente y el flujo de entrada en función de la resistencia de conexión superior e inferior. Vistas a) frontal y b) trasera de la gráfica.

han disminuido su resistencia respecto al canal principal aumentando su ancho. Los comportamientos observados son lógicos, donde una mayor resistencia implica un cierre del canal, evitando el ingreso de flujo en esa dirección. La Figura 42 muestra los resultados para todas las simulaciones. Se puede observar que aumentar el ancho del canal de conexión disminuye la región donde el flujo del canal central es cercano al flujo de entrada.

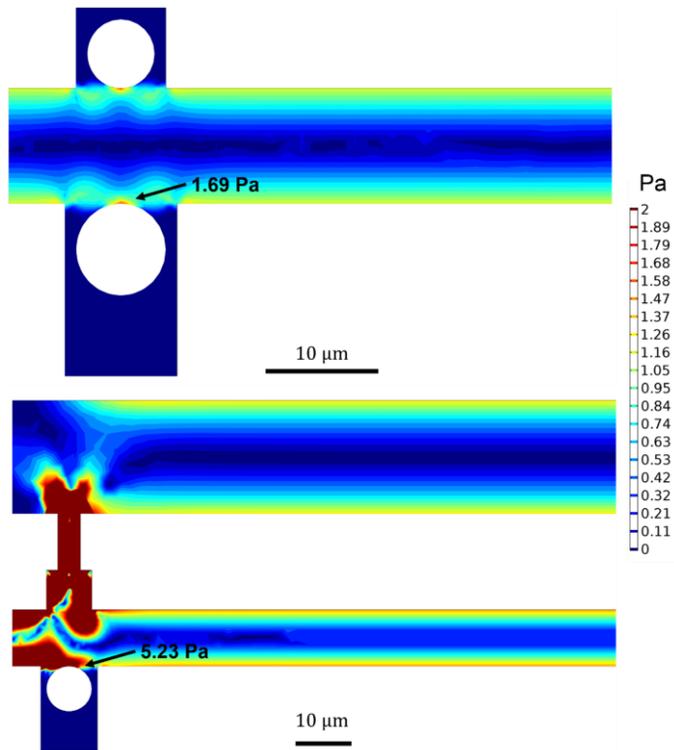


Figura 43 – Esfuerzo de corte para una dimensión de trampa igual a la original (altura $8 \mu\text{m}$, centro de célula $4 \mu\text{m}$) con una presión de entrada de 3.4 kPa para canal lateral opuesto bloqueado (arriba) y abierto (abajo). La escala de colores se encuentra truncada hasta los 2 Pa por claridad.

En cuanto a los resultados para el esfuerzo cortante, se obtuvo lo siguiente. En la Figura 43 se presentan los dos casos mencionados de ocupación de la trampa de perla opuesta para el tamaño de trampa de célula original con una presión de entrada de 3.4 kPa . Como se observa, incluso con esta baja presión, la célula está sufriendo un esfuerzo cortante mayor a 1 Pa en ambos casos, aunque es mayor la superficie sobre la que se tiene un esfuerzo mayor a 1 Pa cuando la trampa opuesta se encuentra libre.

Los resultados para todas las simulaciones se muestran en la Figura 44. Aquí se muestra un mapa de contorno, con dos áreas definidas por su comparación respecto a $\tau = 1 \text{ Pa}$. Como se observa en ambos casos, con la medida original de la trampa, la célula está expuesta a un esfuerzo cortante alto, con prácticamente cualquier presión de entrada. También es posible apreciar que cuando se tiene libre el paso al canal lateral, las células reciben un mayor

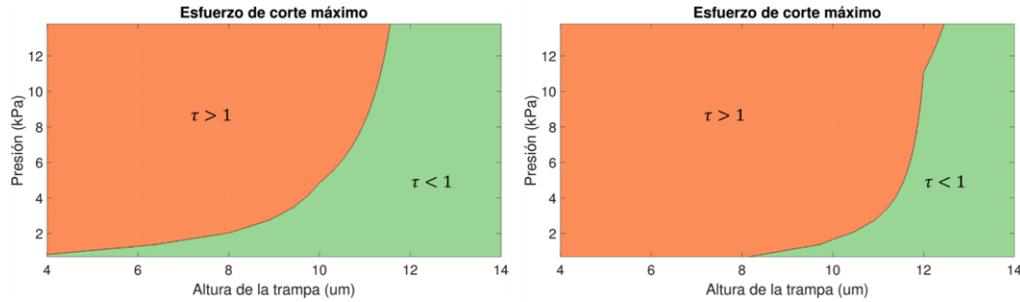


Figura 44 – Gráficas de esfuerzo cortante en función de la altura de la trampa y la presión de entrada. A la izquierda, canal lateral bloqueado. A la derecha, canal lateral abierto.

esfuerzo cortante, disminuyendo la zona confort (es decir, $\tau < 1$ Pa), donde se tienen esfuerzos mayores a 40 Pa en las presiones más elevadas.

De acuerdo con las gráficas, para asegurar esta zona de confort, se requiere de una presión baja y una altura de trampa alta. Sin embargo, es posible llegar a un compromiso con una altura de trampa suficientemente grande, por ejemplo, una medida de 12 μm parece ser suficiente en gran parte de la gráfica, presentando solo un esfuerzo dañino en presiones relativamente altas. La Figura 45 muestra el esfuerzo con estos parámetros para ambas condiciones.

En esta parte del trabajo se trató de encontrar una expresión que permitiera encontrar los parámetros de diseño necesarios para que una porción de flujo determinada fluyera hacia una dirección. Lo anterior, bajo la premisa que las perlas y células seguirían la trayectoria de este último. Sin embargo, no se logró encontrar una que se adaptara a la configuración del sistema propuesto aquí. Es por este motivo, que utilizando simulaciones paramétricas (es decir, con cambios en ciertas variables), se trató de comprender la naturaleza del flujo en el dispositivo y de esta manera encontrar de forma heurística los parámetros de diseño necesarios para lograr la meta de mejorar la eficiencia de captura.

Los resultados muestran que se requiere un cambio en las resistencias de los canales que conforman el sistema, en donde se tenga una resistencia progresivamente mayor en el siguiente orden: sistema de canales trampa y

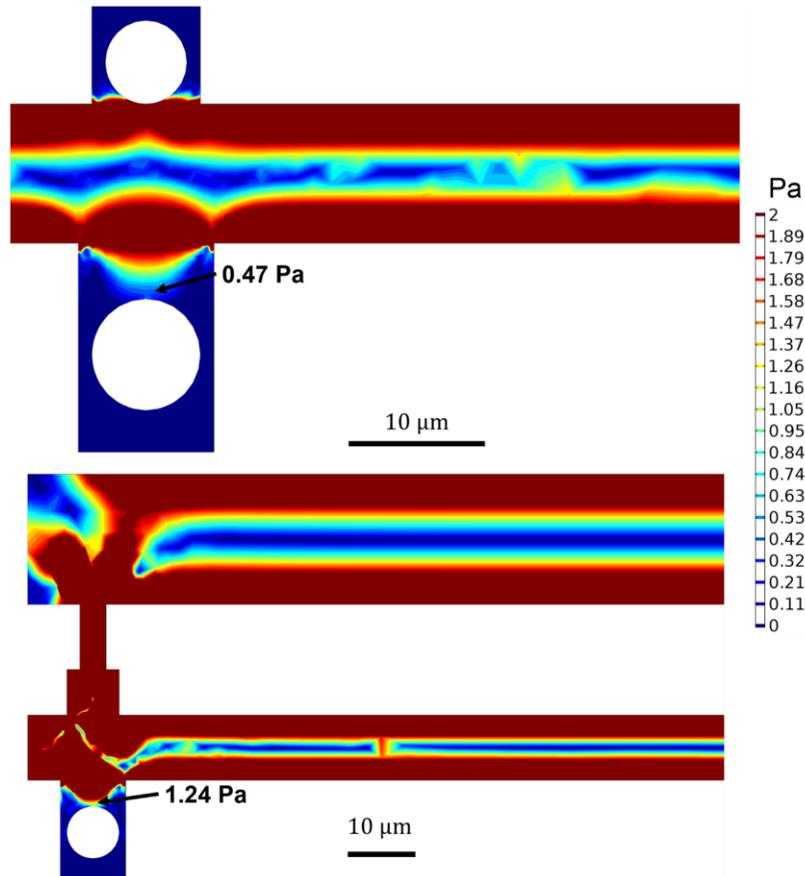


Figura 45 – Esfuerzo de corte para una dimensión de trampa con altura $12\ \mu\text{m}$ (centro de célula $8\ \mu\text{m}$) con una presión de entrada de $13.8\ \text{kPa}$ para canal lateral opuesto bloqueado (arriba) y abierto (abajo). La escala de colores se encuentra truncada hasta los $2\ \text{Pa}$ por claridad.

laterales correspondientes a la célula, sistema de canales trampa y lateral correspondiente a las perlas y finalmente el canal principal. De esta manera, se tendrá una mayor captura en la parte inicial (células) que, al sellar su lado respectivo del sistema, ocasionará que la segunda parte de captura (perlas) tenga la menor resistencia y sea a este lugar donde se dirija el flujo.

Así mismo, las simulaciones del esfuerzo de corte muestran que se requieren trampas más profundas para evitar daño o activación indeseada por el flujo, pues la altura original presenta inconvenientes incluso en flujos relativamente bajos (desde $1\ \text{kPa}$).

Lo anterior sobre los flujos y lo encontrado en la sección previa acerca de la adsorción-difusión, se discute con más detalle a continuación.

6 PROPUESTA Y CONCLUSIONES

De la primera parte de las simulaciones, correspondiente a la difusión y adsorción del analito en el medio, tenemos que el dispositivo debe tener una distancia grande entre trampas para lograr reducir la contaminación entre trampas, así como maximizar la adsorción por parte de la perla blanco. Sin embargo, esta distancia está limitada por la propiedad de espacio reducido inherente en los dispositivos microfluídicos, y dado que la tendencia observada en los resultados indica que la distancia entre las trampas debe ser bastante grande para lograr reducir una cantidad considerable la contaminación, se necesita aumentar la trayectoria del analito entre trampas, mientras se conserva una distancia entre trampas mínima. Una de las formas más utilizadas en la microfluídica el serpentín, el cual es mostrado en la Figura 46, el cual se utiliza usualmente para generar una resistencia deseada en el diseño [49]. El serpentín permite crear zonas de desplazamiento grandes en superficies pequeñas debido a la multitud de pliegues que lo conforman. De esta manera, se sortearía el aumentar la distancia de desplazamiento del analito entre las trampas, sin acrecentar la distancia entre estas.

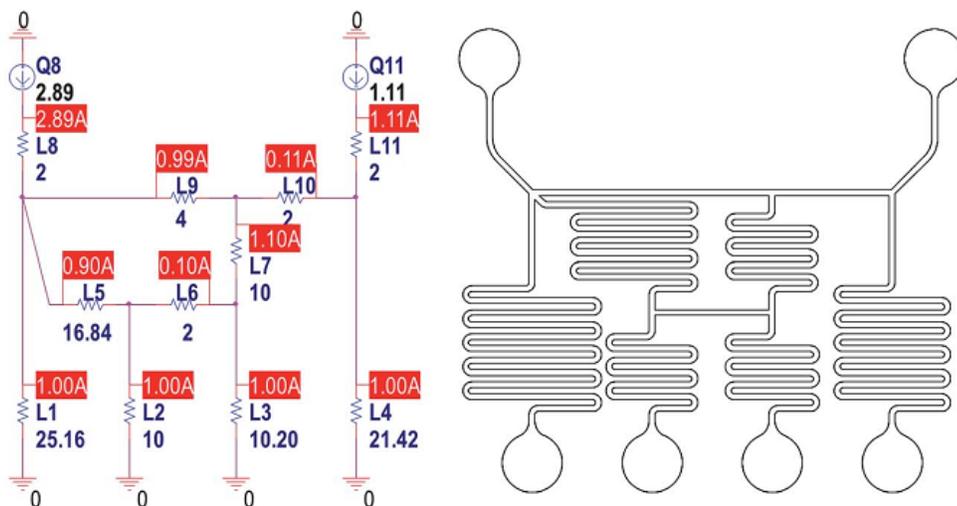


Figura 46– Diagrama de un sistema microfluídico de dilución, donde se requiere el uso de diferentes valores de resistencias para lograr su objetivo. A la izquierda se encuentra el equivalente eléctrico del sistema y a la derecha el sistema de canales microfluídicos con serpentines de diferente tamaño análogos a las resistencias eléctricas de la izquierda. Modificado de Oh [48].

Por otro lado, estas simulaciones también mostraron que una disminución de la constante de difusión debido a, por ejemplo, un aumento en el peso molecular, se lograría una mejora en los resultados de cobertura y contaminación. Este aumento del peso molecular puede ser debido a la unión del analito con el marcador secundario, por lo que no se descarta la posibilidad que los resultados obtenidos al utilizar este último mejorarían lo esperado por las simulaciones que asumen solo la constante de difusión del analito libre.

Además, se observaron las mejoras que podrían darse si se asegura que la densidad de sitios de unión es al menos un orden de magnitud mayor al estimado para las perlas funcionalizadas que se supusieron para la simulación. Un punto de mejora sería obtener perlas con una mayor densidad de sitios con estraptavidina, lo que aumentaría la unión de anticuerpo biotinilado a la superficie. Por otro lado, aunque un aumento en la superficie no supondría necesariamente un aumento en la densidad, si implicara la captura de un mayor número total de analito por la perla, lo que ayudaría a disminuir la contaminación entre trampas. Aunque esto no se probó en las simulaciones, parecería que sería una buena manera de mejorar los dos parámetros ya expuestos pues es relativamente fácil conseguir perlas con diámetros mayores.

De esta manera, las simulaciones respecto a la difusión y adsorción del analito indican que la elongación del canal principal, el aumento en la concentración de anticuerpos sobre la superficie de la perla, así como su afinidad y la disminución de la difusividad provocan un aumento en la creación de complejos anticuerpo-analito en la perla y una disminución de la contaminación en perlas vecinas.

Mientras que de la segunda parte en las simulaciones se encuentra que las dimensiones de los canales deben ser cambiadas para mejorar la captura, tanto de perlas como de células. Por una parte, se debe aumentar el ancho de los canales de laterales respecto al canal principal para que de esta manera se logre desviar una buena parte del flujo hacia las trampas. Sin embargo, algo

que se encontró es que, si se realiza esto a ambos lados del canal central, la simetría del dispositivo provocará un direccionamiento indistinto hacia las trampas de perlas y células. Es por esta razón que se sugiere el cambio en la resistencia de los canales de conexión, donde el lado perteneciente a las perlas es menor a la resistencia equivalente del canal principal y el de las células es menor a estos dos.

Lo expresado en el párrafo anterior se lograría con un aumento en el ancho de los canales laterales, igualándolos con los del canal principal, además, la resistencia de estos se vería reducida si es utilizada la resolución de las simulaciones anteriores donde la distancia del canal principal es aumentada. La resistencia de los canales de conexión se podría reducir aumentando la altura de estos, ya que una modificación en el ancho podría permitir que las células o perlas escaparan de la trampa a través de estas.

Sobre el esfuerzo de corte, se observó que, con el tamaño original de trampa, las células quedan demasiado expuestas al flujo, por lo que requieren de colocarse en una profundidad mayor. Sin embargo, las células no pueden alejarse demasiado de las perlas, pues esto provocaría inconvenientes durante la etapa de difusión-adsorción, donde cada micrómetro es una distancia valiosa, recordando el termino cuadrático de la ecuación (4.7).

En resumen, se propone un diseño de un dispositivo con al menos $1\ 500\ \mu\text{m}$ de separación entre trampas de manera horizontal, en donde la resistencia equivalente del canal correspondiente a las células (inferior) es de un orden de magnitud inferior al canal lateral correspondiente a las perlas y esta a su vez sea también un orden de magnitud menor a la del canal principal. Además, se sugiere que las perlas sean funcionalizadas con un número 10 veces mayor de anticuerpo, logrando concentraciones superficiales $> 10^7\ \text{mol}/\text{m}^2$. Así mismo, las trampas de células deben tener una altura mínima de $8\ \mu\text{m}$. Este se muestra en la Figura 47.

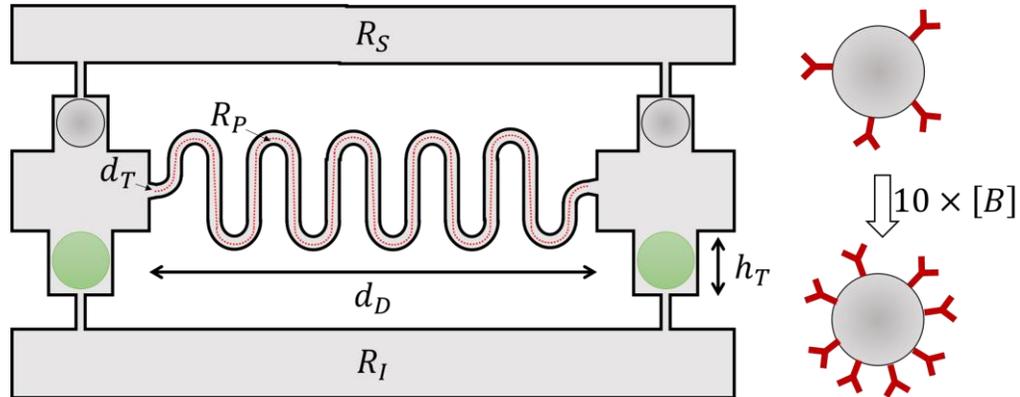


Figura 47 – Esquema del modelo propuesto. Las resistencias son diferentes de acuerdo con $R_P \gg R_S \gg R_I$. La distancia marcada por la línea punteada roja (d_T) es mayor a $1\ 500\ \mu\text{m}$, manteniendo una distancia entre trampas mínima ($d_T > d_D$). Las perlas deben tener 10 veces más sitios de unión que el estimado. La altura de las trampas (h_T) debe ser $\geq 8\ \mu\text{m}$.

El diseño original muestra una contaminación bastante alta (>99%, esquina inferior izquierda de las gráficas en la Figura 20), un flujo principal mucho mayor al del flujo de captura (resistencia total equivalente $>10^{14}\ \text{kg}/\text{m}^4 \cdot \text{s}$, Figura 39) y un esfuerzo cortante sobre las células atrapadas $>5\ \text{Pa}$ en el peor de los casos (gráfica inferior de la Figura 43), mientras que la propuesta pretende tener una contaminación menor al 80% (región azul de la gráfica superior derecha de la Figura 24), un flujo de captura preferencial (es decir, resistencias laterales menores al principal, pero diferentes entre sí, Figura 42) y un esfuerzo cortante $\sim 1\ \text{Pa}$ (gráfica inferior de la Figura 45). Por lo tanto, se debe dejar en claro que el diseño propuesto, aunque se espera con mejores resultados del diseño original, sigue obteniendo un rendimiento pobre y se concluye que un sistema simple como el mostrado en este trabajo no optimiza el funcionamiento del dispositivo y requeriría modificaciones completas en su geometría o la adición de más elementos físicos (ej. válvulas) para lograr resultados aceptables, aunque con esto se perdiera la sencillez de su fabricación y operación.

7 PERSPECTIVAS

Aunque parámetros importantes para el funcionamiento del dispositivo fueron modificados en las simulaciones, y el impacto de este cambio fue estudiado, quedaron fuera diferentes opciones que podrían ayudar en la optimización. Por ejemplo, se mencionó la posibilidad de cambiar el tamaño de las perlas. El aumento de la superficie de adsorción implicaría un incremento en el número total de sitios de unión, lo que podría resultar en un mayor número de analitos capturados [25].

Otro factor que se puede estudiar es la cantidad de sitios de unión real de acuerdo con la funcionalización de anticuerpos. En este trabajo se asumió que cada anticuerpo ligado a la superficie contenía solamente un sitio de unión con el analito y que este se encontraba disponible toda vez que no fuera ligado con el analito. En realidad, dependiendo del complejo antígeno-anticuerpo y la técnica de funcionalización, el número de sitios de unión no es equivalente al número de anticuerpos anclados a la superficie [26].

A sí mismo, el principio de detección del dispositivo es la detección por fluorescencia de un inmunoensayo tipo sándwich, por lo que existen dos reacciones: analito al anticuerpo de detección y este complejo al anticuerpo de captura. La suposición realizada fue que la reacción de importancia era la unión al anticuerpo de captura, por lo que no se toma en cuenta la formación del complejo analito-anticuerpo de detección. Lo anterior tendría dos implicaciones, una es el cambio en la cinética de unión observada y la otra una variación en el coeficiente de difusión, lo cual tiene efectos visibles en la contaminación y captura como ya se expuso.

Finalmente, se podrían realizar estudios computacionales para el supuesto diseño con válvulas y observar si realmente la adición de estas (y por consecuente, aumentar la complejidad del sistema) resulta en una mejora considerable del dispositivo.

8 REFERENCIAS

- [1] P. Mukherjee, S. Mani, Methodologies to decipher the cell secretome, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1834 (2013) 2226–2232. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.022.
- [2] Y. Lu, L. Yang, W. Wei, Q. Shi, Microchip-based single-cell functional proteomics for biomedical applications, *Lab Chip*. 17 (2017) 1250–1263. doi:10.1039/C7LC00037E.
- [3] M. Makridakis, M.G. Roubelakis, A. Vlahou, Stem cells: Insights into the secretome, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1834 (2013) 2380–2384. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.032.
- [4] M. Stastna, J.E. Van Eyk, Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery, *Proteomics*. 12 (2012) 722–735. doi:10.1002/pmic.201100346.
- [5] J.L. Paltridge, L. Belle, Y. Khew-Goodall, The secretome in cancer progression, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1834 (2013) 2233–2241. doi:10.1016/j.bbapap.2013.03.014.
- [6] C. Nathan, M. Sporn, Cytokines in Context, *J. Cell Biol.* 113 (1991) 981–986. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2289009/pdf/jc1135981.pdf>.
- [7] T. Vu, A. Rahimian, G. Stybayeva, Y. Gao, T. Kwa, J. van de Water, A. Revzin, Reconfigurable microfluidic device with integrated antibody arrays for capture, multiplexed stimulation, and cytokine profiling of human monocytes, *Biomicrofluidics*. 9 (2015) 044115. doi:10.1063/1.4928128.
- [8] S. Huang, Non-genetic heterogeneity of cells in development: More than just noise, *Development*. 136 (2009) 3853–3862.

doi:10.1242/dev.035139.

- [9] L. Huang, S.A. Michael, Y. Chen, H. Wu, Current Advances in Highly Multiplexed Antibody-Based Single-Cell Proteomic Measurements, *Chem. - An Asian J.* 12 (2017) 1680–1691. doi:10.1002/asia.201700404.
- [10] W.M. Weaver, P. Tseng, A. Kunze, M. Masaeli, A.J. Chung, J.S. Dudani, H. Kittur, R.P. Kulkarni, D. Di Carlo, Advances in high-throughput single-cell microtechnologies, *Curr. Opin. Biotechnol.* 25 (2014) 114–123. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.005.
- [11] P.S. Hoppe, D.L. Coutu, T. Schroeder, Single-cell technologies sharpen up mammalian stem cell research, *Nat. Cell Biol.* 16 (2014) 919–927. doi:10.1038/ncb3042.
- [12] M.P. McDonald, A. Gemeinhardt, K. König, M. Piliarik, S. Schaffer, S. Völkl, M. Aigner, A. Mackensen, V. Sandoghdar, Visualizing Single-Cell Secretion Dynamics with Single-Protein Sensitivity, *Nano Lett.* 18 (2018) 513–519. doi:10.1021/acs.nanolett.7b04494.
- [13] M. Junkin, A.J. Kaestli, Z. Cheng, C. Jordi, C. Albayrak, A. Hoffmann, S. Tay, High-Content Quantification of Single-Cell Immune Dynamics, *Cell Rep.* 15 (2016) 411–422. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.033.
- [14] X. An, V.G. Sendra, I. Liadi, B. Ramesh, G. Romain, C. Haymaker, M. Martinez-Paniagua, Y. Lu, L.G. Radvanyi, B. Roysam, N. Varadarajan, Single-cell profiling of dynamic cytokine secretion and the phenotype of immune cells, *PLoS One.* 12 (2017) 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0181904.
- [15] D.F. Cedillo Alcántar, Dispositivo microfluídico para la detección de proteínas secretadas por células individuales, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Monterrey, 2016.

- [16] M. Haga, A. Yamashita, J. Paszkowiak, B.E. Sumpio, A. Dardik, Oscillatory shear stress increases smooth muscle cell proliferation and Akt phosphorylation, *J. Vasc. Surg.* (2003). doi:10.1016/S0741-5214(03)00329-X.
- [17] K.-J. Bathe, *Finite Element Procedures*, 2006.
- [18] B.E. Rapp, *Microfluidics: Modeling, mechanics and mathematics*, 2016.
- [19] X. Xu, Z. Li, A. Nehorai, Finite element simulations of hydrodynamic trapping in microfluidic particle-trap array systems, *Biomicrofluidics*. 7 (2013). doi:10.1063/1.4822030.
- [20] A. Sohrabi Kashani, M. Packirisamy, Efficient Low Shear Flow-based Trapping of Biological Entities, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–15. doi:10.1038/s41598-019-41938-z.
- [21] L. Zhan, S.Z. Guo, F. Song, Y. Gong, F. Xu, D.R. Boulware, M.C. McAlpine, W.C.W. Chan, J.C. Bischof, The Role of Nanoparticle Design in Determining Analytical Performance of Lateral Flow Immunoassays, *Nano Lett.* 17 (2017) 7207–7212. doi:10.1021/acs.nanolett.7b02302.
- [22] H. Hajji, L. Kolsi, W. Hassen, A.A.A.A. Al-Rashed, M.N. Borjini, M.A. Aichouni, Finite element simulation of antigen-antibody transport and adsorption in a microfluidic chip, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures*. 104 (2018) 177–186. doi:10.1016/j.physe.2018.07.034.
- [23] E.J.F. Dickinson, H. Ekström, E. Fontes, COMSOL Multiphysics®: Finite element software for electrochemical analysis. A mini-review, *Electrochem. commun.* 40 (2014) 71–74. doi:10.1016/j.elecom.2013.12.020.
- [24] Q. Li, K. Ito, Z. Wu, C.S. Lowry, S.P. Loheide, COMSOL multiphysics: A novel approach to ground water modeling, *Ground Water*. 47 (2009) 480–487. doi:10.1111/j.1745-6584.2009.00584.x.
- [25] T.M. Squires, R.J. Messinger, S.R. Manalis, Making it stick: Convection,

- reaction and diffusion in surface-based biosensors, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 417–426. doi:10.1038/nbt1388.
- [26] B. Saha, T.H. Evers, M.W.J. Prins, How antibody surface coverage on nanoparticles determines the activity and kinetics of antigen capturing for biosensing, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8158–8166. doi:10.1021/ac501536z.
- [27] T. Gervais, K.F. Jensen, Mass transport and surface reactions in microfluidic systems, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 1102–1121. doi:10.1016/j.ces.2005.06.024.
- [28] R. Hansen, Theoretical and Experimental Analysis of Adsorption in Surface-based Biosensors Theoretical and Experimental Analysis of Adsorption in Surface-based Biosensors, 2012.
- [29] W. Kusnezow, Y. V. Syagailo, I. Goychuk, J.D. Hoheisel, D.G. Wild, Antibody microarrays: The crucial impact of mass transport on assay kinetics and sensitivity, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6 (2006) 111–124. doi:10.1586/14737159.6.1.111.
- [30] A.B. Dahlin, Size matters: Problems and advantages associated with highly miniaturized sensors, *Sensors.* 12 (2012) 3018–3036. doi:10.3390/s120303018.
- [31] G.A. Truskey, F. Yuan, D.F. Katz, Transport phenomena in biological systems, (2004).
- [32] M. Melli, G. Scoles, M. Lazzarino, Fast detection of biomolecules in diffusion-limited regime using micromechanical pillars, *ACS Nano.* 5 (2011) 7928–7935. doi:10.1021/nn202224g.
- [33] Q. Han, E.M. Bradshaw, B. Nilsson, D.A. Hafler, J.C. Love, Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving, *Lab Chip.* 10 (2010) 1391–1400. doi:10.1039/b926849a.

- [34] S. Frykman, F. Srienc, Quantitating secretion rates of individual cells: Design of secretion assays, *Biotechnol. Bioeng.* 59 (1998) 214–226. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980720)59:2<214::AID-BIT9>3.0.CO;2-K.
- [35] C.J. Choi, A.R. Belobraydich, L.L. Chan, P.C. Mathias, B.T. Cunningham, Comparison of label-free biosensing in microplate, microfluidic, and spot-based affinity capture assays, *Anal. Biochem.* 405 (2010) 1–10. doi:10.1016/j.ab.2010.06.009.
- [36] C.J. Choi, I.D. Block, B. Bole, D. Dralle, B.T. Cunningham, Label-free photonic crystal biosensor integrated microfluidic chip for determination of kinetic reaction rate constants, *IEEE Sens. J.* 9 (2009) 1697–1704. doi:10.1109/JSEN.2009.2030666.
- [37] L. Edelstein-Keshet, S. Athan, Diffusion of molecules and cytokines, (2000).
- [38] G.J. Goodhill, Diffusion in axon guidance, *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 1414–1421. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01496.x.
- [39] X. Duan, Y. Li, N.K. Rajan, D.A. Routenberg, Y. Modis, M.A. Reed, Quantification of the affinities and kinetics of protein interactions using silicon nanowire biosensors, *Nat Nanotechnol.* 7 (2012) 401–407. doi:doi:10.1038/nnano.2012.82.
- [40] N. Rousset, F. Monet, T. Gervais, Simulation-assisted design of microfluidic sample traps for optimal trapping and culture of non-adherent single cells, tissues, and spheroids, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–12. doi:10.1038/s41598-017-00229-1.
- [41] D.J. Beebe, G.A. Mensing, G.M. Walker, Physics and Applications of Microfluidics in Biology, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4 (2002) 261–286. doi:10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916.
- [42] J. Berthier, P. Silberzan, *Microfluidics for Biotechnology*, 2006.

doi:10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.

- [43] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics* (Oxford Master Series in Physics), 18 (2007) 40–41. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [44] T.M. Squires, S.R. Quake, *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*, *Rev. Mod. Phys.* 77 (2005) 977.
- [45] M. Yamada, M. Seki, Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics, *Lab Chip.* 5 (2005) 1233–1239. doi:10.1039/b509386d.
- [46] K. Toyama, M. Yamada, M. Seki, Isolation of cell nuclei in microchannels by short-term chemical treatment via two-step carrier medium exchange, *Biomed. Microdevices.* 14 (2012) 751–757. doi:10.1007/s10544-012-9653-8.
- [47] A. Guan, A. Shenoy, R. Smith, Z. Li, Streamline based design guideline for deterministic microfluidic hydrodynamic single cell traps, *Biomicrofluidics.* 9 (2015). doi:10.1063/1.4914469.
- [48] F.A. Morrison, *Understanding Rheology*, 1998.
- [49] K.W. Oh, K. Lee, B. Ahn, E.P. Furlani, Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy, *Lab Chip.* 12 (2012) 515–545. doi:10.1039/c2lc20799k.