



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

*Desarrollo de plataformas microfluídicas para el estudio
de la temporalidad del proceso de NETosis suicida*

Tesis que presenta

Alan Mauricio González Suárez

para obtener el grado de Doctor en Ciencias en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nuevo León

Abril de 2019

If everything seems under control, you're not going fast enough.

- Mario Andretti

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. José L. García Cordero, por el tiempo dedicado a este proyecto y a mi formación, por todas esas pláticas que me ayudaron a elegir mi camino, y por enseñarme que se pueden lograr muchas cosas, aunque parezcan difíciles, con el esfuerzo adecuado.

A mi amiga y ahora esposa, Gaby, por su dedicación hacía nosotros, lo que ha sacrificado por acompañarme en esta etapa y por seguir queriendo estar ahí, aunque no sepamos exactamente hacia dónde vamos.

A mis papás, Lorena y José, por siempre estar ahí y cada día buscar mi bienestar de tantas maneras, aun cuando a veces no me daba cuenta.

A mis suegros, Betty y Raul, por tanto apoyo aunque me haya llevado lejos una parte muy importante de sus vidas.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos, por quererme, apoyarme y darme tantos momentos de alegría cada que nos veíamos o hablábamos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, sobre todo a Manolo, Roberto, Diana, Toño y Rocío, y a Ángel, de los que aprendí mucho fuera y dentro del mismo.

A las personas de la Unidad Monterrey que estuvieron ahí en distintos momentos de estos cuatro años y ayudaron en diferentes formas a que llegara hasta este momento.

Al Dr. Arturo Hernández Cruz y Johanna Peña de la UNAM, por recibirme en su laboratorio, por su gran ayuda y por el conocimiento que me transmitieron.

Al CONACyT, por la beca para mis estudios de posgrado otorgada durante toda la duración del programa de doctorado.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDOS.....	4
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Señalización celular.....	10
1.1.1 Tipos de señalización celular.....	11
1.1.2 Tipos de receptores de membrana.....	13
1.1.3 Traducción de la señal.....	15
1.1.4 El calcio como segundo mensajero.....	15
1.1.5 Señalización celular dinámica.....	18
1.1.6 Heterogeneidad celular – análisis de células individuales.....	19
1.1.7 Microfluídica.....	22
1.1.8 Problemática en los análisis de señalización celular actuales.....	29
1.2 NETosis.....	34
1.2.1 Neutrófilos y Trampas Extracelulares de Neutrófilos.....	34
1.2.2 Estudios de NETosis.....	38
1.2.3 Problemática actual en el estudio del proceso de NETosis.....	41
2. OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo general.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3. MÉTODOS.....	45
3.1 Dispositivos microfluídicos.....	45

3.1.1	Diseño del dispositivo y fabricación de los moldes	45
3.1.2	Fabricación de los dispositivos microfluídicos por litografía suave multicapa	48
3.1.3	Operación de los dispositivos microfluídicos	51
3.1.4	Preparación de los dispositivos microfluídicos previo a los experimentos	53
3.1.5	Prueba de los dispositivos con colorantes vegetales.....	54
3.2	Cultivo celular de células HEK-293	55
3.3	Purificación de neutrófilos	55
3.4	Captura de células en micropozos	58
3.6	Estudios de oscilaciones de calcio intracelular.....	58
3.6.1	Diseño del generador de gradientes de concentración lineal	58
3.6.2	Caracterización del generador de gradientes de concentración lineal	63
3.6.3	Caracterización de la generación de pulsos	64
3.6.4	Simulaciones de estrés de corte	65
3.6.5	Marcaje con Calceína AM.....	66
3.6.6	Dinámica de calcio intracelular	67
3.6.7	Análisis de los datos	67
3.7	Experimentos de formación de NETs.....	70
3.7.1	Incorporación de una bomba peristáltica para el control del flujo volumétrico	70
3.7.2	Caracterización del tiempo de intercambio de soluciones en las cámaras	70
3.7.3	Caracterización del flujo volumétrico en las cámaras	71

3.7.4 Experimentos de formación de NETs en el dispositivo microfluídico	71
3.7.5 Análisis de los datos	73
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
4.1 Estudios de la dinámica de calcio intracelular en células HEK-293	74
4.1.1 Dispositivo microfluídico	74
4.1.2 Caracterización del dispositivo microfluídico con moléculas fluorescentes	79
4.1.3 Estudios de señalización celular	88
4.2 Estudio de la dinámica de formación de NETs en el proceso de NETosis suicida	101
4.2.1 Dispositivo microfluídico	101
4.2.1 Caracterización del dispositivo	104
4.2.3 Experimentos de formación de NETs	105
5. CONCLUSIONES	113
6. PERSPECTIVAS	116
7. REFERENCIAS	117

RESUMEN

El proceso de formación de trampas extracelulares, o NETosis, es un tipo de muerte celular en el cual neutrófilos extruyen su material genético como un mecanismo de eliminación de patógenos. Este proceso involucra diferentes vías de señalización dinámicas, pero la respuesta celular bajo una dinámica temporal de estimulación aún se desconoce. Para estudiar la respuesta de las células ante tales condiciones, es necesario desarrollar herramientas que puedan imitar las condiciones reales a las que las células están sometidas, y permitan analizar la respuesta de células individuales sometidas a estímulos variantes en tiempo y amplitud. En este trabajo presentamos dos dispositivos microfluídicos que permiten atrapar cientos de células individuales en distintos grupos y estimularlas con señales químicas dinámicas y controladas.

El primer dispositivo cuenta con un generador de gradientes de concentración que alimenta nueve cámaras independientes, cada una con 492 micropozos para atrapar células individuales. Las cámaras son estimuladas con las soluciones provenientes del generador de gradientes de concentración, seguido de un paso de lavado, permitiendo generar estímulos periódicos con una frecuencia máxima de 33.3 mHz. Como prueba de concepto, se atraparon células HEK-293 y se probó la funcionalidad dispositivo con estudios de la dinámica de calcio intracelular. El segundo dispositivo cuenta con ocho cámaras con 1050 micropozos cada una y permite la estimulación de cada cámara de manera independiente. Con este dispositivo se estudió la formación de trampas extracelulares de neutrófilos bajo estímulos dinámicos, permitiendo seguir el proceso de decondensación nuclear hasta el punto de ruptura de la membrana plasmática. Utilizando análisis de imágenes, se determinó la temporalidad del proceso en cientos de células únicas. Los dispositivos presentados muestran una manera distinta de analizar células individuales bajo estímulos dinámicos cada uno, permitiendo su empleo para llevar a cabo estudios de estas u otras vías de señalización en ellos.

ABSTRACT

The process of generating neutrophil extracellular traps, or NETosis, is a type of cell death in which neutrophils extrude their genetic material as a host defense mechanism. This process involves several time-dependent signaling pathways, where the response of the cell to the dynamical stimulation of NETosis inductors is still unknown. To study cellular response under such conditions it is necessary to develop tools that can mimic the microenvironment conditions to which cells are submitted, allowing the analysis of cellular response under time and amplitude-varying conditions. In this work, we present two microfluidic devices that allow the capture of hundreds of individual cells in different groups and stimulate them with controlled dynamical chemical signals.

The first device incorporates a concentrator gradient generator that feeds nine chambers with 492 microwells each, where individual cells are captured. Cells are stimulated with solutions from the gradient generator, followed by a washing step, allowing the generation of periodical signals with a maximum frequency of 33.3 mHz. As a proof of concept of the device functionality, we studied the intracellular calcium dynamics of HEK-293 cells. The second device comprises eight chambers with 1050 microwells each, permitting the independent stimulation of each chamber in a controlled fashion. Stimuli are injected directly to the device inlets. This device allowed the study of neutrophil extracellular traps under dynamical stimulation, where the chromatin decondensation process was monitored throughout the entire experiment. Using image analysis algorithms, the temporality of NETosis process was determined for hundreds of single-cells. Each presented microfluidic device shows a different way of interrogating single-cells, allowing the use of such platforms for different applications in cell signaling.

1. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se reporta el uso de técnicas de microfluídica para analizar el proceso de NETosis suicida bajo estímulos dinámicos. Dichos estudios se realizaron a nivel de células individuales, donde distintos grupos de células fueron sometidos a estímulos variantes en tiempo y amplitud de un inductor de NETosis. La respuesta de cada célula fue analizada de forma individual y comparada con la respuesta de toda la población.

Previo a este trabajo, no existen reportes donde se realicen análisis similares del proceso de NETosis. Incluso, reportes de estudios dinámicos en células individuales para cualquier vía de señalización celular son muy escasos debido a las complicaciones técnicas para realizarlos. Por esta razón, este proyecto decidió dividirse en dos partes: (1) el desarrollo de una plataforma microfluídica para el análisis dinámico de vías de señalización celular, y (2) el estudio del proceso de NETosis bajo estímulos dinámicos en una plataforma microfluídica.

En la primera parte del trabajo se describe el desarrollo de un dispositivo microfluídico para estudios de señalización celular dinámica, empleando distintas técnicas de microfluídica integradas en un solo dispositivo. El dispositivo microfluídico se probó con una línea celular (HEK-293), donde se realizaron estudios de oscilaciones de la concentración de calcio intracelular en respuesta a estímulos pulsados de un inductor químico de dicha vía de señalización. La segunda parte contempla el uso de una plataforma microfluídica similar a la desarrollada en la primer parte para los estudios del proceso de NETosis mencionados al principio del capítulo.

La estructura de los capítulos subsecuentes a lo largo de todo el escrito sigue esta misma lógica.

1.1 Señalización celular

Una célula depende de una comunicación directa con su entorno para sobrevivir y operar de manera eficiente. La manera en la que se comunica es a través de distintas señales o estímulos (químicos y físicos) provenientes del medio extracelular que permiten a la célula recibir la información, codificarla y desencadenar una respuesta acorde [1], [2]. En organismos multicelulares, el comportamiento de cada célula está cuidadosamente regulado para cumplir con sus funciones dentro del organismo y mantener la homeostasis [2]. Para lograr esta homeostasis, las células responden a innumerables señales intra- y extracelulares que controlan su proliferación, desarrollo y diferenciación, así como su comportamiento dentro del tejido al que pertenezcan [2]. El estudio de este fenómeno es parte central de la biología actual, ya que el lograr describir como las células logran comunicarse para llevar a cabo una función específica, es describir un parte del proceso de la vida de ese organismo [3].

La señalización celular en general se enfoca en la comunicación célula-célula a través de moléculas expresadas por una de ellas (v.g. factores de crecimiento y hormonas) y captadas por la segunda, a través de receptores específicos, que después desencadenan una reacción dentro de la célula receptora, que lleva a la activación de muchas otras moléculas dentro de esta [1], [2]. Esta comunicación célula-célula no está limitada en espacio; aunque existen vías de señalización donde es de suma importancia que las células estén en contacto directo para que se cumplan funciones, como el desarrollo embrionario o el control de una infección, pero otras células pueden secretar moléculas al medio extracelular y activar a otras células que estén en un tejido u órgano lejano. Cuando la molécula señal es secretada al medio extracelular y dependiendo de la distancia a la que ocurre, la comunicación celular puede dividirse en tres tipos,: *paracrina*, *endocrina* y *autocrina* [1], [2].

1.1.1 Tipos de señalización celular

La señalización *paracrina* es la que ocurre cuando una célula secreta moléculas que provocan una respuesta en células vecinas que no necesariamente estén en contacto directo con ella. Cuando las moléculas secretadas por una célula provocan una respuesta en ella misma, se le conoce como señalización *autocrina*. Por último, la señalización *endocrina* es la que ocurre cuando una célula secreta moléculas al torrente sanguíneo, llamadas hormonas, y estas actúan en células que pueden estar en cualquier parte del organismo [1], [2]. La **Figura 1.1** muestra los principales tipos de señalización celular.

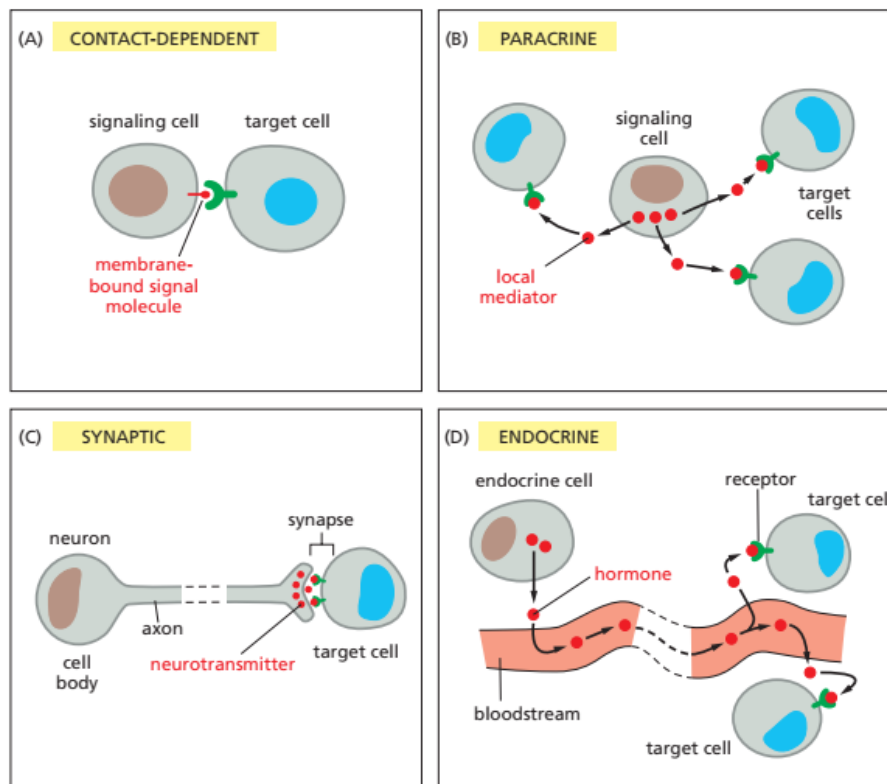


Fig. 1.1 Tipos de señalización celular según la distancia a la que se opera. Tomada de [1].

Cuando las moléculas secretadas por otras células llegan a las células blanco, estas deben de ser capaces de captarlas para poder desencadenar una respuesta acorde y específica. Para esto, las células responden a través de moléculas llamadas *receptores*, que son moléculas complejas que tienen una conformación que solo les permite reconocer una molécula específica. Los

receptores pueden estar anclados a la membrana plasmática de la célula o dentro de la misma. Al primer tipo se le llaman *receptores de membrana*, y es el tipo más común de señalización celular. Debido a que la membrana plasmática es impermeable a muchas moléculas, por lo que para que una molécula llegue a un receptor intracelular, esta debe ser pequeña e hidrofóbica para poder atravesar la membrana plasmática. De manera general, cuando un receptor de membrana es activado por la molécula específica que es capaz de reconocer (también llamado *ligando*) genera una señal dentro de la célula, resultando en la activación de una o varias vías de señalización celular, que terminan en una o varias respuestas celulares. La **Figura 1.2** muestra un diagrama general de la activación de un receptor de membrana a través de un ligando.

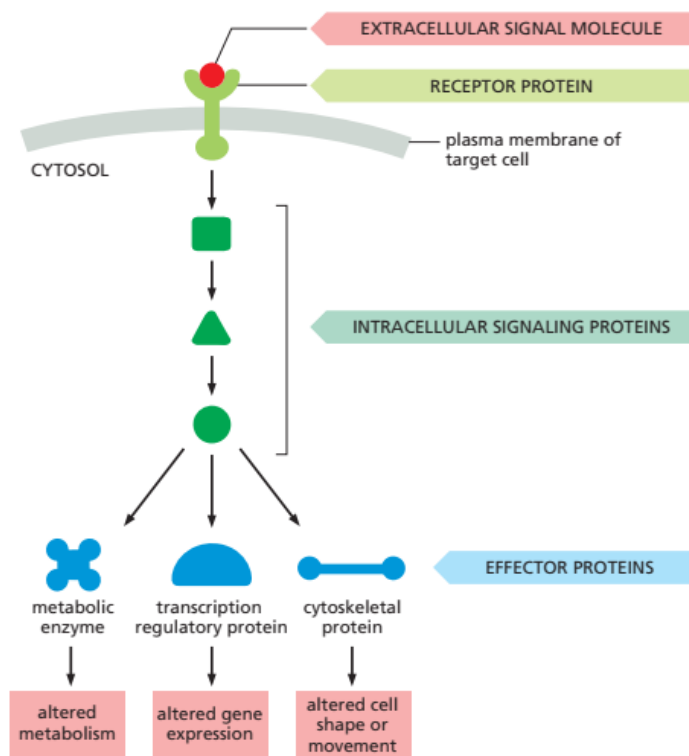


Fig. 1.2 Diagrama común de una vía de señalización activada debido a un receptor de membrana. Tomada de [1].

1.1.2 Tipos de receptores de membrana

Los receptores de membrana se dividen en tres principales grupos: los receptores acoplados a canales iónicos, receptores acoplados a enzimas y los receptores acoplados a proteínas G [1]. Los receptores acoplados a canales iónicos (o *receptores ionotrópicos*) son receptores que se activan con distintos neurotransmisores y su activación provoca la apertura de un canal iónico en la membrana, que permite el paso de iones del medio extracelular al medio intracelular, o en dirección contraria (**Figura 1.3**). Este tipo de receptores está asociado principalmente a uniones sinápticas, donde la neuronas secretan neurotransmisores que activan receptores de membrana en la célula blanco, activando un flujo de iones en la célula [4].

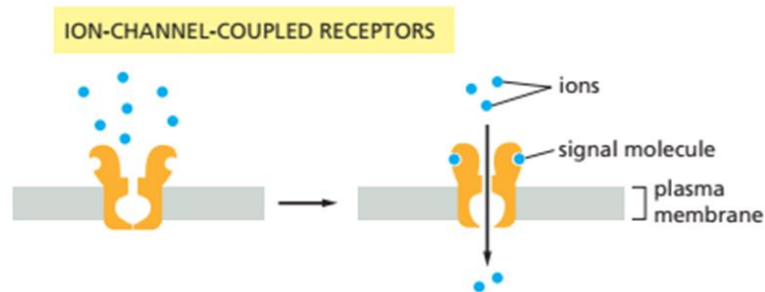


Fig. 1.3 Mecanismo de activación de los receptores acoplados a canales iónicos. Tomada de [1].

Los receptores acoplados a enzimas son proteínas transmembranales que tienen una función enzimática o que activan a una enzima asociada al ser activados. Existen distintos tipos de estos receptores, pero el más importante es el de los receptores tirosina cinasa (o quinasa). La gran mayoría de factores de crecimiento son reconocidos por estos receptores y activan distintas respuestas celulares de gran importancia, como crecimiento celular, proliferación, diferenciación, entre otras [5], [6].

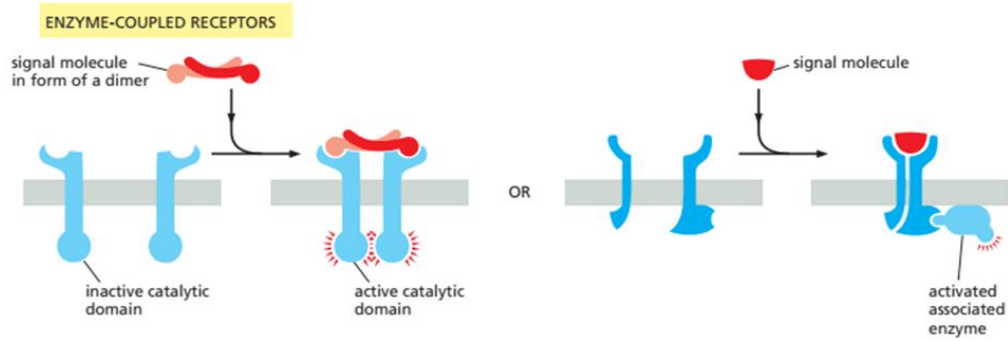


Fig. 1.4 Mecanismo de activación de los receptores acoplados a enzimas. Tomada de [1].

Los receptores acoplados a proteínas G es el mayor grupo de receptores membranales, y se encargan de mediar la respuesta ante la mayoría de los neurotransmisores, hormonas y estímulos del medio exterior, gracias a lo cual podemos ver, oler y probar, lo que los hace el blanco terapéutico de muchos fármacos [1], [7], [8]. Estos receptores, al ser activados, tienen un cambio conformacional que activa a una proteína G. Antes de la activación, la proteína G tiene una molécula de guanosina difosfato (GDP) asociada; al ser activada, pierde la unión con la molécula GDP, permitiendo que una molécula de guanosina trifosfato (GTP) se le una. Cuando esto sucede, se produce un cambio conformacional en la proteína G, liberando la molécula de GTP y desprendiéndose del receptor. De esta manera, las subunidades de proteína G pueden interactuar con canales iónicos o enzimas para generar una respuesta celular específica (**Figura 1.5**) [1].

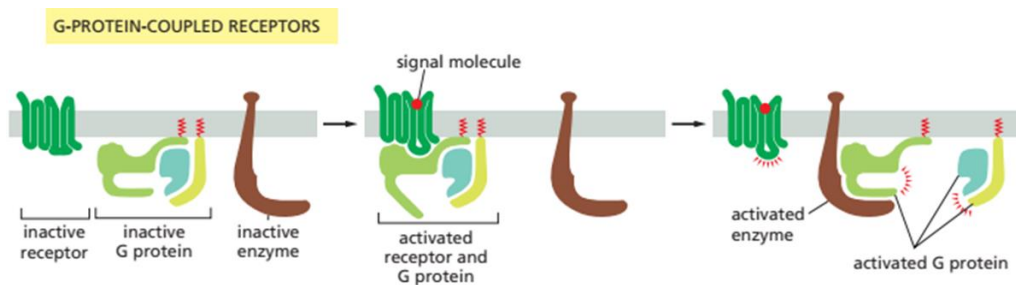


Fig. 1.5 Mecanismo de activación de los receptores acoplados a proteínas G. Tomada de [1].

1.1.3 Traducción de la señal

Después de que una célula detecta una señal específica a través de un receptor, una o más vías de señalización se activan para generar una respuesta en la célula. Esta respuesta es totalmente dependiente del tipo de célula, del ligando y del receptor [9]. Existen distintos tipos celulares con distintos receptores que identifican el mismo ligando, pero que tras ser activadas, generan diferentes respuestas celulares [9]. A su vez, diferentes tipos celulares pueden tener el mismo receptor y, de igual manera, la respuesta celular será distinta en cada tipo celular [9].

En la **Figura 1.2** se mostró un diagrama general de la respuesta celular ante la activación de un receptor de membrana. Cuando una vía de señalización es activada a través de un receptor, generalmente se generan incrementos de concentración en ciertas moléculas, a las que se les conoce como *segundos mensajeros*. Estos segundos mensajeros actúan como potenciadores de la señal y permiten que la señal culmine en una respuesta celular [10].

1.1.4 El calcio como segundo mensajero

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que se encuentra libre en el citosol de las células a una baja concentración (~100 nM) comparado con el espacio extracelular (~1 mM) o el torrente sanguíneo (~2.5 mM) [1], [11]. Este ion es de especial interés debido a que está involucrado en muchos y diversos procesos celulares. Por ejemplo, en hepatocitos ayuda a la producción de glucosa y bilis [12], está directamente involucrado en la contracción de las células musculares [13][14] y tiene un papel en la diferenciación neuronal [12], además de estar involucrado en el proceso de proliferación [15], así como de apoptosis y necrosis [16] celular. Lo que todos estos procesos tienen en común es que actúan bajo incrementos en la concentración de Ca^{2+} .

intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), pero no de manera estática, sino a través de transitorios de Ca^{2+} con distintas propiedades espaciales y temporales [14].

Un incremento en $[Ca^{2+}]_i$ puede ocurrir de dos maneras: la primera es que entre Ca^{2+} al medio intracelular desde el medio extracelular a través de canales iónicos, mientras que la segunda es que se libere Ca^{2+} de organelos intracelulares (conocidos como pozas intracelulares de Ca^{2+}), como del retículo endoplasmático (retículo sarcoplásmico para células musculares) hacia el citoplasma de la célula [1], [14]. Como es de esperarse, dependiendo del tipo de célula, del ligando y receptor que sea activado, se define cuál de las dos posibilidades ocurre. Para regresar a la concentración de Ca^{2+} basal, las células regresan el Ca^{2+} al medio extracelular a través de bombas, además de secuestrarlo dentro de pozas intracelulares como el retículo endoplasmático y gránulos secretorios [17].

Existen muchas moléculas involucradas en la señalización de calcio, desde receptores de membrana, bombas intercambiadoras, enzimas, canales iónicos, y algunas otras proteínas. Muchas de estas vías de señalización dependen de la generación de inositol trifosfato (IP3) para liberar Ca^{2+} de las pozas intracelulares y generar una respuesta celular. El IP3 es generado a través de una familia de enzimas llamada fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés). Estas enzimas son activadas por receptores acoplados a enzimas, por incrementos en $[Ca^{2+}]_i$ debido a otros mecanismos, por receptores acoplados a proteínas G, entre otros [14]. Particularmente los receptores acoplados a proteínas G, activan la enzima membranar fosfolipasa C- β (PLC β). Cuando esta enzima es activada, corta al fosfolípido de la membrana plasmática fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en una molécula de IP3 y una de diacilglicerol (DAG). En este punto la vía de señalización se divide en dos, una para cada molécula generada. En cuanto al IP3, este va y se une a los receptores de IP3 ubicados en el retículo endoplasmático, que liberan Ca^{2+} al citoplasma, incrementando así la concentración intracelular [1], [14], [17]. El Ca^{2+} liberado puede servir como un lazo de retroalimentación positiva en la

generación de IP₃, ya que puede activar a PLC; pero también actúa como un lazo de retroalimentación negativo, ya que aumenta la actividad de la IP₃ 3-cinasa, que fosforila el IP₃ a inositol tetrakisfosfato (IP₄). El IP₃ también puede ser defosforilado por la IP₃ 5-fosfatasa a inositol bifosfato (IP₂) [17]. Por otra parte, el Ca²⁺ a su vez puede actuar sobre el receptor de IP₃ del retículo endoplasmático, como un lazo de retroalimentación positivo. Este es un fenómeno llamado liberación de calcio inducida por calcio [18]. Dicho fenómeno de amplificación se auto limita por el vaciamiento de las pozas intracelulares y una retroalimentación negativa del Ca²⁺ sobre el receptor de IP₃. La **Figura 1.6** muestra la vía de señalización del IP₃ con los lazos de retroalimentación mencionados.

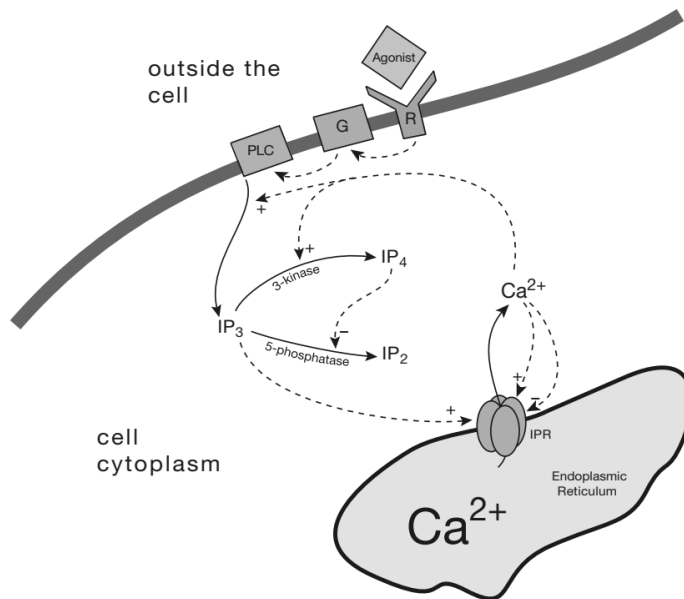


Fig. 1.6 Vía de señalización del IP₃. Tomada de [17].

Debido a los lazos de retroalimentación positivo y negativo del Ca²⁺ que contiene esta vía, durante su activación, se producen oscilaciones en las concentraciones de [Ca²⁺]_i e IP₃ [17]. Estas oscilaciones dependen de la sensibilidad de la señal (que está dada por la cantidad de receptores disponibles), su afinidad al ligando y a otras proteínas efectoras involucradas en la vía, dependiendo del tipo celular. Aunque no se sabe si las oscilaciones en IP₃ tienen algún efecto en las células, sí se sabe que oscilaciones en [Ca²⁺]_i

pueden llevar a distintas respuestas celulares; incluso la activación de IP3 por distintas vías lleva a oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ de distinta magnitud o temporalidad [14].

1.1.5 Señalización celular dinámica

De la sección anterior se puede concluir que las vías de señalización no son eventos estáticos, sino patrones complejos distintos que dependen de la interacción de muchas moléculas y lazos de retroalimentación que los convierten en un sistema altamente dinámico. Actualmente, hay un gran interés en la biología por descifrar cómo las células son capaces de codificar todas estas señales dinámicas provenientes de su medio para llevar a cabo tareas específicas [19]–[21]. Tradicionalmente, casi cualquier estudio biológico se realizaba de manera estática: el sistema celular en cuestión era sometido a una serie de estímulos que llevaban a una respuesta que podía ser medida de distintas maneras (fluorescencia, colorimetría, espectroscopía, entre otros métodos), pero en intervalos preestablecidos. En la **Figura 1.7** se muestra una representación de los métodos tradicionales para estudios de señalización celular.

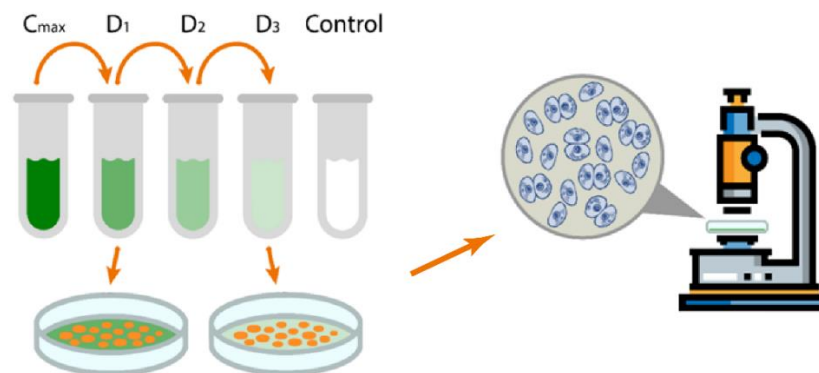


Fig. 1.7 Análisis de la respuesta celular en placa de cultivo. Tradicionalmente, para estudiar cualquier mecanismo celular, distintos cultivos celulares son estimulados con distintas concentraciones de un fármaco, para después medir su respuesta a través de alguna técnica, por ejemplo, por microscopía de fluorescencia.

En 1998, Dolmetsch [22] utilizó una línea celular de células T (Jurkat) para inducir la activación de tres distintos factores de transcripción, NF-AT, Oct/OAP y NF- κ B, con estímulos oscilantes de calcio, demostrando que las oscilaciones de calcio con distintas frecuencias determinan la activación de todos o sólo uno de ellos. En otro estudio, Gu [23] pudo demostrar que flujos de calcio pueden inducir la diferenciación de neuronas a fenotipos específicos, y que dicha diferenciación puede inducirse o evitarse con estímulos externos. En dichos estudios, debido a la metodología, sólo se muestran resultados para la respuesta de alrededor de 20 células para un par de condiciones experimentales, lo cual complica su aplicación en estudios poblacionales.

1.1.6 Heterogeneidad celular – análisis de células individuales

Todo lo mencionado anteriormente trata de cómo una célula puede generar una respuesta a partir de un estímulo proveniente de su medio exterior, y de cómo esta respuesta es determinada por las propiedades intrínsecas de la célula. Intuitivamente, cuando se piensa en dos células del mismo tipo respondiendo a un mismo estímulo, se puede suponer que la respuesta de ambas será idéntica. Sin embargo, esto no es del todo cierto. Dos células podrían tener una respuesta similar, menor, mayor o nula al mismo estímulo, pero muy difícilmente idéntica. Esto es debido a que entre las células de un mismo tipo existe heterogeneidad celular [19], [24]–[26]. Esta heterogeneidad es la diferencia de respuesta ante un mismo estímulo que presentan dos o más células con un mismo genotipo [24], [27].

Un ejemplo de lo anterior se muestra en la **Figura 1.8**; donde la concentración de la proteína p53, que está directamente relacionada con acumulación de daño en el ADN, es medida a través de marcadores fluorescentes en dos condiciones distintas, una en la que se indujo un daño al ADN de una población de células y otra en la que las células se mantienen en condiciones basales [24], [28]. Según la dinámica poblacional, cuando existe un daño en la célula,

es claramente observable que la vía de señalización de p53 genera oscilaciones en la concentración de esta molécula, mientras que en condiciones basales las células se mantienen con una baja presencia de p53. Sin embargo, si observamos la dinámica de células individuales cuando existe un daño, las oscilaciones en la concentración de p53 en el tiempo no tienen la misma frecuencia para todas las células. Por otro lado, en condiciones basales pueden observarse algunas células mostrando pulsos de p53 en distintos momentos del experimento, lo que significa que dichas células tuvieron un error de replicación en algún punto y activaron la maquinaria para repararlo.

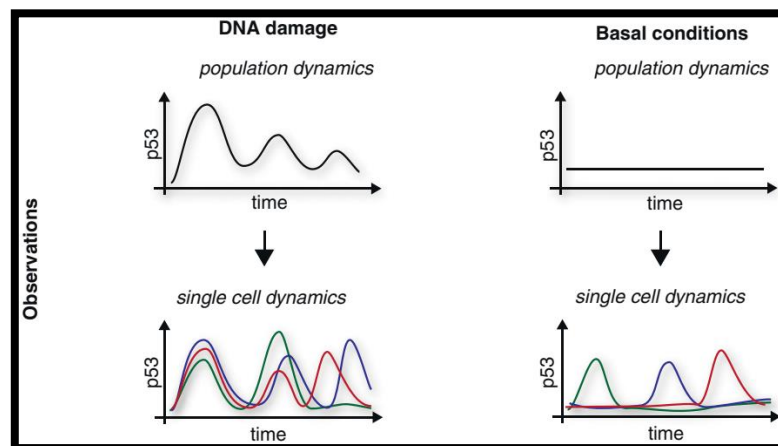


Fig. 1.8 Ejemplo de una respuesta dinámica y heterogénea en células individuales, comparada contra la respuesta poblacional, en presencia y ausencia de estímulo. Tomada de [24]

Cuando se hacen estudios poblacionales, las respuestas individuales se ven enmascaradas por la respuesta promedio de la población celular, por lo que la respuesta obtenida no debe ser tomada como una representación de la respuesta celular individual [26]. Por otra parte, el análisis de células únicas nos permite obtener información importante sobre la heterogeneidad en un sistema o población celular, donde podemos obtener información sobre la identidad de la señal química de cada célula a través de su frecuencia, amplitud y duración [19], lo que abre la posibilidad a explorar nuevas vías de

señalización aún desconocidas, o agregar componentes desconocidos a la vía ya estudiadas.

Una desventaja de los métodos actuales de la biología tradicional es que para muchos estudios de señalización celular, no es factible realizar análisis de células únicas, debido al tamaño de las células y la falta de métodos para aislar y analizar eficientemente un número alto de ellas [22], [23]. Una de las ventajas de la microfluídica es que gracias a los métodos de fabricación y el tamaño de las estructuras en las cuales se trabaja, es posible implementar distintos métodos de captura de células individuales que permiten el análisis de cientos de células en paralelo [29], [30]. Por esta y otras razones explicadas más adelante, la microfluídica es una herramienta muy útil en estudios de señalización celular [31]–[34].

En la última década se han comenzado a utilizar técnicas de microfluídica para hacer estudios dinámicos de señalización celular de manera más eficiente, los cuales permiten generar señales químicas dinámicas [35], [36], además de formas de onda más sofisticadas que permiten modificar la concentración y forma de onda a demanda [35], [36], [45], [37]–[44]. Estos sistemas se han utilizado para estudiar distintos sistemas biológicos, como islotes de Langerhans [41], [46], [47], tejido embrionario [48] y distintas poblaciones celulares, utilizando diferentes tipos de células, como levaduras [49] o células de mamíferos [43], [50]–[53].

Por las ventajas que muestra la microfluídica, incluida la posibilidad de desarrollar sistemas para análisis en células únicas, en este trabajo se emplea como la tecnología base para el desarrollo de nuestros estudios. En la siguiente sección se introduce la microfluídica como disciplina y se mencionan algunas técnicas de esta que se utilizaron en el diseño del dispositivo desarrollado para este trabajo.

1.1.7 Microfluídica

Según la fuente que se revise, la microfluídica puede verse como una ciencia, una tecnología, una disciplina o un campo de estudio [54]. La microfluídica estudia el comportamiento de fluidos confinados en estructuras cuyas dimensiones pueden rondar desde micras a milímetros y donde por lo menos una de sus dimensiones es menor a 1 mm. A esta escala, los fluidos tienen volúmenes en el rango de femto a microlitros (10^{-15} a 10^{-6} L) y su comportamiento dentro de tales estructuras difiere a su contraparte macroscópica debido a que las fuerzas viscosas y capilares dominan. La fabricación de dispositivos (o chips) microfluídicos y métodos para el control de estos fluidos es considerado también dominio de la microfluídica.

La física de los fluidos que se desplazan a través de microcanales está ya bien desarrollada [54], [55]. Las diferencias en el comportamiento físico de los fluidos en los microcanales pueden ser aprovechadas al realizar estudios biológicos, produciendo algunas ventajas cuando se comparan con métodos convencionales. Las ventajas más importantes de la microfluídica son: (1) el flujo es laminar, lo que permite determinar su comportamiento dentro de ellos y realizar modelos predictivos antes de su implementación experimental; (2) como los canales tienen dimensiones cercanas al tamaño de las células, es posible manipular células individuales y realizar estudios directamente en ellas; (3) los métodos de fabricación (v.g. litografía suave) permiten la implementación de microválvulas para lograr un control preciso de los fluidos dentro de los dispositivos; (4) debido a estos tres puntos, es posible integrar diferentes módulos en un dispositivo para generar dispositivos integrados, llamados Lab-on-a-chip, donde todos los pasos para un análisis se hacen dentro del mismo dispositivo. Más aún, (5) el tamaño de los dispositivos ayuda a reducir la cantidad de muestra utilizada en los ensayos biológicos y reducir su tiempo, debido a un incremento en la relación superficie-volumen (mejorando el transporte de masa). (6) Gracias a su miniaturización, es posible tener copias del mismo módulo para realizar múltiples ensayos de forma paralela. (7) Por último, el tamaño de los dispositivos ha permitido llevar esta

tecnología a aplicaciones portables, que permiten análisis de bajo costo y rápidos en zonas de escasos recursos.

La microfluídica es muy versátil: dependiendo de la aplicación a la que se esté enfocado, las técnicas de fabricación, de análisis y la integración de otras tecnologías pueden variar. Ejemplos de esto son diversos trabajos reportados para estudios de señalización celular en poblaciones celulares o en células únicas [29]–[31], otros para realizar inmunoensayos para detectar múltiples analitos [56], dispositivos para replicar el funcionamiento de órganos en un chip [57], así como otros donde utilizan diversas técnicas para separar partículas por su tamaño [58].

Para este trabajo se utilizaron técnicas de la microfluídica ya reportadas anteriormente, adaptadas para nuestros fines específicos. Estas técnicas se mencionan en las siguientes secciones.

1.1.7.1 Generador de gradientes de concentración lineal

En este trabajo se tiene el interés de estimular distintos grupos de células con señales dinámicas en tiempo y amplitud (concentración). Para esto, es necesario un método que permita controlar las soluciones dentro de los dispositivos microfluídicos de manera eficiente. En la microfluídica, un problema muy común es la dificultad para mezclar soluciones debido al régimen de flujo laminar. En los microcanales, la mezcla de soluciones está limitada a la difusión [54], [55], resultando en un proceso lento y difícil de controlar.

Para superar este problema, Dertinger [59] desarrollo sistemas microfluídicos llamados *Generadores de Gradientes de Concentración* (GGC, **Figura 1.12**)[59]. Estos sistemas constan de dos o más entradas donde se inyectan las soluciones que se quieren mezclar; dichas soluciones son forzadas a viajar en pares por canales delgados y largos, donde las soluciones se mezclan por difusión. Estos canales se fabrican con una longitud específica para dar

tiempo suficiente a que las soluciones en contacto puedan mezclarse por completo. Cuando las soluciones son mezcladas, generan una nueva solución donde la concentración de las moléculas es una mezcla 1:1 de las dos inyectadas. De esta forma, una red de microcanales se va expandiendo a partir de las soluciones inyectadas inicialmente, generando un alto número de concentraciones distintas.



Figura 1.12 Esquemático de un generador de gradientes de concentración. Dos soluciones son inyectadas en las entradas superiores, para después desembocar en un canal común y ser divididas en tres nuevos canales, siendo mezcladas en el canal central. Este proceso se repite hasta tener el número deseado de soluciones. Tomado de [60].

Campbell [61] reportó un GGC que funciona bajo el mismo principio de mezclado de soluciones viajando sobre un mismo microcanal, pero con una mayor eficiencia que el reportado por Dertinger [59]. Tomando algunas consideraciones geométricas en la red de microcanales para controlar su resistencia hidráulica, logró obtener un mayor número de soluciones en un menor número de pasos de mezclado. En la **Figura 1. 13** se muestra su diseño y principio de funcionamiento. Cada canal tiene una resistencia distinta para controlar la aportación de volumen que tendrá en la mezcla del siguiente canal.

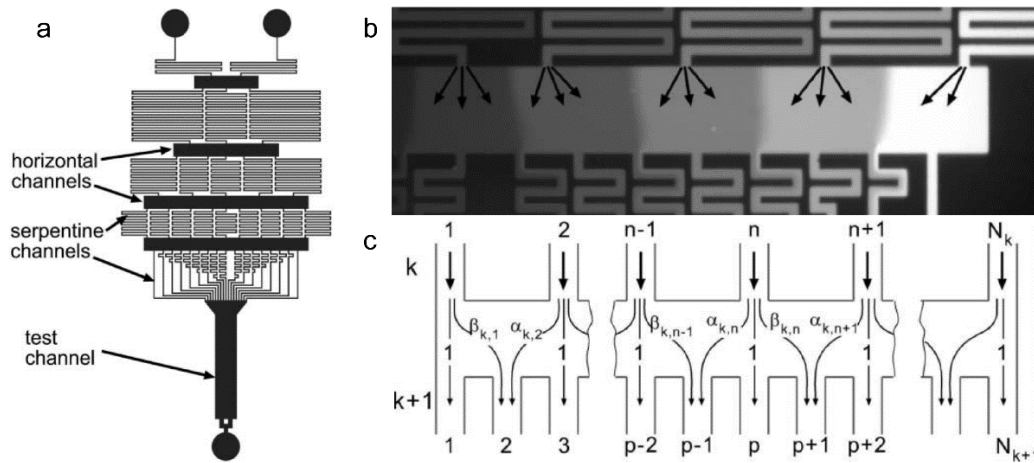


Fig. 1.13 Diseño del GGC lineal de Campbell con 17 salidas. **(a)** Diagrama del diseño. **(b)** Imagen donde se muestra la división de flujo con una solución de FITC, así como el diagrama que lo representa **(c)**. Tomadas de [61].

Estos dispositivos ofrecen la capacidad de mezclar soluciones de manera controlada. El empleo de un GGC en nuestro dispositivo brinda la posibilidad de simplificar la metodología empleada al realizar los experimentos, además de disminuir el error humano al preparar las distintas soluciones estímulo. Por estas razones, se incorporará un módulo GGC como el reportado por Campbell a nuestro dispositivo microfluídico. Los cálculos realizados para su diseño se describen en la sección de métodos.

1.1.7.2 Micropozos para captura de células individuales

La siguiente característica deseada para nuestro dispositivo es la capacidad de atrapar células individuales de manera eficiente y ordenada. Existen diferentes maneras de atrapar células individuales en dispositivos microfluídicos. Algunos métodos dependen de fuerzas activas externas para mantener a las células en una posición fija, como las pinzas ópticas [62], fuerzas acústicas [63] o fuerzas magnéticas a través de partículas magnéticas que se adhieren a las células [64]. Sin embargo, estos métodos requieren de componentes externos y montajes complejos, por lo que no se toman en cuenta para este trabajo.

Los métodos pasivos más utilizados para capturar células individuales son las trampas hidrodinámicas (**Figura 1.14a**) [65], en las cuales las células fluyen por un canal hasta que se encuentran con una restricción física que las obliga a quedarse en ese lugar. Otro método es la inmovilización de las células a través de la adhesión al sustrato usando moléculas como poly-L-lisina (**Figura 1.14c**) [66]. Existen otros métodos, como la generación de microgotas (**Figura 1.14b**) [67], donde las células son confinadas a una gota con un volumen fijo, aislada del medio externo.

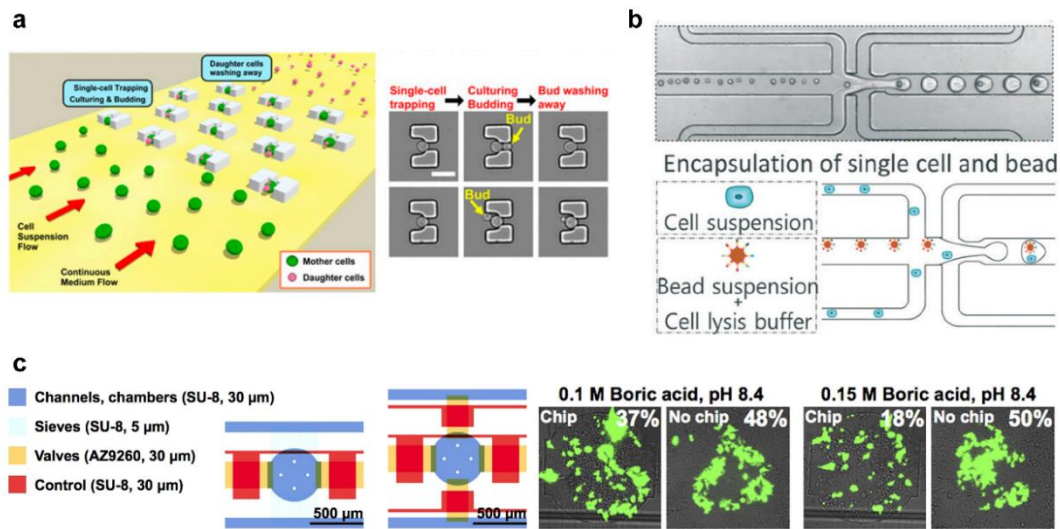


Fig. 1.14 Métodos para captura de células individuales. **(a)** Captura hidrodinámica de células de levadura en trampas individuales. **(b)** Captura de células individuales en microgotas. **(c)** Captura de monocapas de células por adhesión a la superficie en microcámaras. Tomadas de [65]–[67].

Las trampas hidrodinámicas tienen la desventaja de que necesitan que exista un flujo continuo en una dirección específica para que se mantengan atrapadas las células. Por otro lado, la inmovilización de células por adhesión al sustrato no permite atrapar las células de una manera controlada, por lo que podría existir comunicación célula-célula que puede interferir en la respuesta celular. Además, estos dos tipos de captura de células no protegen a las células del estrés de corte generado por el flujo en los microcanales.

El uso de micropozos para capturar células individuales [29], [68] ofrece ciertas ventajas sobre los otros métodos, **Figura 1.15**. Este método hace uso de pozos de un tamaño ligeramente mayor al de las células para atrapar células individuales de manera eficiente. Para la captura de células individuales, las células son transportadas con un flujo sobre un arreglo de micropozos, cayendo dentro de ellos por efecto de la gravedad. El acomodo y número de los micropozos se determina durante la realización del diseño del dispositivo microfluídico, lo que permite controlar el número de células a atrapar.

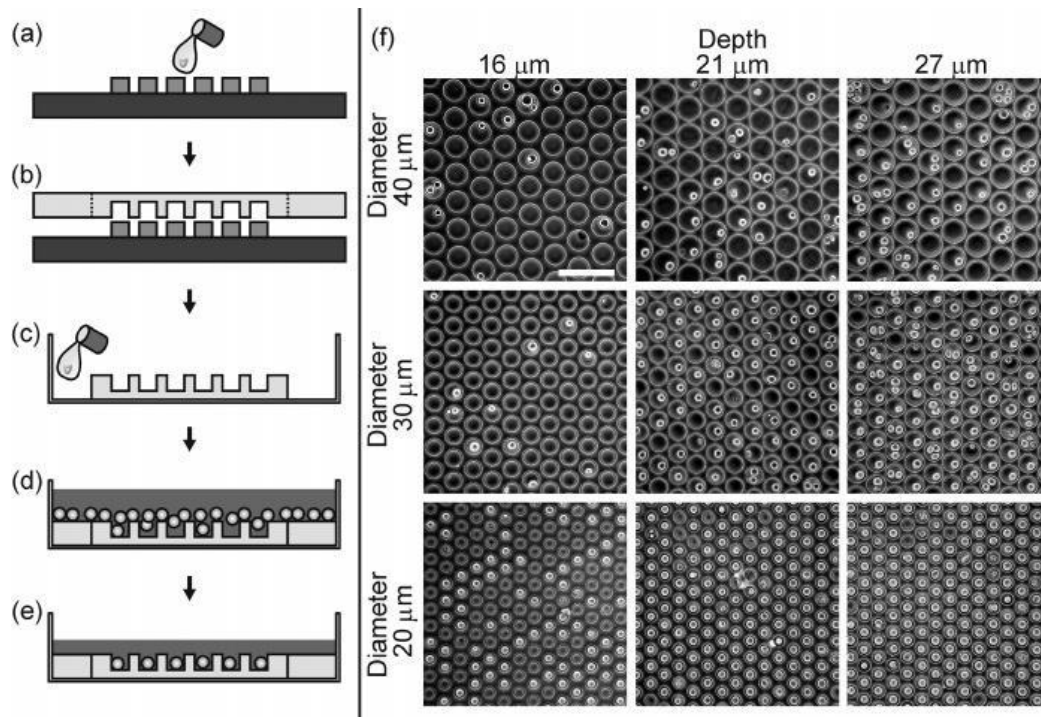


Fig. 1.15 Principio de funcionamiento de los micropozos y captura de células en arreglos con micropozos de distintos diámetros. Tomada de [68].

En nuestra opinión, el empleo de micropozos es la mejor opción para la captura de células individuales debido a que mantiene a las células confinadas en pequeños compartimentos con posición determinada, evitando el contacto entre ellas, mientras las protege de un alto estrés de corte. Por las ventajas que ofrece este método, es el que se incorporará a nuestro dispositivo microfluídico.

1.1.7.3 Estrés de corte

Por definición, el estrés de corte es el esfuerzo mecánico que se genera cuando se aplica una fuerza tangencial a una superficie [69], ejemplificado en la **Figura 1.16**. De manera práctica, en nuestros microcanales, el estrés de corte es la fuerza que se aplica sobre la superficie de las células debido al flujo y es directamente proporcional a la velocidad del fluido [70]. En el organismo, muchas células no se ven expuestas a niveles significativos de estrés de corte, pero existen otras que están sometidas a un estrés de corte todo el tiempo, como las células sanguíneas.

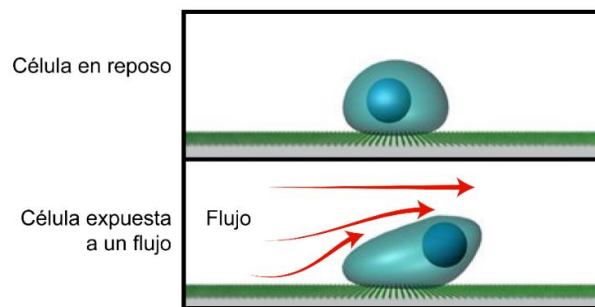


Fig. 1.16 Esquema de el efecto del flujo sobre las células, llamado estrés de corte.

El someter células a diferentes niveles de estrés de corte puede generar diversas respuestas celulares. Por ejemplo, el estrés de corte generado en los túbulos renales ayuda a la diferenciación y polarización de las dichas células [71]. Por otro lado, se ha demostrado también que en algunos tipos celulares un alto estrés de corte puede inducir la activación de factores de transcripción, como la proteína c-fos [72]. Debido a dichos efectos, lo que se busca en un dispositivo microfluídico es no generar una respuesta celular debida al flujo sobre ellas. Se busca que el dispositivo sirva como una plataforma donde las células se mantengan protegidas de estímulos indeseados, minimizando el estrés de corte al que son expuestas las células o tejidos.

Debido al daño que puede sufrir una célula dentro de un microcanal, es necesario asegurarse de que el estrés de corte al cuál serán sometido sea lo más bajo posible. No existen métodos experimentales para medir el estrés de

corte, por lo que se emplean métodos de simulación de elemento finito para este fin. Por lo tanto, para este trabajo se realizarán simulaciones de estrés de corte en COMSOL Multiphysics para determinar el estrés de corte generado dentro de nuestro dispositivo a las células atrapadas en los micropozos, descritas en la sección de métodos y resultados.

1.1.8 Problemática en los análisis de señalización celular actuales

En las secciones anteriores se ha hablado de la importancia de la señalización celular y su estudio como un proceso dinámico, en lugar de estático. Como bien se mencionó, existen pocos trabajos en los que se hacen este tipo de estudios con técnicas convencionales [22], [23], debido a las limitaciones de tamaño y número de células que se pueden analizar por experimento. Con la popularización de la microfluídica ha sido posible realizar este tipo de experimentos de manera más controlada y con un mayor número de células analizadas por experimento [29]–[34].

Estos dispositivos microfluídicos están diseñados para realizar experimentos de señalización celular, pero no todos ellos para estudiar señalización de manera dinámica. Para poder realizar estudios confiables de señalización celular dinámica, es necesario que exista un método que nos permita controlar múltiples variables dentro de nuestro sistema. Estas variables incluyen un método eficiente para: (1) capturar por lo menos cientos de células, (2) estimular fácilmente a las células atrapadas y en distintas condiciones, (3) estimular a las células con señales periódicas donde la frecuencia de estímulo sea lo suficientemente rápida para cubrir un amplio rango de vías de señalización, y (4) no dañar a las células mientras están sometidas a dichas condiciones. Desde nuestra perspectiva, no hay métodos convencionales (en placas de cultivo, cámara de perfusión, y demás) que nos permitan realizar

estudios con estas características, por lo que se propone que la solución debe ser planteada a través de técnicas de microfluídica.

En 2017 Kniss-James [31] reportó un dispositivo microfluídico para estudios dinámicos calcio intracelular en células T (Jurkat), mostrado en la **Figura 1.17a**. El dispositivo microfluídico está conformado por dos capas, donde la inferior consta de un canal con 1000 trampas hidrodinámicas para atrapar células individuales. La capa superior es un canal ancho a través del cual se generan pulsos de estímulo y buffer, alternadamente, con una frecuencia máxima de estímulo de 16.7 mHz. Entre las capas hay una membrana delgada con agujeros que permite que el estímulo llegue a las células. Las células T son atrapadas y estimuladas con H_2O_2 , que es un segundo mensajero que está involucrado en vías de señalización en las que el Ca^{2+} juega un papel importante [73]. Las células fueron estimuladas con pulsos a 2.78 mHz en tres condiciones, la primera fue con pulsos alternados entre H_2O_2 y medio de cultivo; la segunda fue con pulsos alternados de medio de cultivo (control negativo); y la tercera con pulsos alternados de H_2O_2 como control positivo. Los resultados (**Figura 1.17b**) mostraron que las células estimuladas con pulsos alternados de H_2O_2 y medio de cultivo, responden con oscilaciones de calcio a la misma frecuencia, mientras que en los controles la frecuencia de oscilación de calcio se ve reducida. Estos resultados podrían indicar que hay una relación entre la dinámica de ambos segundos mensajeros cuando la vía de H_2O_2 es activada.

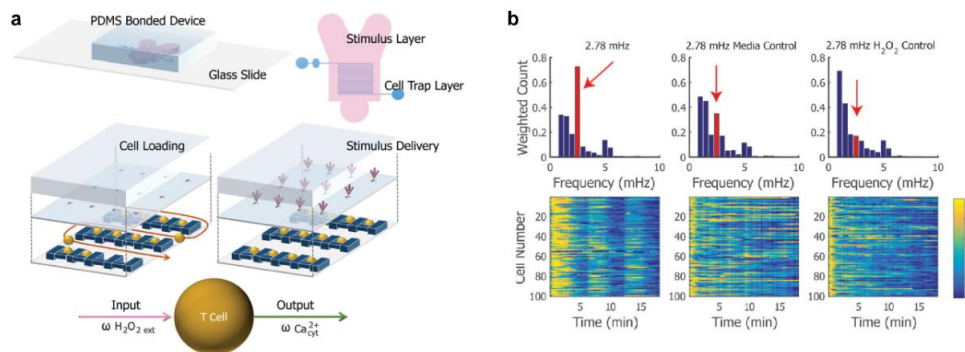


Fig. 1.17 Dispositivo reportado por Kniss-James para estudios dinámicos de señalización de calcio intracelular en células T bajo estímulos de H_2O_2 . Tomada de [31].

Por otra parte, Piehler [32] reportó un dispositivo microfluídico para analizar la respuesta de un mismo grupo de células adherentes bajo estímulos cambiantes en concentración y frecuencia. Su dispositivo (**Figura 1.18a**) tienen un canal ancho funcionalizado con poli-L-lisina en el cual se adhieren células 3T3 (línea celular de fibroblastos de ratón). Cuenta con ocho entradas distintas donde se conectan soluciones del mismo estímulo a distintas concentraciones. Utilizando microválvulas, inyectan dos o más soluciones simultáneamente para generar señales pulsadas con distintas formas (sinusoidales, diente de sierra, cuadradas, entre otras). Estas señales químicas llegan a las células y se mide su respuesta temporal. Las células 3T3 se estimularon con una señal sinusoidal con periodo de 100 min de factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), que se sabe que genera oscilaciones del factor nuclear κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) con periodo de 90 min. Sus resultados (**Fig. 1.18b**) mostraron una respuesta heterogénea en las células. Se observa que las células responden al estímulo, pero no con la frecuencia reportada previamente.

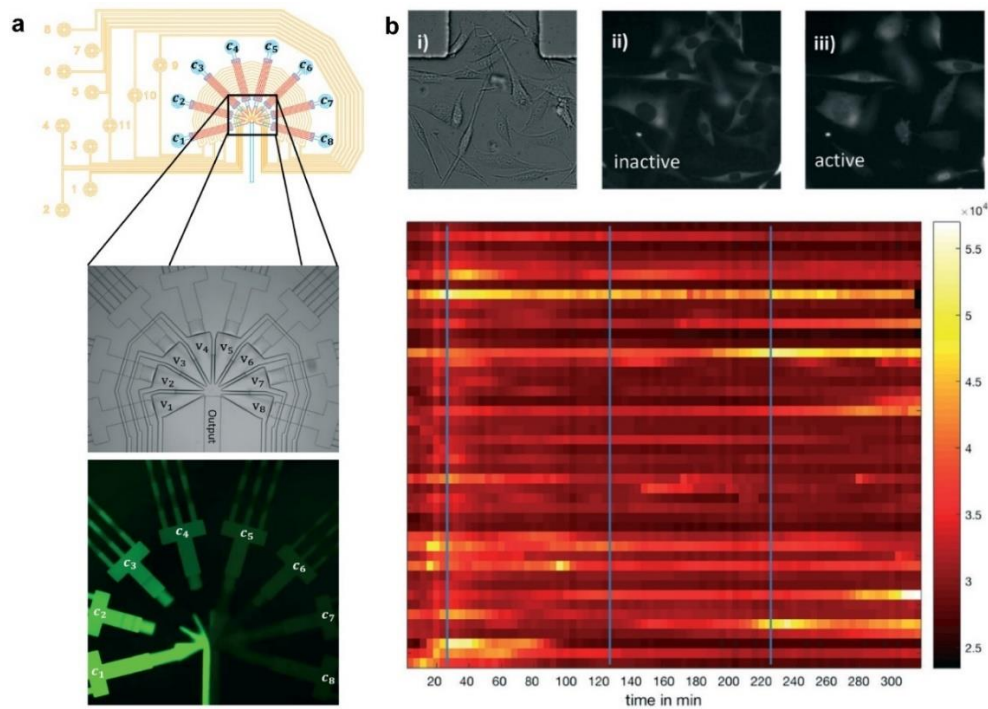


Fig. 1.18 Dispositivo reportado por Piehler para estimulación dinámica de células adherentes bajo señales químicas con distintas formas. Tomada de [32].

Además de los trabajos mencionados, existen algunos otros que presentan métodos distintos para el análisis de células únicas, resumidos en la **Tabla 1.1**, donde se comparan sus características principales. Los trabajos mencionados son los más relevantes para estudios dinámicos de señalización celular en dispositivos microfluídicos hasta el momento de la escritura de este trabajo.

Todos los dispositivos mencionados presentan alguna ventaja contra los demás. Algunos tienen la capacidad de analizar miles de células simultáneamente, mientras que otros permiten una estimulación química más rápida, entre 100 y 500 mHz. La mayoría de los dispositivos no reportan el estrés de corte al cual están sometidas las células al ser estudiadas, que es un factor importante especialmente en los métodos con captura hidrodinámica de células y adhesión, ya que las células están expuestas directamente al flujo.

Solamente en uno de los trabajos se consideran todas las variables mencionadas en la tabla, mientras que los demás se enfocan en mejorar una de estas variables. Esta falta de un método de análisis en el que se consideren todas las variables para analizar cualquier tipo de células bajo cualquier estímulo abre una oportunidad a explorar mecanismos celulares en los que la dinámica de estudios estáticos es bien conocida, y encontrar posibles variaciones bajo estimulación dinámica en distintas vías de señalización.

Por lo anterior, se propone el desarrollo de una plataforma microfluídica en la cual se puedan realizar estudios de señalización celular dinámica considerando un alto número de células, un bajo estrés de corte, una frecuencia de estimulación en el orden de segundos, y la posibilidad de estimular a células de un mismo cultivo con diferentes condiciones, para comparar su respuesta directamente contra la de la población. Los resultados de este dispositivo se presentan en el **Capítulo 4.1**.

El desarrollo de esta plataforma, su caracterización y su empleo para el análisis de una vía de señalización ya estudiada anteriormente, nos permitirá definir un punto de partida claro para realizar los subsecuentes estudios del proceso de NETosis.

Tabla 1.1 Comparación de dispositivos microfluídicos reportados para estudios de señalización celular dinámica.

Año	Ref.	Tipo celular	Estudio	Método de captura	No. total de células por chip	Pulsos	Frec. Max [mHz]	Estrés de corte [dyn/cm ²]	Estimulación paralela	Canales independientes
2010	[74]	HEK-293	Dinámica de Ca ²⁺	Trampas hidrodinámicas y adhesión celular	≈35	✓	≈333	NR	✗	N/A
2013	[75]	HEK-293	Dinámica de Ca ²⁺	Trampas hidrodinámicas	≈100	✓	≈333	NR	✗	N/A
2014	[33]	Jurkat	Dinámica de Ca ²⁺	Microporos y cámaras	1,000	✓	250	<10	✗	N/A
2015	[34]	Jurkat	Dinámica de H ₂ O ₂ y Ca ²⁺	Trampas hidrodinámicas	≈4,000 (50 células analizadas)	✓	10	0.3 - 2	✓	3
2016	[76]	RAW 264.7	Secreción de citocinas	Trampas hidrodinámicas	40	✓	100	NR	✓	40
2017	[31]	Jurkat	Dinámica de H ₂ O ₂ y Ca ²⁺	Trampas hidrodinámicas	1,000 (≈600 analizadas)	✓	16.7	<10	✗	N/A
2017	[32]	3T3	Actividad de NF-κB	Adhesión celular	No mencionado (50 analizadas)	✓	100	Bajo (NR)	✗	N/A
2017	[77]	RAW 264.7	Actividad de NF-κB y secreción de citosinas	Trampas hidrodinámicas	De 16 a ≈600	✓	100	NR	✓	16
2017	[45]	3T3	Dinámica de Ca ²⁺	Adhesión celular	No mencionado	✓	50	NR	✗	N/A
2018	[78]	HMVEC-d, HeLa, U-251	Dinámica de Ca ²⁺	Adhesión celular	>200 (50 analizadas)	✓	500	NR	✗	N/A

NR = No reportado, N/A = No aplica.

1.2 NETosis

En esta segunda parte se habla del proceso de NETosis como un mecanismo de señalización celular en el que están involucradas diversas vías de señalización, conocidas y desconocidas. Se menciona la importancia del mecanismo por su papel en distintos procesos celulares y algunas patologías. Por último, se mencionan los escasos estudios realizados hasta el momento sobre la dinámica temporal de este proceso y la propuesta de estudio de este trabajo.

1.2.1 Neutrófilos y Trampas Extracelulares de Neutrófilos

Los neutrófilos son el tipo más abundante de leucocitos (entre el 40% y el 70% del total de células blancas) [79], [80]. Pertenecen a la familia de leucocitos polimorfonucleares (o granulocitos) [81], que son células derivadas de las células hematopoyéticas. Los neutrófilos se diferencian en la médula espinal a partir de mieloblastos, en un proceso que dura de 7 a 10 días [82], durante el cual se desarrolla su característico núcleo lobulado, con tres a cinco lóbulos, y gránulos lúlicos [83]. Los neutrófilos maduros pasan a la circulación sanguínea, donde tienen una esperanza de vida de entre 6 a 8 horas [84]. Al migrar a un tejido, los neutrófilos pueden sobrevivir hasta por 7 días [85].

Los neutrófilos son considerados la primer línea de defensa del sistema inmune ya que son las primeras células en llegar a un sitio de infección [84]. En ese lugar, se encargan de eliminar patógenos a través de distintos mecanismos: fagocitosis, producción de citosinas, degranulación y el mecanismo más recientemente descubierto, producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés) [86], [87].

El proceso de formación de NETs, llamado NETosis, fue observado por primera vez en 1996 por Takei [86], y descrito en 2004 por Brinkmann [87]. La NETosis es un proceso en el cual los neutrófilos liberan su cromatina mezclada

con enzimas de los gránulos al medio extracelular conformando una “red” para atrapar y eliminar bacterias. Durante el proceso, distintas moléculas contenidas en los gránulos que tienen propiedades bactericidas se adhieren a las fibras de ADN, además de las histonas, como la elastasa, mieloperoxidasa, catepsina G, entre otras [84], [87]. Las NETs formadas pueden atrapar bacterias a través de las fibras de ADN y matarlas a través de las proteínas adheridas a dichas fibras o permitiendo que sean fagocitadas por otras células. Como resultado del proceso de NETosis la célula muere, por lo que este mecanismo se considera como un nuevo tipo de muerte celular [88]. En la **Figura 1.19** se muestra un esquemático del proceso de NETosis.

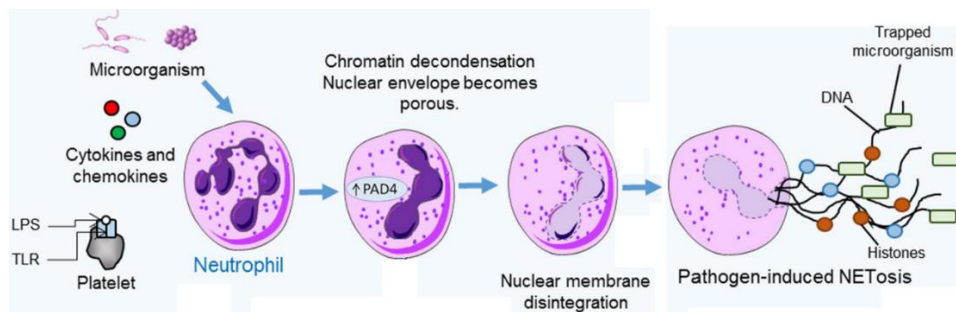


Fig. 1.19 Esquemático del proceso de NETosis. Tomada de [89].

Desde el descubrimiento del proceso de NETosis se han realizado diversos estudios, mencionados más adelante, donde se han encontrado implicaciones de este proceso en diferentes patologías. La presencia de NETs en enfermedades respiratorias contribuye a incrementar la viscosidad del esputo, ayudando a combatir infecciones [90]. En contraste, en la fibrosis quística tiene efectos negativos, como la disminución de la función pulmonar debido al bloqueo de las vías aéreas por la presencia de NETs [91]. En la trombosis, las NETs inducen la formación de trombos, coagulación y activación de plaquetas [92]. Además de las mencionadas, se ha reportado implicación de las NETs en otras patologías, como lupus eritematoso sistémico [93], sepsis [94], artritis reumatoide [95], entre otras [90], [96].

La presencia de NETs en tan diversas patologías ha provocado el interés por elucidar los mecanismos celulares asociados a dicho proceso [83], [90], [97].

En esta carrera por encontrar las vías de señalización involucradas en la formación de NETs, se han encontrado tres distintos tipos de NETosis: NETosis suicida, NETosis vital y NETosis vital dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) [84].

1.2.1.1 NETosis suicida

Este tipo de NETosis es el más estudiado y es el que describió Brinkmann en 2004 [87]. Aunque no se conoce por completo el mecanismo de este tipo de NETosis, se conocen las vías de señalización principales involucradas en el proceso, mostradas en la **Figura 1.20**. Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en este proceso. Cuando las células reconocen el estímulo, se activa la oxidasa NADPH (NOX) a través de la proteína cinasa C (PKC), que genera especies reactivas de oxígeno, resultando en la activación de la proteína arginina deiminasa 4 (PAD4), una enzima nuclear. PAD4 promueve la citrulinación de las histonas (que mantienen compactado al ADN) provocando la decondensación de la cromatina. Al mismo tiempo, la elastasa y la mieloperoxidasa son liberadas de algunos gránulos y translocados al núcleo, donde ayudan a la decondensación de la cromatina. La membrana nuclear termina por romperse y la cromatina se libera al citosol de la célula, donde se mezcla con otras proteínas de los gránulos y del citosol. Después de este punto, la membrana plasmática se rompe y la cromatina se libera hacia el medio extracelular [84], [98].

Algunos de los inductores conocidos que conllevan a NETosis suicida son el forbol miristato acetato (PMA), autoanticuerpos y cristales de colesterol, también algunos microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli*, y algunos virus, como VIH e influenza [84]. Este proceso dura de entre 2 a 4 horas.

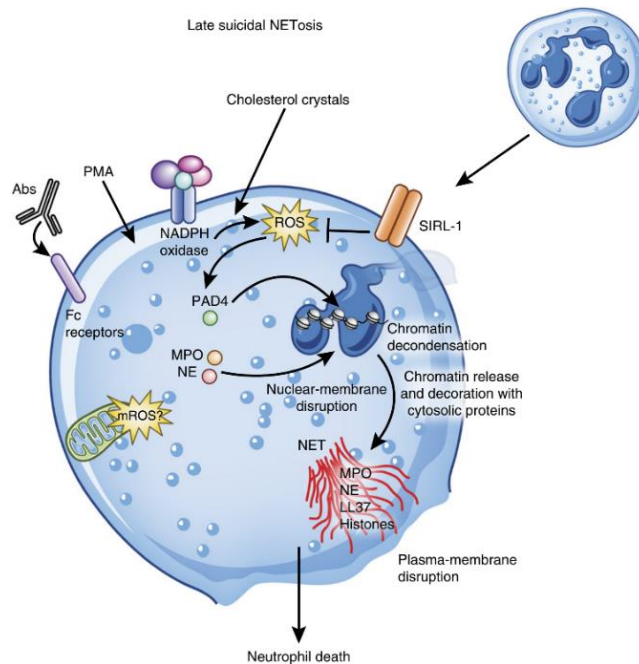


Fig. 1.20 Proceso de NETosis suicida. Tomada de [98].

1.2.1.2 NETosis vital

Aunque tampoco se conoce la vía exacta de señalización, se sabe que están involucrados los receptores tipo toll (TLR), que son moléculas importantes en el reconocimiento de patógenos. Este mecanismo no depende de ROS, aunque sí se activa la enzima PAD4, induciendo decondensación de la cromatina. La elastasa de neutrófilos transloca al núcleo y ayuda con la decondensación y el rompimiento de la membrana plasmática. A diferencia de la NETosis suicida, en la NETosis vital el ADN es expulsado a través de vesículas al medio extracelular. Como la célula no muere, conserva su capacidad para fagocitar o llevar a cabo funciones de quimiotaxis, además su esperanza de vida no se ve modificada por la pérdida del material genético [84], [98]. El mecanismo de NETosis vital se muestra en la **Figura 1.21**.

Los inductores conocidos de este tipo de NETosis incluyen algunos microorganismos como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* [84]. Este proceso normalmente se da entre 5 y 60 min después de la activación del neutrófilo.

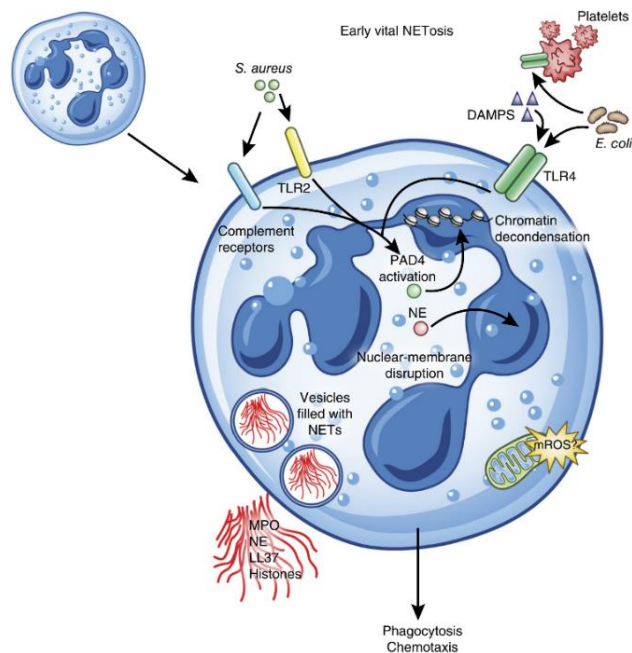


Fig. 1.21 Proceso de NETosis vital. Tomada de [98].

1.2.1.3 NETosis vital dependiente de ROS

Este tipo de NETosis no está bien estudiado. Este proceso es dependiente de ROS y se libera ADN mitocondrial en lugar de nuclear. Es un proceso rápido, ~15 min, y es inducido por lipopolisacáridos (LPS) o la molécula C5a [99].

1.2.2 Estudios de NETosis

Los procesos de NETosis son mecanismos con muchas incógnitas aún por resolver. Aunque se conocen aspectos básicos sobre la inducción, proceso y terminación de la vía de señalización, aún se debe esclarecer a mayor detalle el papel de todas las moléculas involucradas en la NETosis para poder comprender mejor como es que este mecanismo está involucrado en tantos procesos biológicos tan diversos [98], [100].

Hay diversos estudios que han logrado esclarecer partes importantes del mecanismo de NETosis. Pieterse [101] demostró que los neutrófilos pueden

diferenciar entre moléculas de distintas bacterias y responder sólo ante la exposición a algunas de ellas, analizando células individuales a través de adhesión a placas de cultivo. La **Figura 1.22** muestran los resultados mencionados. En esta figura puede observarse los núcleos de los neutrófilos después de ser estimulados con lipopolisacárido (LPS) de distintas bacterias, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como con LPS provenientes de distintos serotipos de *E. coli*: O55:B5, O127:B8, O128:B12, O111:B4, and O26:B6. De todas las pruebas realizadas, solamente el LPS de *P. aeruginosa* y *E. coli* serotipo O128:B12 indujeron la formación de NETs, mientras que los demás LPS no generaron un efecto en las células.

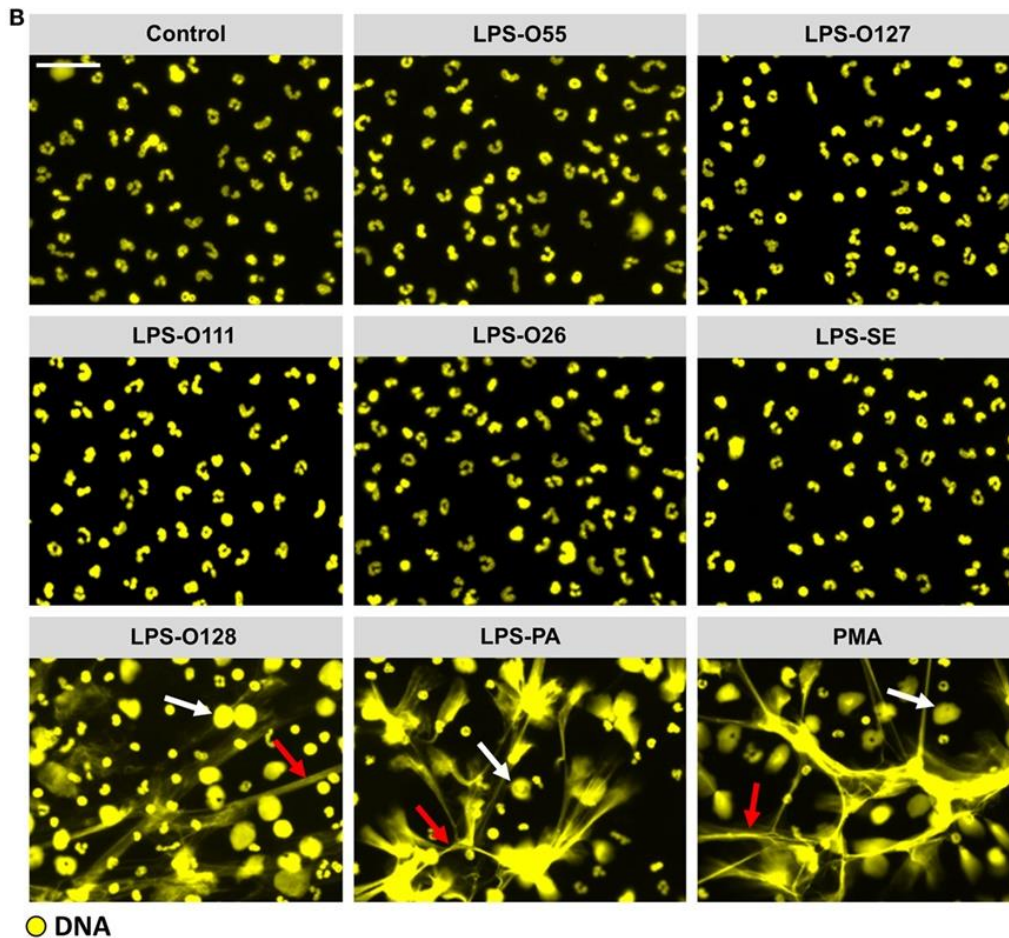


Fig. 1.22 Los neutrófilos pueden diferenciar moléculas de distintas bacterias, respondiendo selectivamente a algunas de ellas. Tomada de [101].

Por otra parte, Kenny [102] reportó un trabajo en el cual se comparó sistemáticamente la respuesta de neutrófilos antes distintos estímulos que reportaban la activación de distintas vías de señalización, terminando en la formación de NETs. Los resultados obtenidos demostraron que el PMA, el ionóforo A23187, la nigericina, *C. albicans* y el estreptococo grupo B son fuertes inductores de NETosis. Estos estímulos conllevan a la formación de NETs, pero por distintas vías, todas ellas matan bacterias, son proteolíticamente activas, y estaban compuestas por ADN cromosomal. Para demostrar que cada inductor estaba generando NETs, fijaron las células en el tiempo final y marcaron las células con marcadores fluorescentes contra elastasa de neutrófilos y cromatina, **Figura 1.23**.

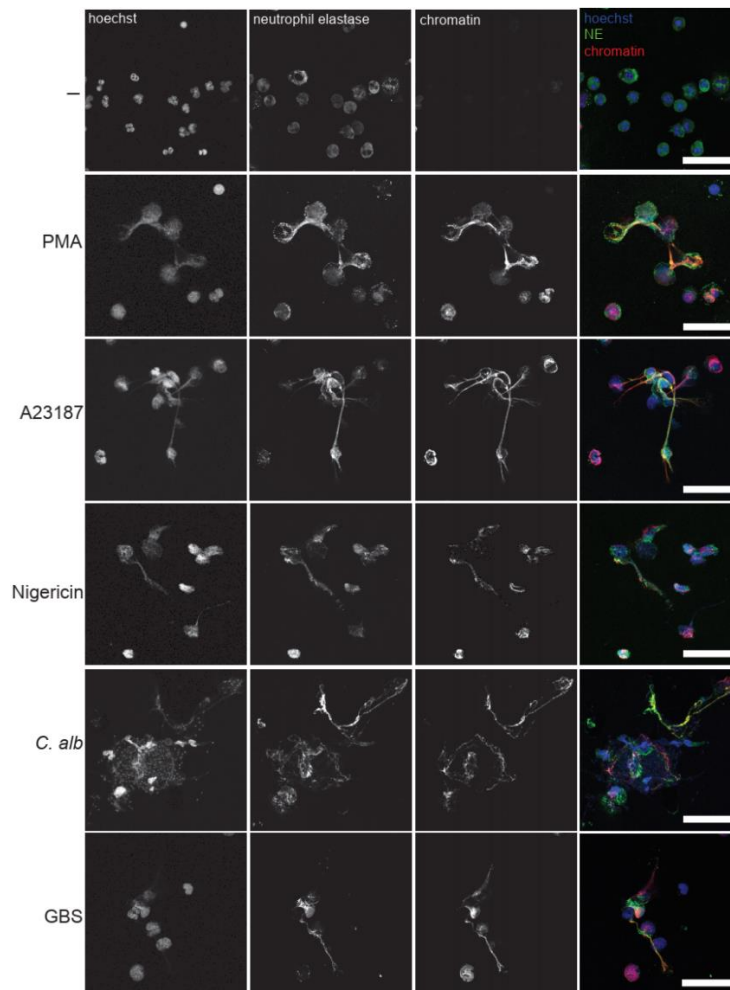


Fig. 1.23 Neutrófilos estimulados con distintos inductores, mostrando la formación de NETs con la colocalización entre la fluorescencia de la cromatina y la elastasa de neutrófilo.

1.2.3 Problemática actual en el estudio del proceso de NETosis

Los estudios mencionados son un ejemplo de los vastos trabajos realizados sobre el proceso de NETosis. Todos ellos son realizados de manera similar, donde células son adheridas a placas de cultivo, tratadas con un estímulo fijo y la respuesta de algunas células analizada en el tiempo. El análisis de los resultados se realiza a través de segmentación de imágenes, donde se busca la morfología observada previamente (**Fig. 1.22 y 1.23**) de las NETs para indicar una respuesta positiva. En algunos de estos trabajos no se esclarece la cantidad de células analizadas, ni la temporalidad de su respuesta. Estos estudios se realizan más como un todo o nada, donde al final la respuesta de las células es promediada, sin buscar más detalles sobre la dinámica temporal de cada célula. Realizar estudios temporales podría ayudarnos a entender aspectos relevantes de la vía de generación de NETs, como variaciones en la temporalidad de la respuesta de distintas células, o cambios morfológicos en la célula durante el proceso [103].

1.2.3.1 Estudios dinámicos de NETosis

El proceso de la formación de NETs ante estímulos cambiantes en el tiempo no ha sido estudiado. Las vías de señalización involucradas en los procesos de NETosis dependen de señales incrementales de segundos mensajeros, como las especies reactivas de oxígeno o el Ca^{2+} . Sin embargo, debido a la complejidad de realizar estudios dinámicos en células únicas, el análisis del proceso de NETosis se ha enfocado en el análisis de condiciones estáticas.

Al principio del capítulo se habló sobre la importancia de los estudios dinámicos para elucidar como las células procesan la información y la transforman en una respuesta celular, así como la importancia de estudiar a cada célula para tratar de encontrar las variaciones en respuesta que puede tener con otras células genéticamente iguales. En otras vías de señalización, la microfluídica ha sido una herramienta importante para este tipo de análisis, permitiendo interrogar células individuales de manera eficiente. En el caso de

estudios de NETosis, existen pocos dispositivos reportados donde se busca encontrar el papel que juega las NETs en distintas patologías, como un par de estudios para trombosis [104], [105], y uno para la medición de las especies reactivas de oxígeno involucradas en el proceso [106].

En nuestro laboratorio, Jiménez-Valdés [29] reportó un dispositivo microfluídico para analizar el proceso de NETosis en células individuales. El dispositivo cuenta con 16 cámaras independientes con 4,640 micropozos cada una. Utiliza distintas concentraciones de PMA para inducir la formación de NETs en distintos grupos de neutrófilos por cámara. Sus resultados (**Figura 1.24**) muestran que las células son capaces de generar NETs mucho antes de lo reportado para NETosis suicida, obteniendo respuesta en alrededor del 40% de células activadas a los 60 min en la cámara con mayor concentración.

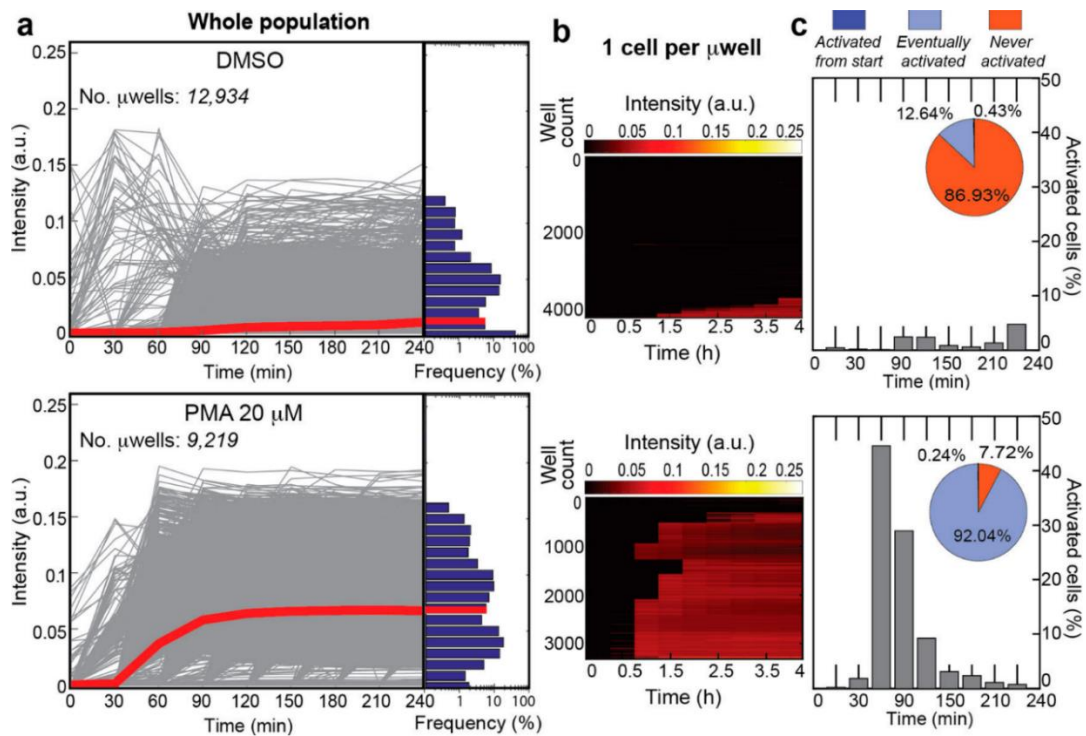


Fig. 1.24 Gráficas de los datos obtenidos por Jiménez Valdés para neutrófilos estimulados con PMA a 20 μ M comparados contra el control (no PMA). Tomada de [29].

El sistema reportado por Jiménez-Valdés se realizó como una prueba de concepto de una plataforma para el análisis del proceso de NETosis de alto rendimiento, donde miles de células pueden ser estimuladas de forma

simultánea con 16 condiciones distintas, permitiendo el análisis de la respuesta individual de cada una de ellas. Este sistema fue caracterizado por completo, abriendo la posibilidad de adaptarlo con otras técnicas de microfluídica para realizar estudios más exhaustivos sobre el proceso de NETosis.

Desde esta perspectiva, creemos que una plataforma similar a la propuesta para los estudios de señalización celular puede darnos información sobre cómo es la dinámica en la formación de NETs. Por esta razón, se propone estudiar de manera dinámica el proceso de NETosis suicida en células individuales, donde la temporalidad y la respuesta individual de cada célula pueda ser analizada. Creemos que este tipo de estudios nos dará información sobre cómo las células procesan el estímulo desde el momento de la activación, y si este mecanismo tiene la misma temporalidad para distintas células y distintas condiciones de estímulo, revelando así si existe una dependencia de la respuesta celular a la dinámica de estimulación.

En el siguiente capítulo se mencionan los métodos utilizados para el diseño, fabricación y operación de los dispositivos microfluídicos desarrollados, así como el arreglo experimental para ambos estudios. Subsecuentemente se mencionan y discuten los resultados de cada aplicación, seguido por un capítulo con las conclusiones de los resultados obtenidos. Por último, se mencionan las perspectivas que se tienen con respecto al desarrollo de todo el trabajo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar una plataforma microfluídica que nos permita analizar el proceso de NETosis suicida de manera temporal en cientos de células individuales, en un microambiente de bajo estrés de corte, ante condiciones dinámicas de estimulación.

2.2 Objetivos específicos

1. Diseñar y fabricar un dispositivo microfluídico que permita la captura de cientos de células individuales, con el suministro de un estímulo con variaciones en amplitud y duración controlados, a través de incorporar un generador de gradientes de concentración (GGC).
2. Caracterizar el funcionamiento del dispositivo utilizando moléculas fluorescentes.
3. Realizar estudios de señalización celular como prueba de concepto en la línea celular HEK-293.
4. Analizar los datos obtenidos a través de Matlab.
5. Fabricar un dispositivo microfluídico basado en el desarrollado en el objetivo 1, que permita interrogar cada cámara con una condición dinámica distinta, de manera independiente a las demás.
6. Caracterizar el funcionamiento del dispositivo.
7. Realizar estudios de NETosis en el dispositivo.
8. Realizar un nuevo programa automático para el análisis de datos, considerando las condiciones de estos experimentos.

3. MÉTODOS

En este capítulo se menciona la metodología empleada para el desarrollo de todo el trabajo descrito. Primeramente, se describen los procesos de que son comunes para ambos estudios, tanto para el de señalización de calcio, como para el dedicado al proceso de NETosis. Estos métodos incluyen la fabricación de los dispositivos microfluídicos, su prueba con colorantes vegetales, la preparación de los dispositivos previa a los experimentos, así como el método de captura de células individuales. Posteriormente, se describen por separado los métodos empleados específicamente en cada estudio; la caracterización de los dispositivos, la metodología experimental para cada estudio y el análisis de los datos.

3.1 Dispositivos microfluídicos

3.1.1 Diseño del dispositivo y fabricación de los moldes

Los dispositivos microfluídicos se diseñan utilizando el software AutoCAD (versión 2016, Autodesk Inc.). A partir de esto, se fabrican los moldes necesarios para cada dispositivo por fotolitografía. Por cada capa que tenga el dispositivo, se fabrica un molde independiente. Cada dispositivo consta de tres capas (flujo, micropozos y control), por lo que se fabricarán tres moldes por dispositivo. En este caso, los moldes son fabricados utilizando obleas de silicio como sustrato y se recubren con resinas fotosensibles (fotorresinas), positiva para el molde de flujo y negativa para control y micropozos. La altura de las capas se determinó previamente (flujo 30 μm , micropozos 20 μm y control 25 μm) y se utilizaron protocolos de recubrimiento adaptados de los sugeridos por el fabricante. Dichos protocolos fueron determinados empíricamente en el laboratorio. A continuación, se describen los protocolos de fabricación para los tres moldes, para ambos dispositivos.

Protocolo de fabricación del molde de flujo

1. Una oblea de silicio de 100 mm de diámetro (Desert Silicon Inc., Tempe, AZ, EE. UU.) se trata con plasma de oxígeno por 5 min en un sistema de plasma (Zepto, Diener Electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Alemania) para remover suciedad o moléculas depositadas en la superficie de esta.
2. Se coloca la oblea en un spin coater (SCS 6800 Spin Coater Series, Specialty Coating Systems, Inc., EE. UU.), se vierten 2 mL de promotor de adhesión (Adhesion promoter, Gersteltec Sarl, Suiza) y se rota a 3000 rpm por 20 s.
3. Se evapora el exceso de promotor colocando la oblea en una plancha (PC-420D, Corning Inc., EE. UU.) por 5 min a 120°C.
4. Se deja enfriar unos minutos y se coloca en el spin coater de nuevo, se le vierten 4 mL de fotorresina positiva (AZ 9260, Microchemicals GmbH, Alemania) y se rota a 1800 rpm por 40 s.
5. Se deja en relajación en una caja de Petri sobre una superficie plana por 10 min para que la capa de resina quede uniforme.
6. Se le da un precocido en una plancha a 65°C por 1 min y 3 min a 95°C.
7. Se deja enfriar y se repite el paso 2 para duplicar la altura.
8. Se repiten el paso 3 y 4, dejando 6 min a 95°C.
9. Se coloca la oblea en el equipo de fotolitografía (μ PG 101, Heidelberg Instruments, Alemania), se carga el diseño de la capa de flujo y se expone cuatro veces con una energía de 60 mW al 70%, utilizando el cabezal de 10 mm.
10. Al terminar la exposición, se revela el molde para retirar la resina expuesta sumergiendo el molde en revelador AZ 400K, (Clariant Corporation AZ Electronic Materials, EEUU) diluido en agua destilada 1:4 (revelador:agua), por 5 a 15 min, enjuagando con agua destilada hasta que se remueva toda la fotorresina no deseada.

11. Por último, se coloca el molde en la plancha por 30 min a 135 °C, seguido de 2 horas a 210°, para redondear los canales y aumentar su resistencia a solventes. Este paso es llamado reflujo.
12. El molde terminado se coloca en una caja Petri.

En el paso 7 se habla de la exposición con el equipo de fotolitografía. Este equipo cuenta con un láser UV (365 nm) de 70 mW controlado por un amplificador de alta frecuencia que permite modular la energía de exposición (mW) y el ancho de pulso (%). La energía utilizada para cada fotorresina se determinó previamente, de manera empírica. Además, el equipo cuenta con dos cabezales distintos (4 y 10 mm), que componen la parte óptica que enfoca el haz del láser en el sustrato con diferentes diámetros efectivos. El cabezal de 4 mm permite exponer estructuras con un mínimo de 0.9 μm , mientras que el de 10 mm de 2.5 μm . El cabezal de 10 mm es de 3 a 4 veces más rápido que el de 4 mm, por lo que sólo se usa este último para exponer estructuras finas (menores a 5 μm).

Protocolo de fabricación de los moldes de micropozos y control

Los moldes de micropozos y control se fabrican de manera similar, el único paso que cambia son las revoluciones por minuto a las que se gira la oblea para obtener las alturas deseadas. El protocolo de fabricación para estos moldes es el siguiente.

1. Se trata una oblea de silicio de 100 mm de diámetro con plasma de oxígeno por 5 min en un sistema de plasma.
2. Se pasa la oblea al spin coater, se vierten 4 mL de fotorresina negativa (GM 1060, Gersteltec Sarl, Suiza) sobre ella y se rota por 40 s a 900 rpm para la capa de control y 1000 para la capa de micropozos.
3. Se deja en relajación en una caja de Petri sobre una superficie plana por 10 min.
4. Se le da un precocido en una plancha. Se coloca la oblea a 50°C y se sube la temperatura hasta 95°C con una rampa de 5°C/2min, dejando 10 min a 65°C y 45 min a 95°C.

5. Se coloca la oblea en el equipo de fotolitografía, se carga el diseño de la capa de control y se expone una vez con una energía de 70 mW al 100%, utilizando el cabezal de 10 mm. Para el molde de micropozos, se carga el diseño respectivo y se expone una vez con 30 mW al 60%, utilizando el cabezal de 4 mm.
6. Al terminar la exposición, se le da un poscoccido en la plancha, repitiendo el paso 4.
7. Se revela el molde para retirar la resina no expuesta vertiendo PGMEA (Propylene glycol monomethyl ether acetate, Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) directamente sobre la oblea, hasta remover toda la fotorresina no deseada, enjuagando con isopropanol las veces que sea necesario.
8. Por último, se coloca el molde en la plancha por 2 horas a 135 °C para mejorar la adhesión de la fotorresina al sustrato y sellar pequeñas fisuras debidas al revelado.
9. El molde terminado se coloca en una caja Petri.

Una vez que todos los moldes están terminados, se exponen a una solución de clorotrimetilsilano (Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) por 30 min en una cámara cerrada, para evitar que el polidimetilsiloxano (PDMS) se adhiera al molde en el siguiente paso, y se desprenda de manera sencilla. Después de los 30 min, los moldes se colocan de nuevo en cajas Petri y se guardan hasta que se fabriquen las réplicas de PDMS.

3.1.2 Fabricación de los dispositivos microfluídicos por litografía suave multicapa

Con los moldes fabricados, el siguiente paso es fabricar los dispositivos microfluídicos de PDMS, o réplicas de PDMS. Como se había mencionado anteriormente, cada molde representa una capa del dispositivo, por lo que los dispositivos finales de PDMS tendrán tres capas. Para fabricarlos, se utiliza

un kit de PDMS, que contiene la base (monómero) y un agente curador (Sylgard® 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) que actúa en presencia de calor. Estas dos partes se mezclan en diferentes proporciones, normalmente 10:1 (base:curador), y después de exponerlas al calor, forman un sólido flexible y transparente.

El protocolo utilizado es el siguiente. Se prepara una mezcla de PDMS 5:1 (base:curador) en una centrifuga planetaria (AR-100, Thinky USA Inc., EE. UU.), que mezcla ambas partes sin generar burbujas; esta mezcla se vierte sobre el molde de control dentro de la caja Petri hasta lograr una altura de aproximadamente 5 mm. La caja Petri se mete a una cámara de vacío por 10 min para extraer todo el aire que pudo haberse atrapado al verter el PDMS. Mientras pasa ese tiempo, el molde de flujo se coloca en el spin coater, se prepara una mezcla de PDMS 20:1 y se vierten 4 mL sobre este. El molde se rota por 40 s a 1200 rpm para lograr una capa de aproximadamente 70 μm . Se coloca el molde de flujo en la caja Petri, se saca la caja Petri con el molde de control de la cámara de vacío y se colocan ambos moldes en una superficie plana por 10 min, para asegurarse de que las capas queden lo más planas posible. Posteriormente, ambos moldes se meten a un horno (UF55, Memmert, Alemania), precalentado a 80°C, por 25 min.

La diferencia en la cantidad de agente curador entre ambas capas ayuda en dos aspectos: (1) permite que un poco del curador libre de la capa de control difunda hacia la capa de flujo y una ambas capas, y (2) provoca que la capa de control se más rígida, al tener más curador, que la de flujo, ayudando en el funcionamiento de las microválvulas.

Después de sacar los moldes del horno, se sigue con el proceso de alineación. Inicialmente, con una navaja se corta el PDMS del molde de control, cuidando de no cortar las estructuras, y se desprende completamente del molde. Como hay cuatro réplicas del diseño por molde, se corta cada una por separado al ras de los contornos de cada réplica. Utilizando una perforadora (MP10-UNV, SCHMIDT Technology Corporation, EE. UU.), se hacen agujeros en cada una

de las marcas de entrada de las líneas de control, que es donde se conectarán las mangueras. Después, cada una de las réplicas de control se alinea manualmente sobre uno de los diseños en la capa de flujo, bajo un estereomicroscopio (Stemi 305, Carl Zeiss Microscopy, Alemania). El molde de flujo con las réplicas de control alineadas encima se mete al horno por 60 min a 80°C. Pasado este tiempo, el molde se retira del horno y con una navaja se corta la delgada capa de PDMS de flujo al ras de las réplicas de control. Por último, se desprenden ambas capas del molde jalando la capa de control y se hacen las perforaciones en las entradas y salidas de la capa de flujo.

Para el molde de micropozos se sigue un procedimiento similar a lo realizado con el molde de control. Se hace una mezcla de PDMS 10:1 que se vierte sobre el molde de micropozos dentro de la caja Petri, hasta lograr una altura de 3 mm. La caja Petri se coloca en la cámara de vacío por 10 min, seguido de 10 min en una superficie plana. Cumplido este tiempo, se mete al horno a 80°C por 25 min. Después, se corta el PDMS para extraerlo del molde y se corta cada una de las réplicas por separado.

Como paso final, las réplicas de flujo/control ya unidas se colocan en una oblea de silicio limpia (para aumentar el contraste al alinear) con los canales hacia arriba y las réplicas de micropozos se alinean sobre ellas bajo el estereomicroscopio. Los dispositivos de tres capas se cubren con cinta de ambos lados y se meten al horno durante toda la noche (mínimo 12 horas) para que se adhieran. Después de esto, los dispositivos se ponen sobre un cubreobjetos y están listos para usarse.

Es importante aclarar que tanto la fabricación de los moldes por fotolitografía, como de los dispositivos microfluídicos por litografía suave multicapa, se realizó dentro de un cuarto limpio grado 1000, utilizando el equipo e indumentaria necesaria. Lo anterior es para evitar contaminación durante ambos procesos, que pueda provenir del medio externo o de la persona realizando la fabricación.

3.1.3 Operación de los dispositivos microfluídicos

Para inyectar las soluciones a los dispositivos se utilizan mangueras flexibles de plástico (Tygon® AAD04103 Microbore Tubing, Saint-Gobain, Francia) con un diámetro interno de 0.02 pulgadas (508 μm), a las que se les conecta un conector, o pin, de metal (Mat-Cut-Hypo, MicroGroup, EE. UU.), que es el que entra en contacto con el dispositivo. Este pin de metal es un tubo hueco que es ligeramente más ancho que la entrada perforada en el dispositivo. De esta manera, el PDMS hace presión sobre este, evitando que se salga, incluso aplicando una alta presión. En la **Figura 3.1** se muestra una fotografía de tres dispositivos microfluídicos siendo perfundidos con colorantes, utilizando dichas mangueras y pines.

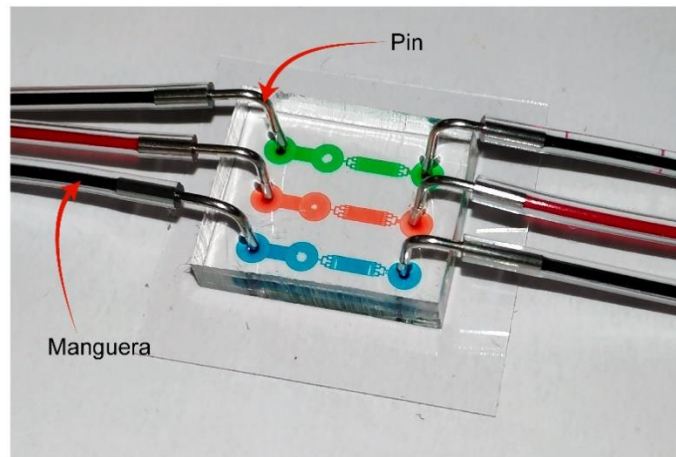


Fig. 3.1 Fotografía mostrando tres dispositivos en un solo bloque de PDMS perfundidos con colorantes.

El otro extremo de las mangueras se conecta a los sistemas con los que se controla el flujo dentro de los microcanales. Para este dispositivo se utilizan dos sistemas distintos, uno para las entradas del GGC y otro para inyectar la suspensión de células y controlar las microválvulas. El primer sistema es una bomba de jeringas, donde el flujo volumétrico inyectado puede ser controlado. El segundo es un sistema neumático de presión positiva alimentado por un compresor de aire, donde la presión aplicada puede ser controlada.

En la bomba de jeringas (SP2001 Syringe Pump, World Precision Instruments, EE. UU.) se colocan dos jeringas de 3 mL con 200 a 300 μ L de las soluciones a inyectar en cada entrada del GGC, se programa con el flujo volumétrico requerido y se conectan las mangueras al dispositivo.

El sistema neumático de presión positiva se desarrolló en el laboratorio. Cuenta con ocho válvulas manuales de tres vías, cuatro posiciones para los canales de flujo y 32 electroválvulas de 3 vías, 2 posiciones para controlar microválvulas individuales. Estas válvulas están alimentadas por un compresor de aire libre de aceite (MedicAIR, Evans, EE. UU.). La presión es regulada a través de tres reguladores de presión, dos de 0 a 30 psi (R230-02B, Parker, EE. UU.) para las electroválvulas, y uno de alta precisión (Fairchild, EE. UU.) de 0 a 6 psi para las líneas de flujo. Cada regulador tiene un manómetro (0-100 psi, Metron, México) conectado para monitorear la presión actual del sistema. La **Figura 3.2** muestra una fotografía del sistema neumático fabricado.

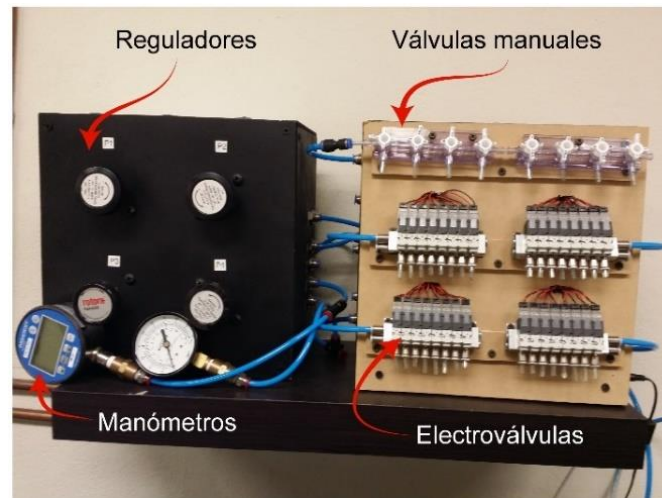


Fig. 3.2 Fotografía al módulo de presión positiva.

Las electroválvulas están conectadas a puertos digitales de una tarjeta Arduino Mega 2560 (Arduino, EE. UU.) a través de una etapa de potencia fabricada en el laboratorio. A su vez, la tarjeta Arduino se conecta a una PC por un puerto USB para así controlar la activación y desactivación (estado energizado y no

energizado) de las electroválvulas con una interfaz de usuario programada en LabVIEW (v2017, National Instruments, EE. UU.). En la **Figura 3.3** se muestra la interfaz de usuario diseñada para el control de este dispositivo. Esta interfaz permite activar y desactivar las microválvulas, así como activar la generación de pulsos en el dispositivo. Cuando esta es activada, todas las cámaras son estimuladas automáticamente con las soluciones provenientes del GGC por un tiempo determinado, para después ser lavadas a través del canal horizontal. En la interfaz se puede seleccionar el número de pulsos, tiempo de estímulo, tiempo de lavado y tiempo de purga. En la siguiente sección se explica más a detalle este módulo.

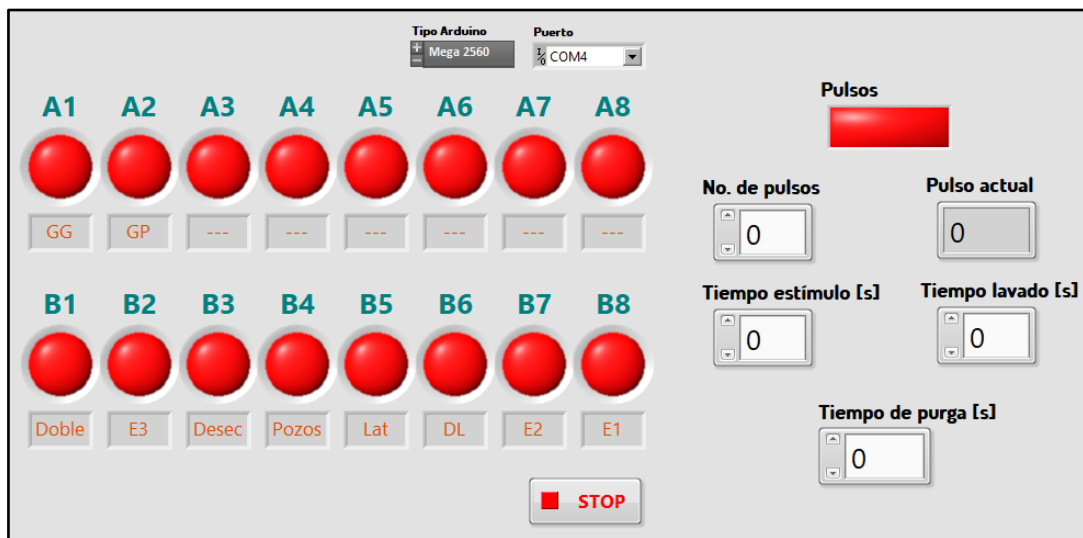


Fig. 3.3 Interfaz de usuario diseñada para controlar las electroválvulas.

3.1.4 Preparación de los dispositivos microfluídicos previo a los experimentos

Antes de cada prueba o experimento, los dispositivos se preparan de la misma manera. Se llenan mangueras con agua destilada y se conectan a cada una de las entradas de las microválvulas y a las electroválvulas en el otro extremo. Se ajusta la presión de los reguladores conectados a las electroválvulas a 8

psi y se activan todas ellas para que los canales de control se llenen con agua. Una vez llenas los canales de las microválvulas, se inyecta una solución de Plurónico F-127 (20052, ATT Bioquest, EE. UU.) al 0.02% en PBS 1X en una de las entradas de flujo. El Plurónico es un detergente anfipático que se adhiere a la superficie de todos los canales, evitando que ocurra adhesión inespecífica de otras moléculas provenientes de la suspensión celular o de las soluciones estímulo. En todas las demás entradas y salidas se colocan tapones (pines con un trozo de manguera de unos cuantos mm, sellado en el otro extremo) para evitar que el Plurónico salga del dispositivo. El Plurónico se inyecta a 1.5 psi, y con todas las entradas y salidas selladas, se espera a que el aire que quede atrapado en los canales de flujo difunda a través del PDMS por completo. Una vez que todos los canales están llenos de Plurónico, se conecta una manguera con la solución buffer que se vaya a utilizar en los experimentos, se desconecta la de Plurónico, y se lava todo el dispositivo con buffer a la misma presión de entrada.

Una vez que el dispositivo tiene todas las líneas de control llenas, la superficie de los canales está bloqueada con Plurónico y los canales están llenos con buffer, se conectan todas las mangueras con soluciones, suspensiones celulares y/o cualquier fluido que se requiera. Normalmente, toda la preparación se realiza bajo un estereomicroscopio, por comodidad, y en este punto es cuando se pasa al microscopio invertido de fluorescencia para iniciar el experimento.

3.1.5 Prueba de los dispositivos con colorantes vegetales

Para probar el funcionamiento del dispositivo antes de los experimentos, se hizo una prueba con colorantes vegetales, probando las microválvulas y el generador de gradientes de concentración (GGC). Se llenaron los canales de las microválvulas con colorante rojo y los canales de flujo con colorante azul. Con la ayuda de las microválvulas para mantener las soluciones separadas,

se lavaron las cámaras con agua destilada a través de una de las entradas para células y se sellaron. En otra de estas entradas se inyectó colorante morado y se fluyó hacia una de las salidas de desechos. En las entradas del GGC se inyectaron colorantes azul y amarillo y se fluyeron a 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ constantemente usando la bomba de jeringas.

3.2 Cultivo celular de células HEK-293

Para los experimentos de dinámica de calcio intracelular se utilizaron células HEK-293 debido a su fácil manejo y sus características endógenas, explicadas en la **Sección 4.1.3** (perteneciente a Resultados y Discusión). Las células se cultivaron en placas de 6 pozos con medio DMEM/F-12 suplementado con penicilina-estreptomicina (10,000 U/mg·mL) y suero fetal bovino al 10% en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂. Cuando se llegó a una confluencia mayor al 80%, las células se despegaron del pozo utilizando una solución de TrypLE express, para después centrifugar a 1200 rpm por 5 min. Se resuspendieron en solución Krebs-HEPES (pH 7.4) para lograr una concentración de $\sim 5 \times 10^6$ células/mL para cada experimento.

3.3 Purificación de neutrófilos

Para los experimentos de formación de NETs se utilizaron neutrófilos primarios extraídos de sangre periférica. La purificación de neutrófilos se realiza utilizando un gradiente de Percoll PLUS. El protocolo fue adaptado de [29].

Reactivos

- Percoll PLUS (E0414, Sigma-Aldrich, EE. UU.)
- Solución HBSS 10X (H3570, Life Technologies, EE. UU.)

- Solución HBSS 1X (diluido de 10X en agua ultra pura estéril)
- Hoechst 33342 (H3570, ex/em 350/461 nm, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.)

Materiales

- 6 tubos de 15 mL
- 2 tubos de 1.5 mL
- 2 tubos de 200 μ L
- 3 pipetas Pasteur
- Juego de micropipetas

Procedimiento

1. Marcar los tubos Falcon con las siguientes etiquetas:
 - a. Percoll al 72%
 - b. Percoll al 63%
 - c. Percoll al 54%
 - d. Percoll al 45%
 - e. Gradiente
 - f. Neutrófilos
2. Formar soluciones de Percoll con distintos porcentajes (75, 63, 54 y 45%) utilizando la siguiente guía:

Porcentajes Percoll PLUS	Percoll PLUS [μL]	HBSS 10X [μL]	HBSS 1X [μL]
72%	1890	210	525
63%	1653.74	183.75	787.5
54%	1417.5	157.5	1050
45%	1181.24	131.25	1312.5

3. Comenzando por la solución con mayor densidad (72%), y en orden descendente, verter 2.5 mL de cada solución en los tubos Falcon marcados con “Gradiente” utilizando una pipeta Pasteur.
 NOTA: Las soluciones deben depositarse de manera lenta, cuidando de no mezclarlas al colocarlas.

4. Agregar 9 mL de solución HBSS 1X en el tubo marcados con "Neutrófilos".
5. Obtener una muestra de sangre periférica. Se requieren un mínimo de 3 mL.
6. Depositar 2.5 mL de sangre sobre el gradiente de Percoll con una nueva pipeta Pasteur.
7. Centrifugar el gradiente por 20 min a 600 RCF y 20 °C, con desaceleración libre.
8. Tomar 100 µL de plasma sanguíneo (solución superior en el tubo) y guardarlo en el tubo eppendorf de 200 µL.
9. Tomar la banda correspondiente a los neutrófilos (interfaz entre 63 y 72%, banda blanquecina sobre los eritrocitos) con una pipeta Pasteur y verter en el tubo marcado con "Neutrófilos".
10. Centrifugar los neutrófilos por 10 min a 340 RCF y 20 °C.
11. Tirar la solución HBSS por decantación.
12. Preparar solución para teñir núcleos en un tubos de 1 mL:
 - a. 10 µL de plasma
 - b. 5 µL de Hoechst 33342
 - c. 500 µL de solución HBSS 1X
13. Agregar 300 µL de solución para teñir al tubo de neutrófilos para resuspenderlos.
14. Pasar el volumen de neutrófilos al tubo de tinción.
15. Incubar los neutrófilos por 15 min.
16. Si no se utilizarán inmediatamente, refrigerar a 4 °C.
17. Desechar todos los materiales, clorando todo lo que haya tenido contacto con sangre o células.

El tubo de neutrófilos se mantiene en refrigeración hasta el momento de su uso. Para evitar muerte celular, se utiliza dentro de las dos horas posteriores a la extracción de la sangre periférica.

3.4 Captura de células en micropozos

Para inyectar las células al dispositivo, se llena una manguera con $\sim 20 \mu\text{L}$ de la suspensión celular y se conecta a una de las entradas de células. Las células se inyectan a través del canal horizontal a todas las cámaras en serie. Después de unos segundos, el flujo se detiene con las microválvulas y se espera a que las células se sedimenten dentro de los pozos. Este paso se repite hasta que todos los pozos cuenten con un alto número de células (de ser posible $>80\%$ de micropozos ocupados, determinado visualmente). Al final, se fluye buffer a través de otra de las entradas de células para lavar el exceso de células fuera de los micropozos. La **Figura 3.4** muestra un diagrama de la secuencia de captura de células en los micropozos.

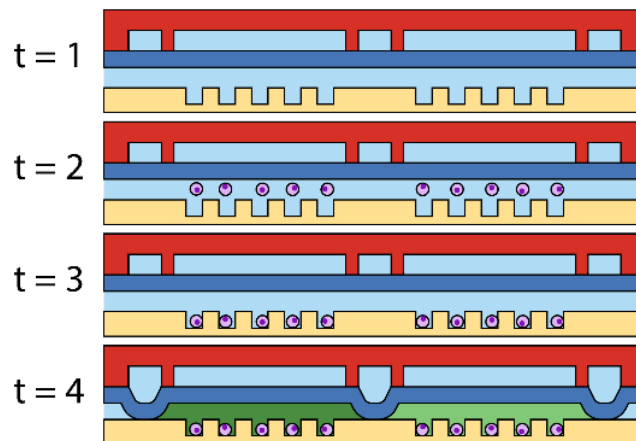


Fig. 3.4 Secuencia seguida para la captura de células en los micropozos por sedimentación.

3.6 Estudios de oscilaciones de calcio intracelular

3.6.1 Diseño del generador de gradientes de concentración lineal

En el diseño del dispositivo microfluídico se agregó un generador de gradientes de concentración lineal basado en el trabajo de Campbell [61] (**Figura 1.13, Sección 1.1.7.1**). Para el diseño de este módulo se usaron las

consideraciones y ecuaciones reportadas en dicho trabajo. Antes de comenzar el diseño, hacen una serie de consideraciones para el dispositivo. (1) Se parte de dos soluciones inyectadas al dispositivo en la etapa k_0 . (2) Se define que todos los serpentines a partir de la etapa k_1 tienen el mismo ancho w y altura h , pero distinta longitud L . (3) Cada serpentín de la etapa k divide su volumen en tres serpentines de la etapa $k + 1$, a excepción de los serpentines de los extremos, que lo dividen en dos. (4) En una etapa k hay N serpentines, siendo N_k el último de ellos. Como sabemos que la etapa k_1 tiene dos serpentines ($N_0 = 2$) y la etapa k_1 tiene tres ($N_1 = 3$), podemos inferir que,

$$N_{k+1} = N_k + (N_k - 1), \quad (1.1a)$$

$$N_k = 2^k + 1. \quad (1.1b)$$

El número de etapas del GGC puede elegirse según se desee con la Ecuación 1.1b. Por las dimensiones de nuestro dispositivo y para tener un dispositivo más simple de manipular, (5) para este trabajo se usaron sólo tres etapas, que son nueve canales de salida, $N_3 = 9$.

Partiendo de la consideración (3), el flujo en los serpentines de cada etapa puede calcularse considerando que el serpentín n de la etapa k , $\langle k, n \rangle$, provee de flujo a tres canales distintos; el flujo volumétrico en dicho serpentín está dado por:

$$Q_{k,n} = \alpha_{k,n}Q_{k+1,p-1} + Q_{k+1,p} + \beta_{k,n}Q_{k+1,p+1}, \quad (1.2)$$

donde $p = 2n - 1$, y $\alpha_{k,n}$ y $\beta_{k,n}$ es la proporción de volumen que reparte al canal izquierdo y derecho del siguiente etapa, respectivamente. El serpentín $\langle k + 1, p - 1 \rangle$ es alimentado por los serpentines $\langle k, n \rangle$ y $\langle k, n - 1 \rangle$ y el $\langle k + 1, p + 1 \rangle$ por los serpentines $\langle k, n \rangle$ y $\langle k, n + 1 \rangle$, y sus concentraciones c están dadas por:

$$c_{k+1,p-1} = \alpha_{k,n}c_{k,n} + \beta_{k,n-1}c_{k,n-1}, \quad (1.3a)$$

$$c_{k+1,p+1} = \beta_{k,n}c_{k,n} + \alpha_{k,n+1}c_{k,n+1}. \quad (1.3b)$$

Los serpentines pares de todas las etapas son alimentados por un solo serpentín de la etapa anterior, por lo que,

$$\alpha_{k,n} + \beta_{k,n-1} = 1, \quad (1.4a)$$

$$\beta_{k,n} + \alpha_{k,n+1} = 1. \quad (1.4b)$$

Obteniendo por sustitución que,

$$\alpha_{k,n} = \frac{c_{k+1,p-1} - c_{k,n-1}}{c_{k,n} - c_{k,n-1}}, \quad (1.5a)$$

$$\beta_{k,n} = \frac{c_{k+1,p+1} - c_{k,n+1}}{c_{k,n} - c_{k,n+1}}. \quad (1.5b)$$

Por la consideración (3), en el primer serpentín de cada etapa $\alpha = 0$, y en el último $\beta = 0$.

La resistencia hidráulica (R_h) depende de la geometría del microcanal [55]. Para un microcanal con una sección transversal rectangular, R_h está dada por:

$$R_h = \frac{12\eta L}{h^3 w \left[1 - 0.63 \frac{h}{w}\right]}. \quad (1.6)$$

En este caso, como w y h son constantes para todos los serpentines, podemos llegar a,

$$R_h = \gamma L, \quad (1.7a)$$

$$\gamma = \frac{12\eta}{h^3 w \left[1 - 0.63 \frac{h}{w}\right]}, \quad (1.7b)$$

donde γ es ahora una constante una vez que se le asignan valores a w y h .

Para obtener los valores de Q , c y L primero debemos suponer que la L de todos los canales de la última etapa, k_3 , es igual, y por consiguiente Q . Tomando estos serpentines como referencia para los demás, podemos asumir que $L = 1$ y $Q = 1$ para todos ellos, ambas en unidades arbitrarias.

Como el perfil del GGC es lineal, las concentraciones en unidades arbitrarias de los serpentines en la última etapa son los siguientes:

$$c_{3,n} = [0,1,2,3,4,5,6,7,8,].$$

Como los serpentines de una etapa superior alimentan tres canales de la siguiente etapa, todos los canales impares mantienen la concentración de los canales de la etapa anterior, por lo que a partir del conjunto de concentraciones $c_{3,n}$ se pueden obtener todos los valores de c para todas las etapas. Al final, para k_0 se tienen solo los valores 0 y 8, que son las concentraciones en unidades relativas de las soluciones que se inyectan por las entradas del GGC. Con estos valores y las Ecuaciones 1.2, 1.5a y 1.5b es posible obtener los valores de Q para todos los serpentines.

Para obtener los valores de L de los serpentines, se puede considerar lo siguiente. De la ley de Hagen-Poiseuille y la Ecuación 1.7a,

$$Q = \frac{\Delta p}{R_h} = \frac{\Delta p}{\gamma L}. \quad (1.8)$$

Considerando que Δp es igual en todos los serpentines de una misma etapa,

$$L_{k,n} Q_{k,n} = L_{k,n+1} Q_{k,n+1}, \quad (1.9a)$$

$$\frac{L_{k,n}}{L_{k,n+1}} = \frac{Q_{k,n+1}}{Q_{k,n}}, \quad (1.9b)$$

con lo que se puede obtener L para todos los serpentines de una misma etapa a partir de los valores de Q , siempre que se conozca uno de ellos. Cuando se calculan los valores de Q para todos los serpentines, se obtiene que el flujo en los serpentines centrales disminuye a la mitad al avanzar una etapa, por lo que se establece que,

$$L_{1,2} = 2L_{2,3} = 4L_{3,5},$$

completando así los cálculos del dispositivo. Es importante mencionar que los valores de L no son arbitrarios. Para poder obtener valores en unidades reales de todos los parámetros que se acaban de calcular, es necesario determinar las concentraciones a utilizar, pero también la L de por lo menos uno de los canales. Este valor L se determinará más adelante.

A partir de este punto, se calculan los valores reales del dispositivo para las moléculas que se desean mezclar en los canales. En nuestro caso, el dispositivo será probado con una molécula de Dextran conjugado con tetrametilrodamina (Dextran-rodamina) con un peso molecular de 40 kDa y un coeficiente de difusión de $D_{D-R} = 52.9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [107]. Los serpentines se fabricarán con un ancho $w = 30 \mu\text{m}$ para disminuir la distancia de difusión de las moléculas lateralmente sin tener una resistencia hidráulica muy alta, y una altura $h = 20 \mu\text{m}$. Se puede determinar el tiempo que le tomará a la molécula de Dextran-rodamina difundir a lo ancho del canal utilizando la siguiente ecuación:

$$t_D = \frac{w^2}{2D} = \frac{(15 \mu\text{m})^2}{52.9 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}} = 4.25 \text{ s.} \quad (1.10)$$

El siguiente paso es determinar un valor para el largo de un serpentín. El largo de un serpentín debe ser elegido empíricamente y a partir de ese valor calcular las dimensiones de los demás. El primer serpentín en el que ocurre una mezcla es el serpentín <1,2>, por lo que se determinó que una longitud $L_{1,2} = 85 \text{ mm}$ en base a observaciones previas. A partir de este valor se pueden calcular todas las longitudes y el flujo que habrá en los serpentines. Si se divide $L_{1,2}$ entre t_D se obtiene la velocidad máxima promedio que puede haber en ese serpentín para que se complete la difusión,

$$\bar{v}_{1,2} = \frac{L_{1,2}}{t_D} = 20 \cdot 10^3 \mu\text{m s}^{-1}, \quad (1.11)$$

y, al conocer el área transversal A del canal (wh), se calcula el flujo volumétrico que debe haber en el canal para que las soluciones tengan tiempo suficiente de mezclarse,

$$A = w \cdot h = (20 \mu\text{m})(30 \mu\text{m}) = 600 \mu\text{m}^2, \quad (1.12a)$$

$$Q_{1,2} = \bar{v}_{1,2}A = (20 \cdot 10^3 \mu\text{m s}^{-1})(600 \mu\text{m}^2) = 12 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3 \text{ s}^{-1}, \quad (1.12b)$$

$$Q_{1,2} = 0.72 \mu\text{L min}^{-1}. \quad (1.12c)$$

Con los valores $L_{1,2} = 85 \text{ mm}$ y $Q_{1,2} = 0.72 \mu\text{L min}^{-1}$ se pueden calcular todos los flujos volumétricos y longitudes de la red de microcanales que conformarán el GGC.

3.6.2 Caracterización del generador de gradientes de concentración lineal

Para caracterizar el funcionamiento del generador de gradientes de concentración (GGC) se utilizaron dos soluciones fluorescentes distintas, isotiocianato de fluoresceína (FITC, ex/em 492/518 nm, Sigma-Aldrich, EE. UU.) a una concentración de $10 \mu\text{M}$, y dextran conjugado con tetrametilrodamina (Dextran-rodamina, ex/em 555/580 nm, Molecular Probes, EE. UU.) a $100 \mu\text{M}$. FITC tiene un peso molecular de 389 Da, mientras que Dextran-rodamina es más de cien veces más grande, con 40,000 Da; esta diferencia en tamaño se ve reflejada en su coeficiente de difusión: $D_{\text{FITC}} = 500 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [61], $D_{\text{D-R}} = 52.9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [107].

Para el experimento, se preparó el dispositivo como se mencionó en la sección anterior. Después, se cargaron dos jeringas con las soluciones (FITC y Dextran-rodamina) y se colocaron en la bomba de jeringas. Se establecieron flujos volumétricos en un rango de 0.5 a $3 \mu\text{L}/\text{min}$, con incrementos de $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$. Como ambas jeringas inyectan la solución respectiva con el mismo flujo volumétrico, el flujo total en el dispositivo está en el rango de 1 a $6 \mu\text{L}/\text{min}$. Las soluciones se fluyeron hacia el dispositivo, a través de las nueve cámaras y se esperaron alrededor de 10 min para que el gradiente de concentración fuera estable. Una vez estable, se adquirieron imágenes en cada una de las cámaras a cada uno de los flujos volumétricos establecidos anteriormente.

Posteriormente, se analizó la intensidad de fluorescencia de cada una de las cámaras utilizando el software Fiji [108] y se graficó el perfil de fluorescencia obtenido de las nueve cámaras, para cada uno de los flujos volumétricos

utilizados. A partir de la caracterización del GGC se eligió el flujo al cual se trabajaría en los siguientes experimentos.

3.6.3 Caracterización de la generación de pulsos

El dispositivo microfluídico diseñado tiene la capacidad de generar señales químicas periódicas en las cámaras que pueden ser utilizadas como un estímulo dinámico a las células. Estas señales periódicas constan de un paso de estímulo donde la amplitud de la señal llega al valor máximo en cada cámara (dependiente de la concentración proveniente del GGC), seguido de un paso de lavado, donde la solución estímulo es lavada por completo. En este caso se generaron señales periódicas de estos dos pasos, donde una repetición de estos pasos es denominada un *pulso*.

Para este experimento, se generaron pulsos a cuatro frecuencias distintas, 6.7, 8.3, 11.1 y 33.3 mHz, con los tiempos de estímulo, lavado y purga mostrados **Tabla 1.2**. Para cada frecuencia, se grabaron videos de 5 min de duración en cada una de las nueve cámaras, secuencialmente. Lo anterior nos lleva a que el GGC estuvo activo durante por lo menos 45 min, para cada frecuencia, más los tiempos de preparación antes y después de cada video (30 min extra, aproximadamente).

Tabla 1.2 *Tiempos de estímulo, lavado y purga para los experimentos de caracterización de pulsos.*

Frecuencia	Tiempo de estímulo	Tiempo de lavado	Tiempo de purga
6.7 mHz	75 s	45 s	30 s
8.3 mHz	45 s	45 s	30 s
11.1 mHz	30 s	30 s	30 s
33.3 mHz	15 s	15 s	0 s

Los videos se grabaron utilizando el software Camtasia (Camtasia Studio 9, TechSmith, EE. UU.), que graba la pantalla en tiempo real de la PC. Se decidió

grabar la pantalla debido a que no se tiene un módulo de adquisición de video en tiempo real en el software del microscopio utilizado, limitando la adquisición de un video con mayor resolución. Por lo tanto, al generar los pulsos, una de las cámaras de micropozos se centraba enfocaba y se grababa la pantalla por 5 min. Los videos se grabaron en formato AVI y fue necesario reformatearlos con el software FFmpeg (v2.8.15, desarrollado por Fabrice Bellard) para poder analizarlos utilizando el software Fiji. Lo que a nosotros nos interesa es asegurarnos que las células atrapadas en los pozos reciben el estímulo, por lo que al analizar los videos se tomó la intensidad de fluorescencia del área de 5 pozos del centro de cada cámara a la largo del tiempo y se promedió la intensidad de fluorescencia. Estos datos nos permiten determinar la frecuencia máxima de estimulación que el dispositivo nos permite realizar.

3.6.4 Simulaciones de estrés de corte

No existe una manera directa de medir el estrés de corte, por lo que se calcula a través de simulaciones de elemento finito [70]. En el caso de este trabajo, se hicieron cálculos del estrés de corte al cual estarían sometidas las células dentro de los micropozos cuando existe un flujo en las cámaras del dispositivo. Para esto, se utilizó el software COMSOL Multyphysics (v5.2, COMSOL Inc., EE. UU.).

Primero se realizó un diseño en AutoCAD que representa el área de cuatro micropozos con células dentro de ellos. Cada célula se colocó en una posición diferente, para lograr calcular el estrés de corte considerando que no todas las células queden en el centro del micropozo. Se realizaron simulaciones considerando varios flujos volumétricos, para mostrar cual es el estrés de corte para cada flujo.

3.6.5 Marcaje con Calceína AM

Para estos experimentos, la suspensión celular se centrifugó y resuspendió en un buffer salino, PBS 1X (10173433, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El dispositivo se bloqueó con plurónico y se lavó con PBS 1X. Después de lavar el dispositivo, se llenó una jeringa con 200 μ L de una solución de Calceína AM (C1430, ex/em 485/530 nm, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) en PBS 1X a una concentración de 3 μ M y otra con el mismo volumen, pero sólo con PBS 1X. Ambas jeringas se montaron en la bomba de jeringas y se conectaron al dispositivo con mangueras a las entradas del GGC; la solución de Calceína AM se conectó a la entrada izquierda y la de PBS 1X a la derecha. Se fluyeron las soluciones a través del GGC por 10 min a 1 μ L/min para estabilizar el gradiente, para después detenerlos y llenar los micropozos con células. El GGC se reactivó por 5 min más fluyendo a través de los canales de drenado y, posteriormente, se comenzaron a fluir las soluciones a través de las cámaras de micropozos al mismo flujo volumétrico.

Las células fueron sometidas a Calceína AM por 110 min, con un flujo constante a través del GGC; con las soluciones utilizadas de 3 y 0 μ M de Calceína AM, el perfil de concentraciones llegando a las cámaras esperado es: 3, 2.625, 2.25, 1.875, 1.5, 1.125, 0.75, 0.375, y 0 μ M. A través de un microscopio invertido de fluorescencia motorizado (DMI6000 B, Leica Microsystems, Alemania), se adquirieron imágenes de cada cámara cada 13 s utilizando un objetivo de 10X y un juego de filtros de excitación L5 (excitación, filtro pasa banda 480/40 nm; emisión, filtro pasa banda 527/30 nm; Leica Microsystems, Alemania) para observar el nivel de fluorescencia de las células. El tiempo de adquisición de imágenes está dado por el microscopio, debido a que es el tiempo que le toma recorrer todas las cámaras y regresar a la posición original para adquirir nuevas imágenes.

3.6.6 Dinámica de calcio intracelular

En estos experimentos, las células fueron centrifugadas y lavadas con solución Krebs-HEPES. Esta solución contiene: 135 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM de glucosa, y 15 mM de HEPES. El pH de la solución se ajustó con NaOH a 7.4. Después de lavar, las células fueron cargadas con 2 μM de Fluo-8 AM (21080, em/ex 490/520 nm, AAT Bioquest, EE. UU.) por 30 min a temperatura ambiente, para después centrifugarlas y lavar de nuevo con solución Krebs-HEPES. Posteriormente, se preparó una solución de Carbacol a 10 μM en Krebs-HEPES y se cargó una jeringa con 200 μL . La segunda jeringa se cargó con solución Krebs-HEPES, y ambas fueron conectadas al dispositivo para generar el gradiente de concentración. Una vez generado el gradiente de concentración, las células se atraparon en los micropozos y se estabilizó el gradiente fluyendo por 5 min a través del canal de drenado. Las concentraciones de carbacol esperadas llegando a las cámaras a través del GGC son: 10, 8.75, 7.5, 6.25, 5, 3.75, 2.5, 1.25, y 0 μM .

Un grupo de células fue estimulado con cinco pulsos de Carbacol con una frecuencia de 4.5 mHz, mientras que otro (en un dispositivo distinto) fue estimulado con 10 pulsos de estímulo a 20 mHz. Debido a la temporalidad de la respuesta celular y al retardo en la toma de imágenes debido al microscopio, se adquirieron imágenes en sólo cinco de las nueve cámaras (10, 6.25, 3.75, 1.25, y 0 μM). Estas imágenes se adquirieron cada 8.3 s ya que es el tiempo que le toma al microscopio utilizado tomar una imagen en cada cámara y regresar a la primera.

3.6.7 Análisis de los datos

Al principio de cada experimento se adquirió una imagen en campo claro de cada una de las cámaras, que se utiliza para conocer la posición de lo

micropozos a lo largo de la secuencia de imágenes en el canal de fluorescencia. Todas las imágenes son exportadas en TIFF y analizadas utilizando Matlab. Para esto, se generó un script automático de análisis, que se ejecuta para cada secuencia de imágenes de cada cámara. El script comienza abriendo la imagen en campo claro para detectar la posición y el radio de cada uno de los micropozos de la cámara actual, guardando todos los datos. Recorre cada una de las imágenes de fluorescencia de manera secuencial y realiza una serie de pasos para determinar el nivel de fluorescencia de cada célula en un micropozo. En cada imagen corta los pozos de manera individual, creando pequeñas imágenes cuadradas a partir del centro y radio del micropozo actual. Esta imagen es binarizada y multiplicada por una máscara binaria para eliminar el área fuera del micropozo. Se aplica una función de erosión y dilatación para filtrar puntos brillantes en la imagen y mantener sólo el área correspondiente a la célula. Se calcula el área de la región remanente y se busca su centroide, que se considera como la posición del centro de la célula en el micropozo de la imagen actual. A partir del centroide, se divide el área del pozo en dos, la primera es un círculo con radio de 8 píxeles, que se considera como el área donde se encuentra la célula, y la segunda es el área restante del micropozo, que se considera como el fondo de la imagen. Se calcula el promedio de intensidad de cada área, y al valor de intensidad de la célula se le resta el del fondo. El valor obtenido se guarda como el nivel de intensidad de la célula en el micropozo y tiempo actual. El mismo procedimiento se repite para todos los pozos de toda la secuencia de imágenes de cada cámara. En la **Figura 3.5** se muestra de manera gráfica la secuencia de pasos realizada durante el análisis de imágenes para cada micropozo.

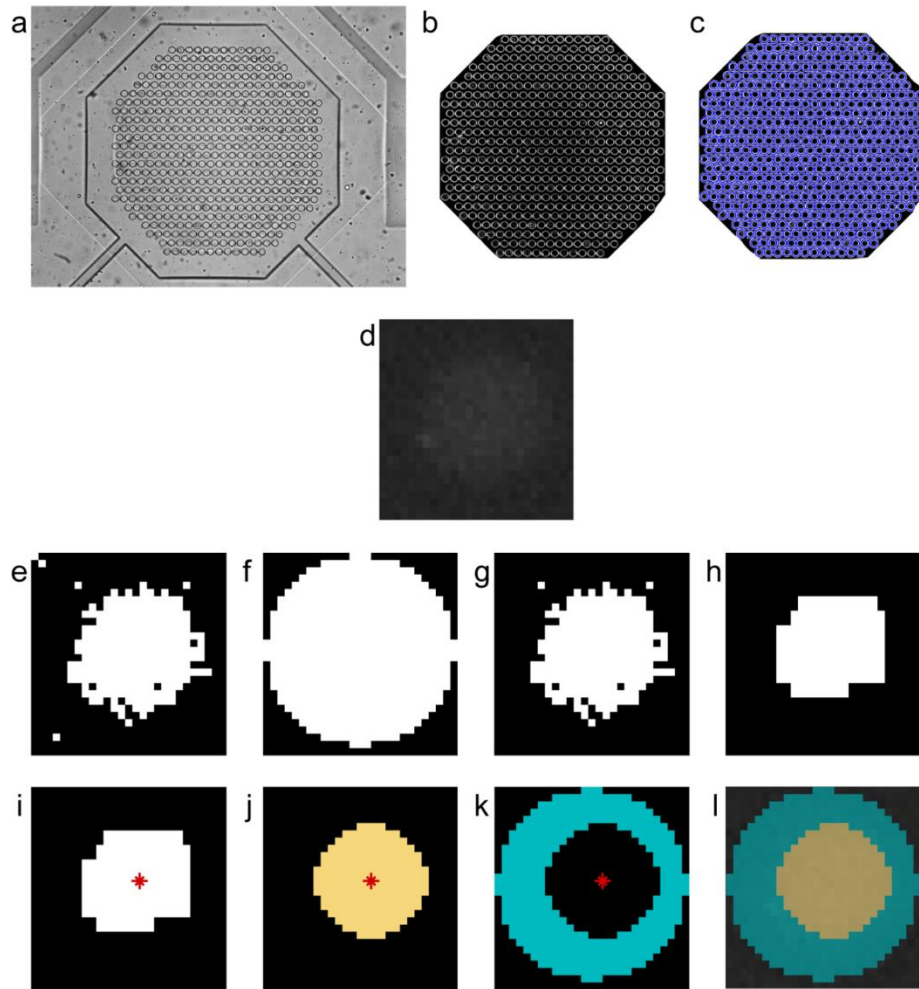


Fig. 3.5 *Secuencia del análisis de imágenes con el script de Matlab. (a) Se abre la imagen en campo claro y se invierte (b). (c) Matlab localiza cada micropozo y guarda la posición y radio. (d) Cada micropozo es recortado, binarizado (e) y multiplicado por una máscara (f) para obtener una imagen sin ruido fuera del pozo (g). (h) Se aplican las funciones de erosión/dilatación para remover ruido. (i) Se encuentra el centroide de la célula, a partir del cual se mide una región de 8 píxeles de radio (j) y se le restan los demás píxeles del micropozo (k). (l) Muestra el área medida completa del micropozo.*

Como normalmente no se alcanza el 100% de captura de células en los micropozos o algunas células pueden escaparse de los mismos durante el experimento debido al flujo constante, se eliminan los datos para todos los micropozos que se determinan como vacíos en la imagen del tiempo final. Con esto, se tienen exclusivamente los datos de los micropozos que tuvieron una célula a lo largo de todo el experimento.

Al final del análisis, el script arroja la gráfica del nivel de fluorescencia de cada uno de los micropozos a lo largo del tiempo, además de la intensidad promedio de todas las células medidas para cada cámara. Con estos mismos datos, se realiza un agrupamiento de los datos (llamado *k-means clustering*) en base al nivel de fluorescencia que muestra cada célula a lo largo del experimento. Este agrupamiento acomoda los datos de manera que las células con un perfil similar de fluorescencia quedan juntas, acomodando estos grupos en orden ascendente. Los datos agrupados se grafican en un mapa de calor que permite ver de manera más clara la tendencia de las células durante el experimento.

3.7 Experimentos de formación de NETs

3.7.1 Incorporación de una bomba peristáltica para el control del flujo volumétrico

Se incorporó una bomba peristáltica al diseño del dispositivo basada en la reportada por Unger [109]. Para su operación se rediseñó la interfaz de LabVIEW utilizada en el capítulo anterior. Se eliminó la parte de los pulsos automáticos y se agregó un botón que activa las válvulas que comprenden la bomba de manera secuencial, de forma automática, donde puede elegirse el tiempo de espera entre cada paso de la secuencia.

3.7.2 Caracterización del tiempo de intercambio de soluciones en las cámaras

Se utilizó una solución fluorescente de Dextran conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Dextran-FITC, FD40S, ex/em 490/520 nm, Sigma-Aldrich, EE. UU.) para determinar el tiempo que le toma a una solución llenar por completo

una cámara del dispositivo, cuando el flujo está dado por la bomba peristáltica. Una manguera con 50 μL de solución de Dextran-FITC a 10 μM se conectó en la entrada de estímulo del dispositivo, y otra con 300 μL de PMS 1X en la entrada de lavado, con las microválvulas activadas para evitar el mezclado de las soluciones. Se activó la bomba peristáltica con pasos en un rango de 50 ms a 400 ms dejando fluir la solución de Dextran-FITC hasta que la intensidad de fluorescencia se estabilizara. Lo mismo se repitió con PBS 1X. Se grabaron videos del proceso y se analizaron utilizando Fiji [108].

3.7.3 Caracterización del flujo volumétrico en las cámaras

Para determinar el flujo volumétrico que se logra con la bomba peristáltica, se conectó una manguera con 50 μL de colorante vegetal a cuatro entradas de estímulo, y 300 μL en la entrada de lavado, mientras que se conectaron mangueras de 15 cm vacías en las salidas de las cámaras. Se activó la bomba peristáltica con pasos de 100 ms, fluyendo colorante a través de las cámaras, en cuatro de ellas a través de las entradas de estímulo y en las otras cuatro a través del canal de lavado. Las soluciones se fluyeron por 300 min, con intervalos de 30 min. En las mangueras de salida se midió la distancia que recorrió el líquido después de cada intervalo, para así determinar el volumen desplazado; se promediaron los resultados y con esto se determinó el flujo volumétrico.

3.7.4 Experimentos de formación de NETs en el dispositivo microfluídico

Previo a cada experimento, los canales de flujo del dispositivo son bloqueados con plurónico al 0.02% y las líneas de control se llenan con agua destilada. El

dispositivo se lava con solución HBSS 1X a través de la entrada de lavado de células. Se llenan las ocho mangueras de estímulo (detalles más adelante) con 50 μ L de solución y se conectan en las entradas respectivas; se hace lo mismo con la manguera de lavado, pero con 300 μ L de solución HBSS 1X.

El tubo de neutrófilos se centrifuga en una mini centrífuga por 1 min para sedimentar las células. En una manguera se toman 20 μ L de suspensión de neutrófilos, tomando justo en el pellet formado, y se conecta a la entrada de células. Se fluye la suspensión celular a través de las cámaras y se atrapan las células en los micropozos por sedimentación.

Como estímulo se utilizaron soluciones de forbol miristato acetato (PMA, P8139, Sigma-Aldrich, EE. UU.) con concentraciones de 10 a 40 μ M, con Sytox Green (S7020, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) a 50 μ M como marcador de daño celular. Se realizaron experimentos con tres condiciones distintas: (1) incubando el estímulo como en la referencia [29], (2) perfundiendo las soluciones estímulo constantemente, y (3) con pulsos unitarios de estímulo de distintas duraciones.

Para todos los experimentos, se adquirieron imágenes de cada cámara en campo claro, y los canales de fluorescencia de Hoechst 33342 y Sytox Green cada 10 min por 4.5 horas (270 min). Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio invertido de epifluorescencia motorizado (Axio Observer A1, Carl Zeiss Microscopy, Alemania) con los sets de filtros de fluorescencia 38 (excitación, filtro pasa bandas 470/40 nm; emisión, filtro pasa bandas 525/50 nm; Carl Zeiss Microscopy, Alemania), 43 (excitación, filtro pasa bandas 545/25 nm; emisión, filtro pasa bandas 605/70 nm; Carl Zeiss Microscopy, Alemania) y 49 (excitación 365 nm; emisión, filtro pasa bandas 445/50 nm; Carl Zeiss Microscopy, Alemania). El microscopio está equipado con una incubadora (Full Enclosure System, In Vivo Scientific, EE. UU.) que permitió realizar los experimentos a 37 °C.

3.7.5 Análisis de los datos

Se desarrollo un script de Matlab basado en el anterior, pero con algunas mejoras para un análisis más fino. El script analiza todas las imágenes de todas las cámara de manera simultánea. Con las imágenes de campo claro de todos los tiempos para cada cámara, alinea las imágenes de los tres canales. Localiza y guarda las posiciones de cada pozo y su radio. Analiza cada pozo en los dos canales de fluorescencia y mide y guarda los siguientes valores por canal: intensidad de fluorescencia promedio, área que ocupa el núcleo y excentricidad. Para cada pozo, busca el tiempo en el que mostró fluorescencia en el canal de Sytox Green (t_s). Compara el valor de excentricidad y el área de las imágenes previas a t_s y le asigna un valor. Si el valor es mayor a un umbral, se considera que la célula formó NETs. En caso contrario, se guardan los datos en otra variable. Los datos procesados son graficados de manera automática en gráficas de intensidad de fluorescencia y mapas de calor.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados para los dos dispositivos y aplicaciones descritas. Para una mayor claridad, se separan en dos subcapítulos distintos. En el primer subcapítulo se reportan los resultados obtenidos con el dispositivo microfluídico con el módulo del generador de gradientes de concentración, donde se realizaron estudios de dinámica de calcio intracelular en células HEK-293. En el segundo subcapítulo se hace lo propio con los resultados de los estudios de la temporalidad del proceso de NETosis suicida.

4.1 Estudios de la dinámica de calcio intracelular en células HEK-293

4.1.1 Dispositivo microfluídico

El dispositivo microfluídico que se empleó para estos experimentos está basado en la integración de dos módulos distintos: (1) un generador de gradientes de concentración (GGC) lineal [61] y (2) un módulo de perfusión, que cuenta con nueve cámaras con 492 micropozos cada una para atrapar y estimular células individuales [29]. Además de los dos módulos mencionados, se integraron microválvulas para controlar el flujo de soluciones dentro de los microcanales.

El tamaño de los micropozos es una parte fundamental de su funcionamiento. Si el micropozo es muy profundo o muy ancho, pueden entrar más de una célula por micropozo. En cambio, si es poco profundo o delgado, las células podrían salirse fácilmente o ni siquiera poder entrar. Para este trabajo, se utilizaron micropozos de 20 μm de diámetro, como de profundidad, ya que fueron probados exitosamente en nuestro laboratorio y reportados por

Jiménez-Valdés [29]. A su vez, los tipos celulares comúnmente utilizados en estudios de investigación (THP-1, Jurkat, HeLa, neutrófilos y monocitos primarios, entre otras) tienen un diámetro menor a los 20 μm , aportando una gran versatilidad al micropozo.

Para obtener un mayor número de micropozos en un menor espacio, el arreglo de micropozos se coloca en una disposición hexagonal. Se coloca un micropozo en el centro y a partir de él se colocan otros 6 alrededor, cada 60° , con una separación radial de 10 μm desde el borde del micropozo central (30 μm de centro a centro). En la **Figura 4.1** se muestra un ejemplo de la disposición de los pozos en el dispositivo.

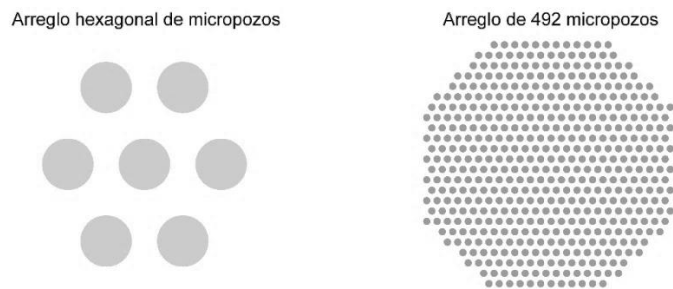


Fig. 4.1 Arreglo hexagonal de micropozos y arreglo del número total de pozos en una cámara. Cada micropozo tiene un diámetro de 20 μm .

En el laboratorio se cuenta con un microscopio invertido de fluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss Microscopy, Alemania), el cual tiene un campo de visión de aproximadamente 1,210 x 970 μm ($l \times h$), con un objetivo de 10X. Para aprovechar este campo de visión, se colocó un arreglo de 492 micropozos en cada una de las cámaras del dispositivo microfluídico, el cual cubre 900x900 μm , aproximadamente. El arreglo final de los micropozos se muestra en la **Figura 4.1**.

4.1.1.1 *Diseño final*

El diseño del dispositivo microfluídico se muestra en la **Figura 4.2**, el cual consta de tres capas distintas, denotadas por cada color. La capa mostrada en azul es llamada capa de flujo, y está conformada por algunos de los canales

por donde fluirán las soluciones, estímulos y células al realizar los experimentos. La capa amarilla contiene los micropozos y los canales que conforman el generador de gradientes de concentración (GGC). Esta capa se utiliza como base de los canales, quedando en la parte inferior del dispositivo. Por último, la capa roja es llamada capa de control y se utiliza para controlar el paso de fluidos a través de puntos específicos en la capa de flujo. Cada rectángulo rojo que aparece sobre un canal de la capa de flujo es una microválvula que bloquea el paso de líquido del canal de flujo cuando es presurizada.

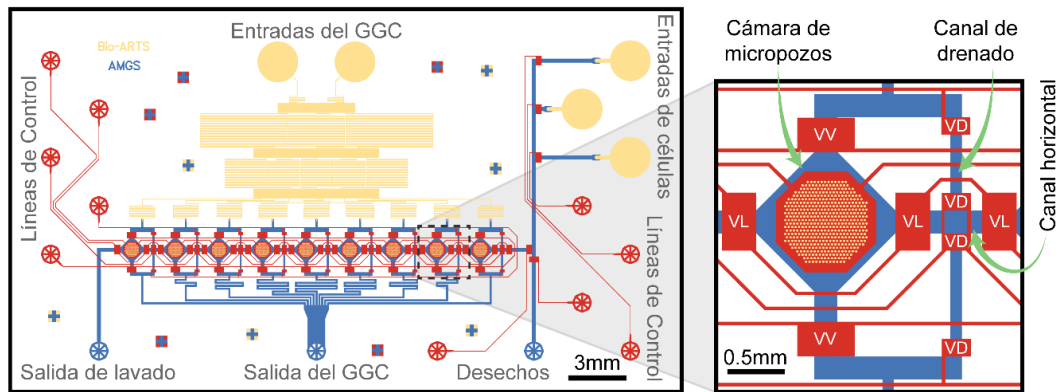


Fig. 4.2 Diseño del dispositivo microfluídico mostrando las tres capas, y un acercamiento a una de las cámaras de este.

Para inyectar las células al dispositivo, se utilizan los canales de entrada ubicados en la parte superior derecha del dispositivo. De esta manera, las células son inyectadas a todas las cámaras de manera serial, de derecha a izquierda, por el canal horizontal que las conecta. Las células se atrapan por sedimentación en los pozos; es decir, se inyectan hasta fluir por encima de los micropozos, para ahí detiene el flujo y esperar a que las células caigan dentro. Una vez atrapadas, las células pueden ser estimuladas con las soluciones provenientes del GGC, para posteriormente lavar los estímulos a través del canal horizontal que conecta las cámaras de manera controlada. De esta manera se pueden generar pulsos de estímulo en las células con frecuencias y duración de estímulo y lavado controlados.

El GGC es un componente activo en el dispositivo, lo que significa que todo el tiempo deben estar fluyendo las dos soluciones para que se forme el gradiente deseado. Como se pretende estimular a las células con las soluciones provenientes del GGC de manera controlada, es necesario evitar estimular las cámaras en momentos indeseados. Por esto, se colocó un canal lateral en cada cámara, que funciona como canal de drenado para el GGC (acercamiento en **Figura 4.2**). Cuando se está fluyendo el GGC para estabilizarlo, las soluciones fluyen a través del canal de drenado, y una vez que se quieren estimular a las células, lo hacen a través de las cámaras. La dirección del flujo del GGC se controla con microválvulas, que además permiten bloquear por completo el paso de las soluciones del GGC para hacer los lavados a las cámaras. En la **Figura 4.2** se muestra un acercamiento a una de las cámaras del dispositivo, donde se muestran las válvulas que controlan el paso de soluciones para cada paso del experimento.

4.1.1.2 Dispositivo de PDMS y prueba con colorantes

En la **Figura 4.3** se muestra una micrografía del dispositivo microfluídico de polidimetilsiloxano (PDMS), fabricado por fotolitografía suave. Como puede apreciarse, el dispositivo es una fiel réplica del diseño, lo que indica que ambos procesos de fabricación, el de los moldes por fotolitografía y el de las réplicas de PDMS por litografía suave, tuvieron buenos resultados.

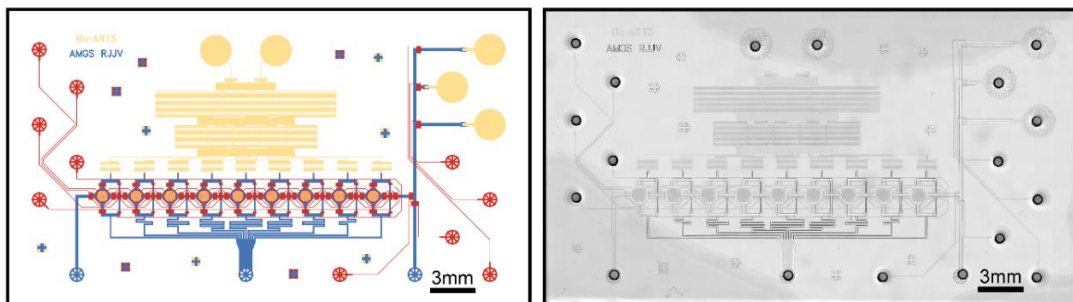


Fig. 4.3 Micrografía del dispositivo de PDMS junto al diseño original.

En la **Figura 4.4** se muestra una fotografía del dispositivo al ser probado con colorantes vegetales. Aunque estos resultados son puramente cualitativos, se puede observar claramente que los distintos colorantes se mantienen aislados unos de otros en los canales respectivos. Las cámaras se mantienen selladas con agua destilada mientras las soluciones provenientes del GGC fluyen por los canales de drenado. El colorante morado (visiblemente gris oscuro) se mantiene sólo en el canal lateral por el cual se inyectan las células, sin mezclarse con el agua destilada. Por último, en las diferentes secciones de los canales que conforman el módulo del GGC, es claramente visible el gradiente de colores que se forma, a través de distintas tonalidades de verde. Con estos resultados se comprueba que dos componentes principales funcionan en el dispositivo: las microválvulas y el GGC. El otro componente son los micropozos para capturar células, que se probó más adelante.

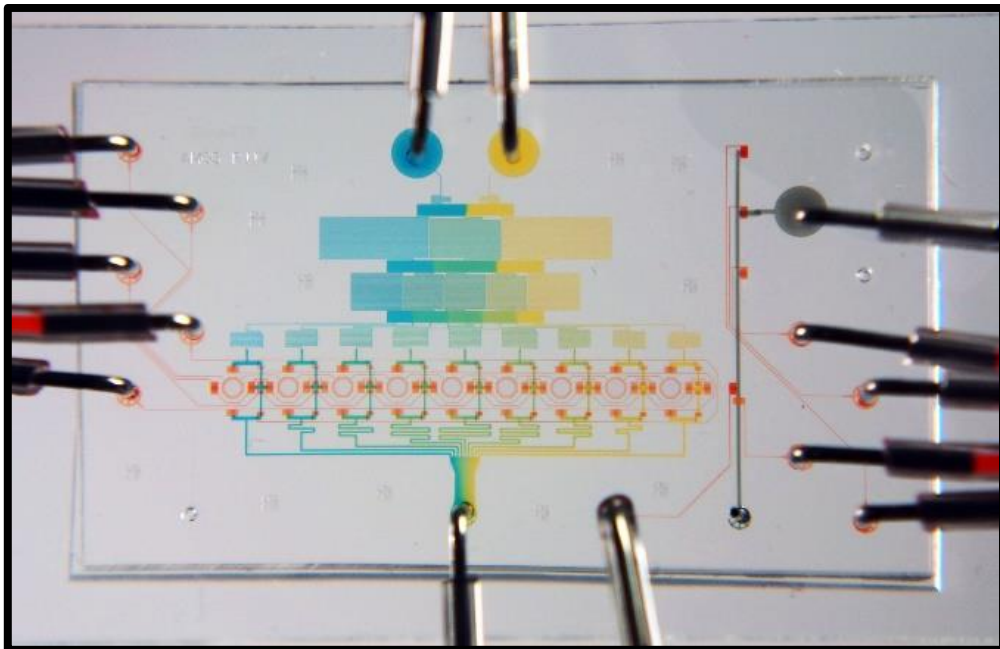


Fig. 4.4 Prueba del dispositivo microfluídico de PDMS con colorantes vegetales.

4.1.2 Caracterización del dispositivo microfluídico con moléculas fluorescentes

4.1.2.1 Generador de gradientes de concentración

Las soluciones fluorescentes se inyectaron a través de las entradas del GGC hacia las cámaras de micropozos. Las soluciones se fluyeron a flujos volumétricos de 0.5 a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ en cada entrada, con pasos de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. El flujo total inyectado al dispositivo fue en el rango de 1 a 6 $\mu\text{L}/\text{min}$. En la **Figura 4.5** se muestran micrografías tomadas a todas las cámaras con las soluciones fluorescentes, para cada canal de fluorescencia, junto con una fotografía al dispositivo con colorantes como referencia. En esta figura puede observarse a simple vista la diferencia en fluorescencia en cada cámara.

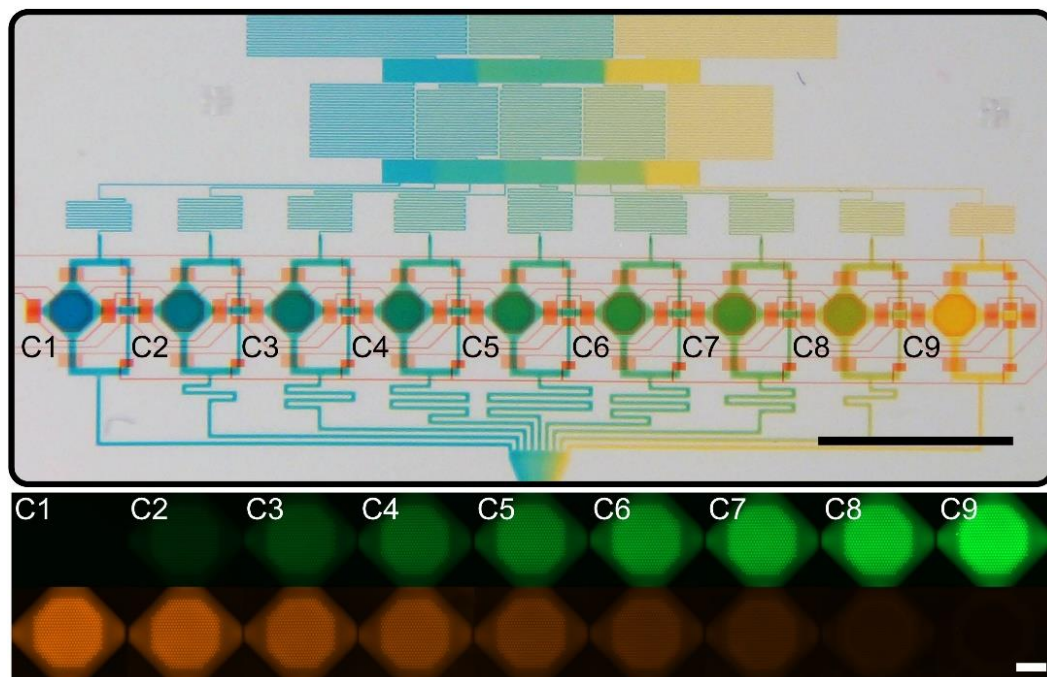


Fig. 4.5 Micrografías a las cámaras mientras se formaba el gradiente de concentración con FITC y Dextran-rodamina. La fotografía del dispositivo con colorantes muestra la posición de cada cámara. Barras de escala, 4 mm para la imagen superior y 200 μm para la inferior.

Se tomaron imágenes en cada cámara con los dos canales de fluorescencia para cada uno de los flujos volumétricos a los que se fluyeron las soluciones. Se midió el nivel de fluorescencia en cada cámara y se graficaron los resultados para cada flujo volumétrico. En la **Figura 4.6** se muestran las

gráficas obtenidas para el canal de Dextran-rodamina. Se puede observar que el perfil lineal de fluorescencia se mantiene para todos los casos, aunque hay pequeñas variaciones en el nivel de fluorescencia para las cámaras centrales arriba de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Aun considerando estas variaciones, al hacer un ajuste lineal de los datos, se obtiene una r^2 de 0.99 para los seis casos.

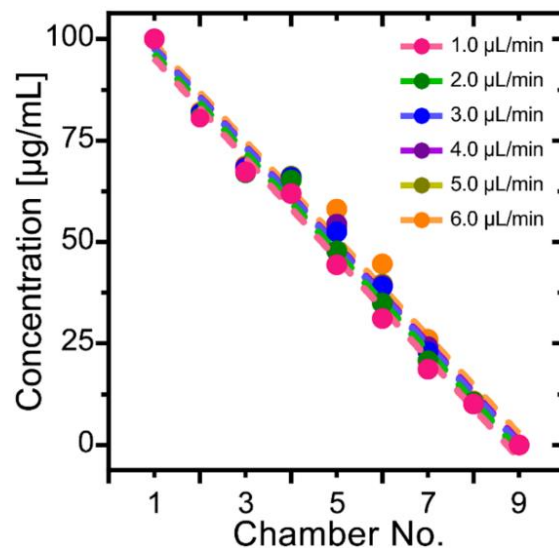


Fig. 4.6 Gráfica del perfil de concentración de Dextran-rodamina, determinado a través del nivel de fluorescencia, obtenido en el dispositivo al medir cada cámara durante la formación del gradiente de concentración a distintos flujos volumétricos. $r^2 = 0.99$ para todos los casos.

Durante estos experimentos, cuando se utilizaron flujos volumétricos totales arriba de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ el dispositivo se despegaba entre las capas de micropozos y flujo. Aunque no pasaba en todas las ocasiones, no hay manera de predecir esto. Las causas pueden ser una alineación no adecuada, o debido a que la presión aplicada en el dispositivo supera la fuerza con la que ambas capas se adhieren durante la fabricación. Para evitar que esto ocurriera durante los experimentos con células, se decidió utilizar un flujo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ para los experimentos restantes. La **Figura 4.7** muestra el perfil de concentración (a partir del nivel de fluorescencia) para cada solución inyectada a un flujo total de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ en el dispositivo, en la que se observa que el gradiente de concentración tiene un perfil lineal para ambas moléculas, con $r^2 = 0.99$.

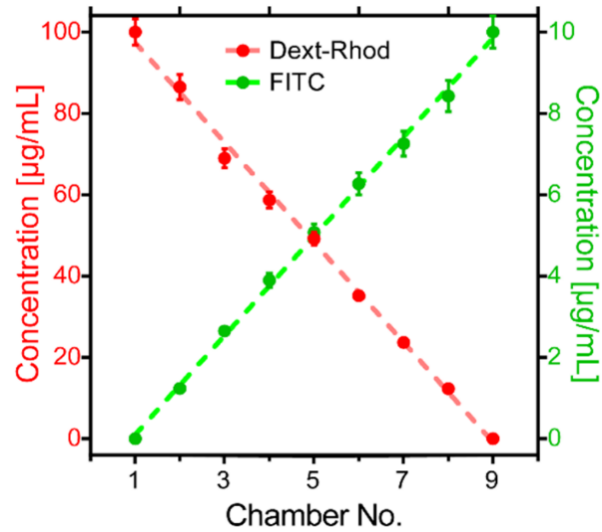


Fig. 4.7 Perfil de concentración en el dispositivo para las dos soluciones inyectadas a un flujo de $2 \mu\text{L/min}$.

4.1.2.2 Generación de pulsos en las cámaras de micropozos

Una vez caracterizado el GGC, se probó la capacidad del dispositivo para generar señales periódicas en las cámaras. Para esto, se utilizó una solución de Dextran-rodamina inyectada en una de las entradas del GGC para simular la solución estímulo llegando a las células. En la otra entrada del GGC se inyectó PBS 1X, al igual que en la entrada para lavado; con esto, en cada cámara se tendrá una intensidad distinta de fluorescencia, lo que permite medir el perfil de fluorescencia por cámara a lo largo del tiempo. Con lo anterior, se pretende determinar si al generar los pulsos en las cámaras, el perfil lineal del GGC se mantiene constante.

Para generar las señales periódicas en las cámaras, se activa el módulo de pulsos de la interfaz de LabVIEW. Como se mencionó, se pueden elegir el número de pulsos, así como la duración del estímulo, lavado y el tiempo de purga. Este último se refiere al tiempo que las soluciones provenientes del GGC fluyen a través del canal de drenado, en lugar de pasar por las cámaras. Al activar el modo de pulsos en la interfaz, las microválvulas se activan automáticamente en una secuencia específica. La **Figura 4.8** ejemplifica la secuencia; justo antes de empezar a estimular, las cámaras se sellan para

evitar que las células se estimulen antes de tiempo. En el tiempo $t = 1$, las soluciones del GGC fluyen a través del canal de drenado para estabilizar el gradiente de concentración (tiempo de purga). En el tiempo $t = 2$, se bloquea el canal de drenado y las soluciones del GGC fluyen ahora a través de las cámaras hasta que se llenan por completo ($t = 3$, tiempo de estímulo). Cuando se termina el estímulo, se bloquea por completo el paso de las soluciones del GGC activando las microválvulas respectivas y se lavan las cámaras por el canal horizontal, de derecha a izquierda ($t = 4$, tiempo de lavado). Este ciclo se repite el número determinado de pulsos que se haya programado en la interfaz. Cuando se termina el último pulso, el sistema regresa al tiempo $t = 1$.

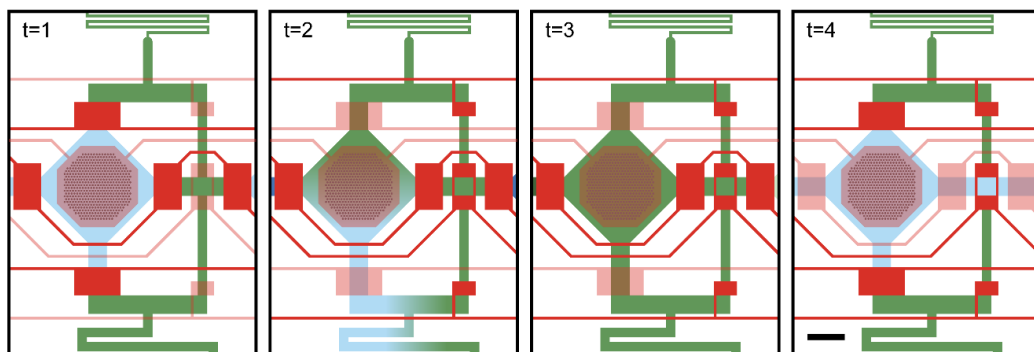


Fig. 4.8 Pasos de activación de válvulas para generar pulsos en las cámaras. Barra de escala = 500 μm .

Para determinar el tiempo necesario para intercambiar soluciones dentro de las cámaras, lo que nos dará la frecuencia máxima de los pulsos generados, se llenó un dispositivo con PBS 1X por completo, para después crear un gradiente de Dextran-rodamina y PBS 1X a través del GGC. Una vez estabilizado el gradiente, se fluyeron las soluciones del GGC por las cámaras tomando un video en la cámara 1 del proceso de intercambio de soluciones dentro de esta. Se repitió el mismo procedimiento para el paso de lavado.

El nivel de fluorescencia durante todo el video se midió en distintos micropozos, localizados en distintas regiones dentro de la cámara. Se graficó el nivel de fluorescencia de los micropozos en función del tiempo, además del promedio de intensidad para todos los micropozos medidos para estímulo y

lavado. Dichas gráficas pueden observarse la **Figura 4.9**, al igual que una micrografía mostrando los micropozos medidos para las gráficas.

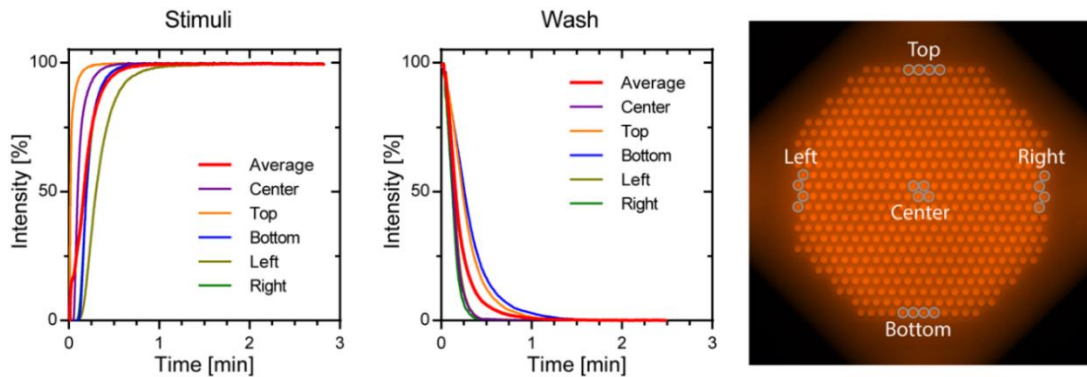


Fig. 4.9 Gráficas del tiempo de intercambio de soluciones en las cámaras a $2 \mu\text{L}/\text{min}$, y micrografía mostrando la posición de los pozos medidos.

En las gráficas se observa que sí hay una diferencia en el tiempo de intercambio completo de soluciones debido a la posición de los micropozos dentro de la cámara. En el paso de estímulo, las soluciones fluyen de arriba hacia abajo, por lo que los primeros pozos en intercambiar completamente su solución son los superiores; en el paso de lavado, las soluciones viajan de derecha a izquierda, por lo que los pozos de la derecha son los primeros en lavarse. Sin embargo, aunque existe esta diferencia en el tiempo de intercambio completo de las soluciones, puede observarse que el tiempo en el que se inicia este intercambio es muy parecido en todos. Para el paso de estímulo, esto nos indica que a las células les comenzará a llegar estímulo casi por igual a todas las cámaras, aunque se establezca la concentración del mismo segundos después. Teniendo esto en cuenta, podemos utilizar el tiempo promedio como el tiempo de intercambio de soluciones en las cámaras. En este caso, se considera que se ambos pasos deben tener una duración de por lo menos 30 s.

Posteriormente, se realizó la caracterización de los pulsos en las cámaras realizando intercambio de soluciones con la misma metodología explicada arriba, pero con pulsos con duración de estímulo y lavado fijos. En la **Figura 4.10** se muestra la secuencia de pasos que se realizan en este experimento

con la ayuda de las microválvulas. Esto se explicó con más detalle en la sección 1.3.2.

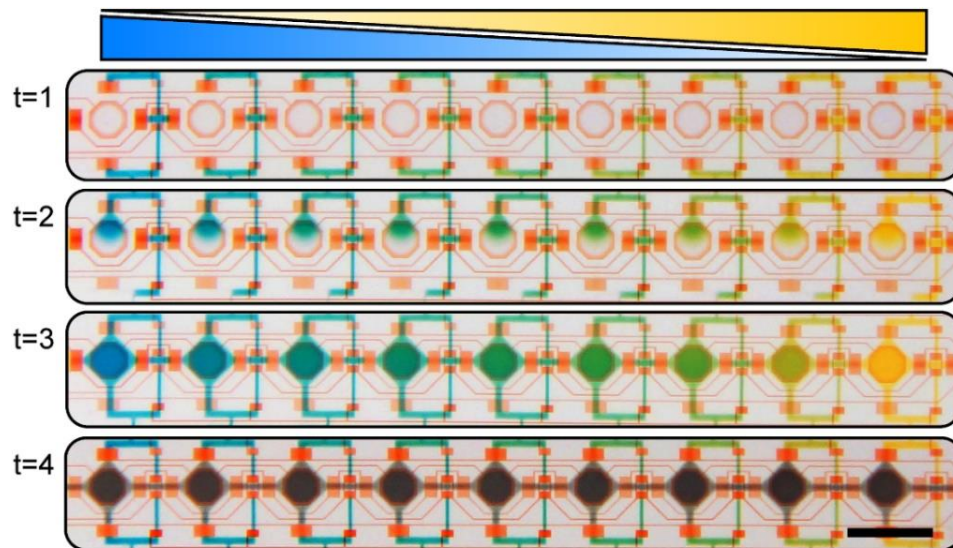


Fig. 4.10 Pasos para la generación de un pulso en el dispositivo. Para n pulsos periódicos, se repite el proceso n veces.

Se generaron pulsos a cuatro frecuencias distintas, 6.7, 8.3, 11.1 y 33.3 mHz, donde el tiempo de estímulo y lavado era constante. Mientras se generaban los pulsos se grabaron videos de 5 min en cada una de las cámaras. Se analizó el nivel de fluorescencia en cada cámara a partir de los videos obtenidos y se graficaron juntos los resultados de todas las cámaras a una misma frecuencia. Además, se generó una gráfica del perfil de fluorescencia obtenido para cada frecuencia, para determinar si el gradiente de concentraciones se generaba correctamente durante la formación de los pulsos. Para generar estas gráficas se tomaron datos de cada curva en un mismo instante de tiempo para cada frecuencia, donde el nivel de fluorescencia había llegado a un estado estable. Para el caso de 33.3 mHz, no existe tal estado estable, por lo que se realizó la gráfica a partir de datos tomados en el punto de intensidad máxima para la concentración más alta.

Las gráficas de la generación de pulsos y los perfiles de intensidad pueden observarse en la **Figura 4.11**. Cuando se generan pulsos con una menor frecuencia, el sistema es más estable, mostrando señales de fluorescencia

más suaves y repetibles. Cuando la frecuencia aumenta, las curvas tienden a ser menos suaves y presentan pequeñas variaciones en la intensidad de fluorescencia durante el tiempo de estímulo. Esto puede deberse a la estabilización del GGC. Antes de cada estímulo, las soluciones del GGC se fluyen unos segundos por el canal de drenado, para eliminar un poco de las soluciones que pudieron haberse mezclado durante el tiempo de estímulo. Probablemente, para generar señales más suaves se necesiten tiempos de drenado más largos, como en el caso de 6.7 mHz. Para el caso de 33.3 mHz, las curvas de los pulsos muestran que el gradiente no se forma adecuadamente, probablemente por los cortos tiempos de estímulo y lavado. Esto era de esperarse, ya que el tiempo de estímulo y lavado son de sólo 15 s.

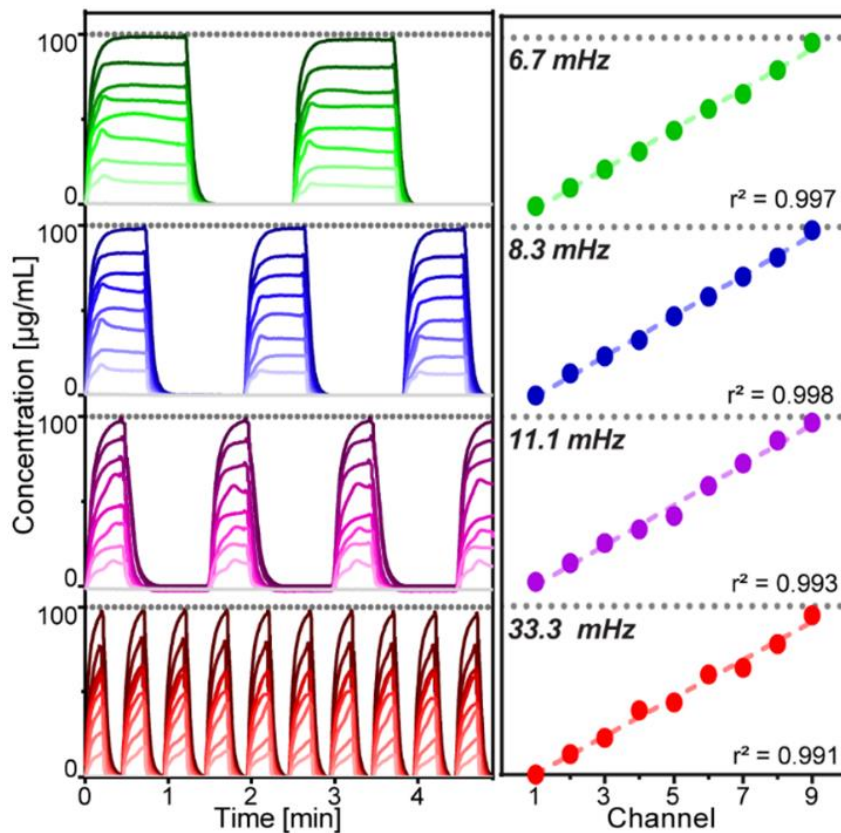


Fig. 4.11 Gráficas de la generación de pulsos a través de las cámaras con una solución fluorescente a diferentes frecuencias. Las gráficas de la derecha muestran el perfil de fluorescencia obtenido al medir la intensidad en todas las cámaras para el paso de estímulo.

Todas las gráficas de los perfiles de fluorescencia en las cámaras muestran un perfil lineal, incluso la de 33.3 mHz. Este resultado no era esperado debido a las observaciones que se mencionaron anteriormente. Aparentemente, de manera cuantitativa, las señales son lo suficientemente diferentes para generar un gradiente de concentraciones con un perfil lineal. Independientemente de esto, para este trabajo no se consideró adecuado utilizar frecuencias arriba de 30 mHz, ya que no se observa que las señales químicas generadas tengan el perfil esperado.

4.1.2.3 Simulaciones de estrés de corte

La última parte de la caracterización del dispositivo son las simulaciones del estrés de corte ejercido sobre las células dentro de los micropozos. Estas simulaciones se realizaron en COMSOL Multiphysics a partir de un diseño realizado en AutoCAD con cuatro pozos con células redondas atrapadas en distintas posiciones de los pozos. Se simuló un flujo constante que va de 0.11 a 0.67 $\mu\text{L}/\text{min}$, que es el flujo en una sola cámara (el flujo total va de 1 a 6 $\mu\text{L}/\text{min}$, repartido de manera equitativa en las nueve cámaras del dispositivo). Se simuló el estrés de corte ejercido en todas las superficies del canal, micropozos y célula y se calculó en los puntos de las células donde era más alto.

En la **Figura 4.12** se muestran los resultados de la simulación realizada para cuatro micropozos, cada uno con una célula atrapada en una posición distinta: al fondo del micropozo, en la superficie, al centro y en la esquina del mismo. El color indica el nivel de estrés de corte en dPa ($1 \text{ dPa} = 1 \text{ dyn}/\text{cm}^2$, unidades normalmente utilizadas). En la **Tabla 4.1** se muestran los valores más altos medidos de estrés de corte en las células para cada posición en el micropozo. El estrés de corte es mayor en la parte superior de las células, donde están más expuestas al flujo.

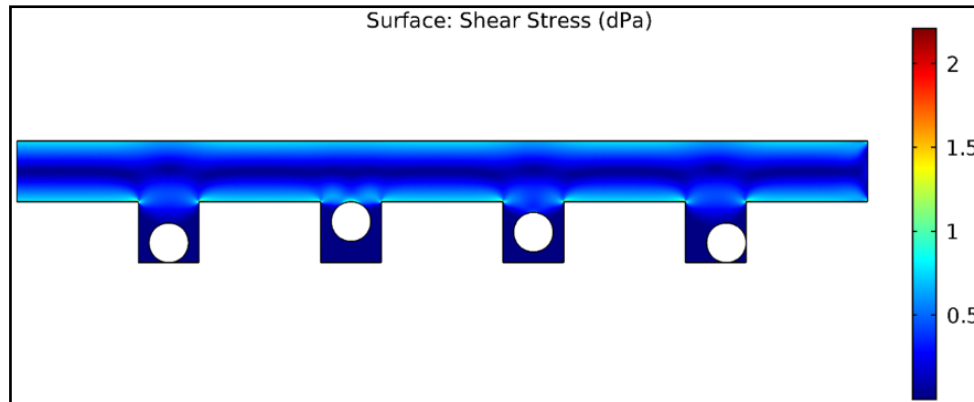


Fig. 4.12 Resultados de la simulación del nivel de estrés de corte en células atrapadas en diferentes posiciones dentro de los micropozos ($1 \text{ dPa} = 1 \text{ dyn/cm}^2$).

Tabla 4.1 Estrés de corte máximo al que son sometidas las células en los micropozos a diferentes flujos volumétricos para la simulación mostrada en la **Figura 4.12**, para cada posición en el micropozo.

Flujo volumétrico total [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Flujo volumétrico en cada cámara [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Estrés de corte [dyn/cm^2]			
		Al fondo	En la superficie	Al centro	En la esquina
1.0	0.111	0.064	0.583	0.276	0.051
2.0	0.222	0.128	1.164	0.551	0.102
3.0	0.333	0.192	1.748	0.826	0.153
4.0	0.444	0.256	2.330	1.102	0.204
5.0	0.556	0.321	2.916	1.377	0.255
6.0	0.667	0.385	3.467	1.655	0.307

De los datos de la simulación, el valor de estrés de corte más alto se obtiene cuando la célula está en la superficie del pozo, con un valor de $3.467 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ a un flujo total de $6 \mu\text{L}/\text{min}$. Esta posición no es probable en un estado estático, ya que se espera que las células estén en reposo en el fondo del micropozo, pero durante los experimentos subsecuentes se observó que las células pueden girar dentro del micropozo al ser expuestas a un flujo, por lo que su posición varía entre los cuatro estados simulados. En los experimentos realizados se utiliza un flujo de $2 \mu\text{L}/\text{min}$, por lo que nuestras células estarán sometidas a un estrés de corte que va de los 0.102 a $1.164 \text{ dyn}/\text{cm}^2$.

Como se mencionó, distintos tipos celulares pueden estar sometidos a distintos niveles de estrés de corte en el cuerpo. Para no interferir con

procesos celulares basales y generar una respuesta en las células debida al flujo, es importante mantener el nivel de estrés de corte tan bajo como sea posible. Aunque es difícil definir un nivel de estrés de corte alto o bajo, objetivamente, Chingozha [33] propone que el estrés de corte debe estar por debajo de 10 dyn/cm^2 para considerarse bajo, mientras que Malek [110] propone que debe ser menor a 4 dyn/cm^2 , comparado con el estrés de corte a nivel arterial ($>15 \text{ dyn/cm}^2$). Considerando los dos umbrales mencionados, el nivel de estrés de corte en nuestro dispositivo puede considerarse como bajo.

4.1.3 Estudios de señalización celular

La caracterización del dispositivo nos permite entender su comportamiento y los parámetros dentro de los cuales podemos operarlo de manera confiable. Con este conocimiento, se realizaron experimentos sobre una línea celular modelo, a manera de prueba de concepto del dispositivo. La intención de estos experimentos es demostrar la capacidad del dispositivo microfluídico integrado para servir como una herramienta de análisis de cientos de células individuales bajo distintas condiciones de manera simple y con poco manejo de los reactivos químicos a utilizar.

Para esta parte del trabajo, se decidió trabajar con una línea celular de células embrionarias de riñón humano (HEK-293). Estas células son ampliamente utilizadas como modelo para estudios de señalización celular, ya que su manejo y cultivo es sencillo y son fácilmente transfectables con ADN externo [111]. Además, es sabido que estas células expresan de manera endógena el receptor muscarínico M3 [112], que al ser activado desencadena la vía del inositol trifosfato (IP3), que termina en la liberación de calcio del retículo endoplasmático al citosol de las células. Como la vía del IP3 es un proceso celular dinámico, el usar estas células nos permite probar la funcionalidad de nuestra plataforma microfluídica para los fines antes mencionados.

4.1.3.1 Captura de células en micropozos

Para los experimentos de señalización celular se atraparon células HEK-293 en los micropozos. En la **Figura 4.13** se muestran micrografías en el canal de campo claro y fluorescencia de una cámara con células HEK-293 atrapadas en los micropozos. Para atrapar estas células se realizaron pasos de sedimentación (**Figura 3.4**, sección 1.3.3), seguidos por un lavado para retirar el exceso de células. Como se puede observar, aunque no todos los micropozos se llenan, la captura de células es alta. Aunque se trató de caracterizar este paso, se notó que la cantidad de células atrapadas depende del tipo de células. Jiménez-Valdés [29] reporta que consigue un 80% de ocupación después de los ciclos de sedimentación; sin embargo, sus pozos tienen entre 1-4 células atrapadas. Para este trabajo, se notó que las células HEK-293, al ser células adherentes, complican su captura en los pozos, ya que pueden adherirse entre ellas antes de entrar a los pozos. En distintos experimentos con los mismos protocolos de captura de células se podía observar una ocupación del 40%, mientras que en otros del 90%. Estas diferencias se atribuyen al tipo celular, por lo que en los experimentos consecuentes se considera adecuado cualquier número de células que se haya capturado, siempre que fuera >100 células atrapadas, para mantener una relevancia biológica en términos estadísticos [30].

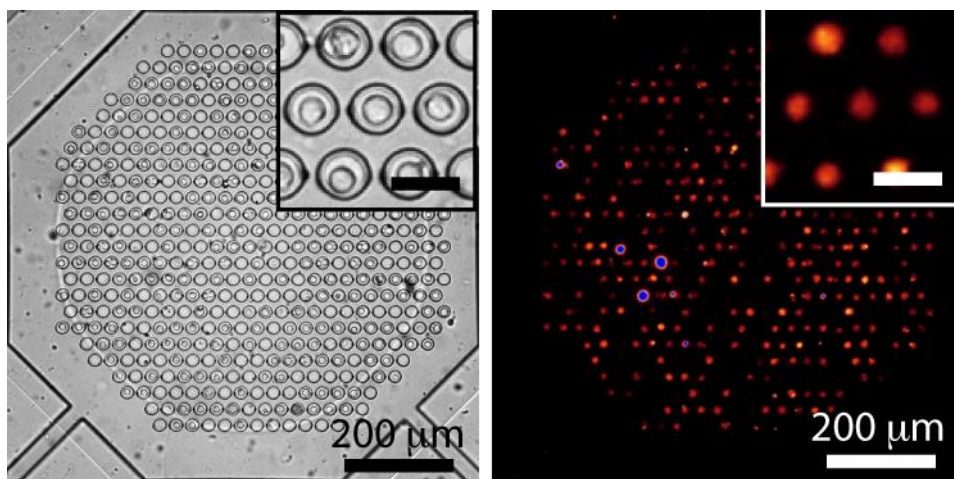


Fig. 4.13 Micrografías en campo claro y canal de fluorescencia verde (mostrado en un pseudocolor) mostrando la captura de células en los micropozos.

4.1.3.2 Marcaje con Calceína AM

El generador de gradientes de concentración (GGC) fue probado con moléculas fluorescentes, mostrando su capacidad para formar gradientes de concentración de moléculas fluorescentes. Sin embargo, la mayoría de los estudios de señalización se hacen con estímulos que no exhiben fluorescencia. Para probar que el GGC funcionara con una molécula empleada regularmente en estudios biológicos, se realizó un experimento en el que células HEK-293 fueron expuestas a distintas concentraciones de Calceína AM (de 0 a 3 μM) a través del GGC.

La Calceína AM es un marcador fluorescente normalmente utilizado como indicador de viabilidad en las células, ya que necesita de las esterasas propias de las células para emitir fluorescencia. La Calceína es una molécula cargada negativamente que emite fluorescencia verde al ser excitada por luz azul (picos de excitación y emisión, 485, y 520 nm, respectivamente); esta molécula no es permeable a la membrana plasmática. Para utilizarla como un marcador de viabilidad, se le une un éster acetoximetil (AM), el cual neutraliza su carga y la hace una molécula no fluorescente, además de conferirle la propiedad de ser permeable a la membrana plasmática. Cuando las células son incubadas en presencia de Calceína AM, esta entra al citoplasma; una vez dentro, las esterasas endógenas de la célula rompen la unión entre la Calceína y el éster AM, lo que le permite a la Calceína emitir fluorescencia de nuevo. En este estado, la Calceína no puede salir de la célula, por lo que la emisión de fluorescencia se ve limitada al volumen de la célula. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de esterasas endógenas presentes en cada célula, además de a la concentración de Calceína AM a la que son sometidas. La separación de la Calceína y el éster AM es un proceso que requiere que la célula sea metabólicamente activa, por lo que esta molécula sirve como marcador de viabilidad.

En la **Figura 4.14** muestra los resultados de exponer a células HEK-293 a Calceína AM (de 0 a 3 μM) a través del GGC. La gráfica muestra el nivel de

intensidad de fluorescencia promedio para todas las células de cada cámara a lo largo del tiempo. El nivel de fluorescencia de las células va incrementando de manera gradual en todas las cámaras en función al tiempo y a la concentración de Calceína AM a la que son expuestas. La cámara expuesta a una concentración 0 de Calceína AM no mostró señal de fluorescencia durante todo el experimento.

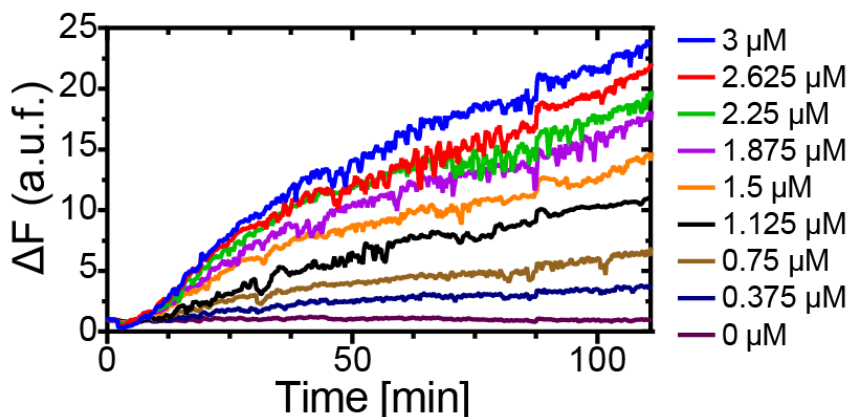


Fig. 4.14 Nivel de fluorescencia promedio para cada una de las cámaras durante la exposición de células HEK-293 a distintas concentraciones de Calceína AM.

A manera de comparación, la **Figura 4.15** muestran las gráficas de intensidad de fluorescencia en función del tiempo para cada célula en las distintas cámaras. Para cada gráfica se agregó un histograma del nivel de intensidad de fluorescencia en el tiempo final que presentan todas las células de una misma cámara. Los datos de las gráficas son también mostrados en forma de mapa de calor, donde el nivel de fluorescencia de cada célula en el tiempo puede apreciarse más claramente. Estos mapas de calor están normalizados al nivel de fluorescencia de la cámara con la mayor concentración, que presenta el nivel de intensidad de fluorescencia más alto.

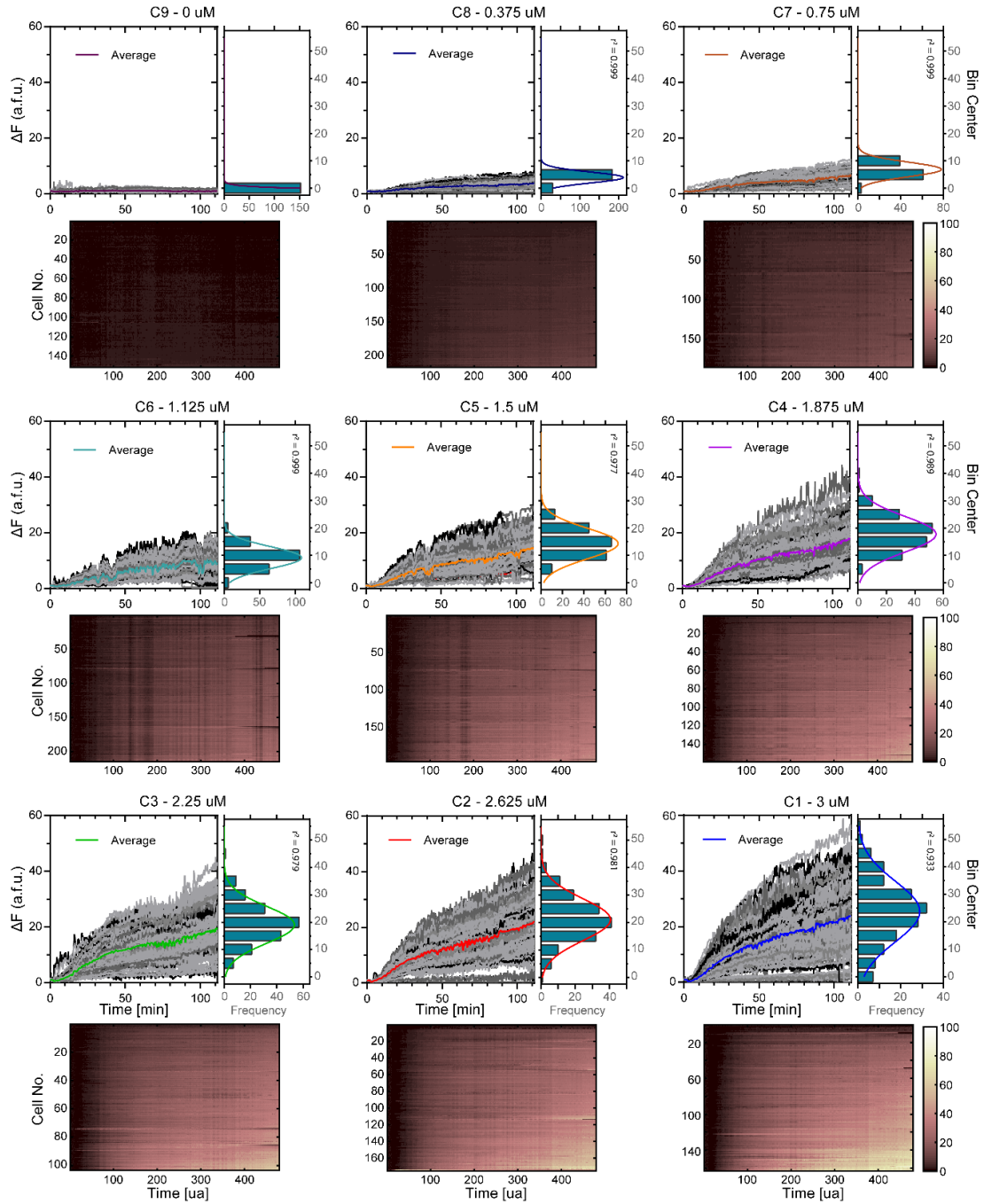


Fig. 4.15 Respuesta de distintos grupos de células individuales ante un estímulo de Calceína AM a distintas concentraciones. Para cada cámara con una concentración distinta de Calceína AM, se muestran las gráficas de la respuesta temporal de células individuales (líneas grises) contra la respuesta promedio de la cámara (líneas de color), además de un histograma de tiempo final con un ajuste gaussiano (**Tabla 4.2**). También se muestra el mapa de calor con la intensidad de fluorescencia de cada célula durante todo el experimento.

Cuando se analiza la respuesta de las células individuales, se puede observar que existen diferencias significativas en respuesta de cada célula comparada con las células de la misma cámara; el histograma de tiempo final mostró una distribución Gaussiana de los datos (**Tabla 4.2**), lo que era de esperarse, pero que no siempre es posible medir con otros métodos experimentales. Los resultados de la respuesta promedio de la célula nos muestran que la respuesta celular depende de la concentración de estímulo a la que es sometida, pero al analizar células únicas podemos observar que la respuesta de cada célula varía contra la del promedio. Para los resultados de todas las concentraciones se obtiene una clara variación en la intensidad de las células, mostrada en los histogramas. Esta heterogeneidad en la respuesta se ve incrementada a mayores concentraciones, donde la campana gaussiana del histograma se hace más ancha. La intensidad de fluorescencia está dada por la cantidad de esterasas endógenas en cada célula, por lo que estos resultados nos dan un indicio de que la cantidad de estas enzimas tiene una alta variabilidad dentro de células del mismo tipo.

Tabla 4.2 Parámetros obtenidos para el ajuste gaussiano para los histogramas de la **Figura 4.15**.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Amplitud	28.9	40.54	53.4	54.7	72.05	108.5	77.97	211.5	---
Media	23.75	21.07	19.05	17.75	14.33	9.177	6.864	3.93	---
Desviación estándar	11.04	7.633	6.728	6.479	5.548	3.979	2.662	1.988	---

Ecuación:
$$y = Amplitud \cdot e^{-0.5\left(\frac{x-Media}{DE}\right)^2}$$

Este experimento nos muestra la capacidad de análisis del dispositivo, donde se pudo demostrar que es posible realizar experimentos con cientos de células bajo distintas condiciones de manera paralela, y obtener información sobre la identidad de cada una de ellas, y muy importante, sin perder el rastro de las células que están siendo analizadas. Se analizaron 1,560 células por 110 min, adquiriendo imágenes cada ~13 s, lo que nos da un total de 750,720 datos.

Esta cantidad de datos se analizó de manera automática utilizando Matlab, hasta generar las gráficas y mapas de calor. Generar estos datos por métodos convencionales para este número de células es una tarea complicada, lo que soporta la idea de que la microfluídica es una herramienta poderosa para aplicaciones biológicas.

4.1.3.3 Dinámica de calcio intracelular en células HEK-293

En la introducción se explicó la vía de señalización del inositol trifosfato (IP3) y la temporalidad de este mecanismo. Con fines de estudiar la dinámica de calcio asociada a la activación de la vía de señalización del IP3, células HEK-293, que expresan el receptor muscarínico M3 en su membranas plasmáticas, fueron estimuladas con el agonista muscarínico carbacol [113] para inducir la activación de esta vía de señalización. La concentración de calcio citosólica fue monitoreada a través de un marcador fluorescente para calcio, Fluo-8 AM. Para que este marcador pueda emitir una señal de fluorescencia, debe ser separado del éster AM dentro de la célula. Además, al unirse a iones libres de calcio, su intensidad de fluorescencia incrementa considerablemente, lo que permite observar fluctuaciones de calcio intracelular.

Para estos experimentos, células HEK-293 fueron estimuladas con carbacol a través del GGC, con concentraciones de 0 a 10 μM . Se realizaron experimentos en dos condiciones distintas; en el primero, las células en las nueve cámaras del dispositivo microfluídico fueron estimuladas con cinco pulsos periódicos a 4.5 mHz, a través del GGC. Estos pulsos equivalen a señales periódicas de 220 s, con 50 s de estímulo y 170 s de lavado. Se eligió esta frecuencia para asegurar que todas las células sean estimuladas a través del GGC. En un segundo dispositivo microfluídico, las células de todas las cámaras fueron estimuladas con 10 pulsos a una frecuencia de 20 mHz. Estos pulsos equivalen a señales periódicas de 50 s, con 10 s de estímulo y 40 s de lavado. Se tomaron imágenes de cinco de las nueve cámaras cada 8.3 s, debido a las limitaciones del microscopio utilizado.

Para la primera condición (5 pulsos a 4.5 mHz), los resultados de la intensidad de fluorescencia de cada célula se muestran en la **Figura 4.16**. En estas graficas podemos observar la diferencia de respuesta que hay entre las células de la misma cámara, en cuanto a amplitud y temporalidad. En estas gráficas la principal característica que puede observarse es que las células que responden al estímulo lo hacen con la misma frecuencia a la que fueron estimuladas. Este efecto es más notorio a concentraciones más altas. Puede observarse que la amplitud en la respuesta es dependiente a la concentración. Para las cámaras a 1.25 y 3.75 μM se observa que la respuesta de las células va incrementando con cada pulso. En cambio, a 6.25 μM , la respuesta parece mantenerse con la misma amplitud a cada pulso. A 10 μM , la amplitud de la respuesta es mayor para el primer pulso, manteniéndose constante para los pulsos subsiguientes.

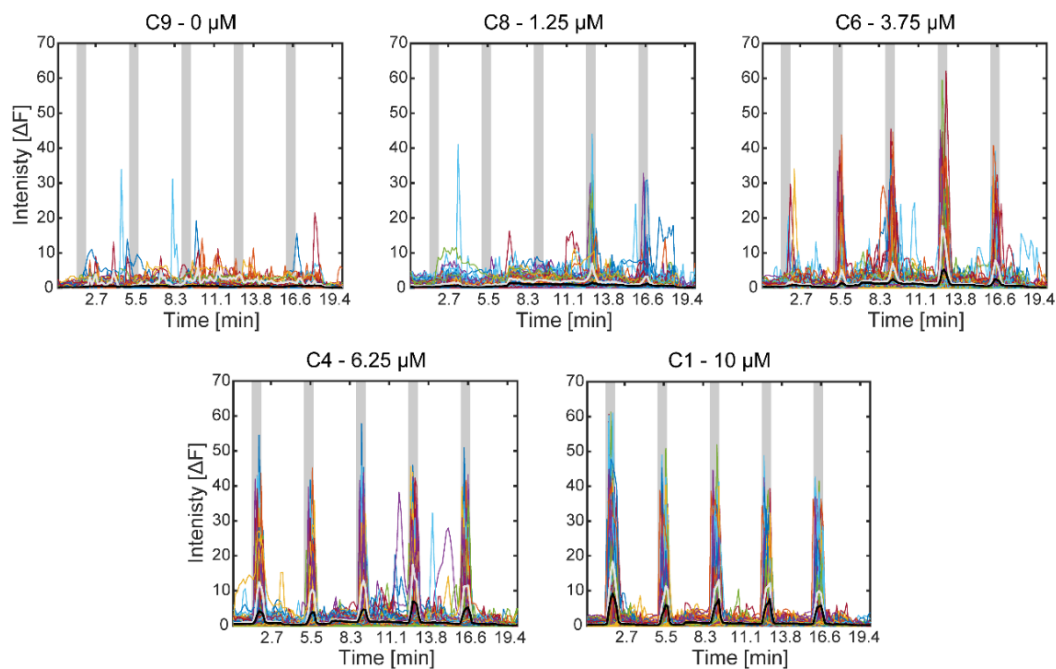


Fig. 4.16 Respuestas de las células individuales para cada cámara/concentración de estímulo, para el experimento a 4.5 mHz. Cada línea de color representa a una célula individual, mientras que la línea negra representa el promedio de todas las células en la cámara, y la blanca el promedio de las células que respondieron.

En la **Figura 4.17** se muestran las curvas de la respuesta promedio para las cinco cámaras del mismo experimento, además de los mapas de calor para cada una de ellas; los mapas de calor muestran la intensidad de fluorescencia de cada célula en función del tiempo. La **Figura 4.17a** muestra la comparación entre la respuesta promedio de todas las células y la respuesta promedio de sólo las células que respondieron. La tendencia de las curvas es muy similar en las cámaras con estímulo, sólo que con una amplitud mayor en los picos de las respuestas para la curva de las células responsivas. Esto se puede observar claramente en el mapa de calor, ya que un número considerable de células no responde, disminuyendo la amplitud de las curvas promedio de todas las células en las cámaras.

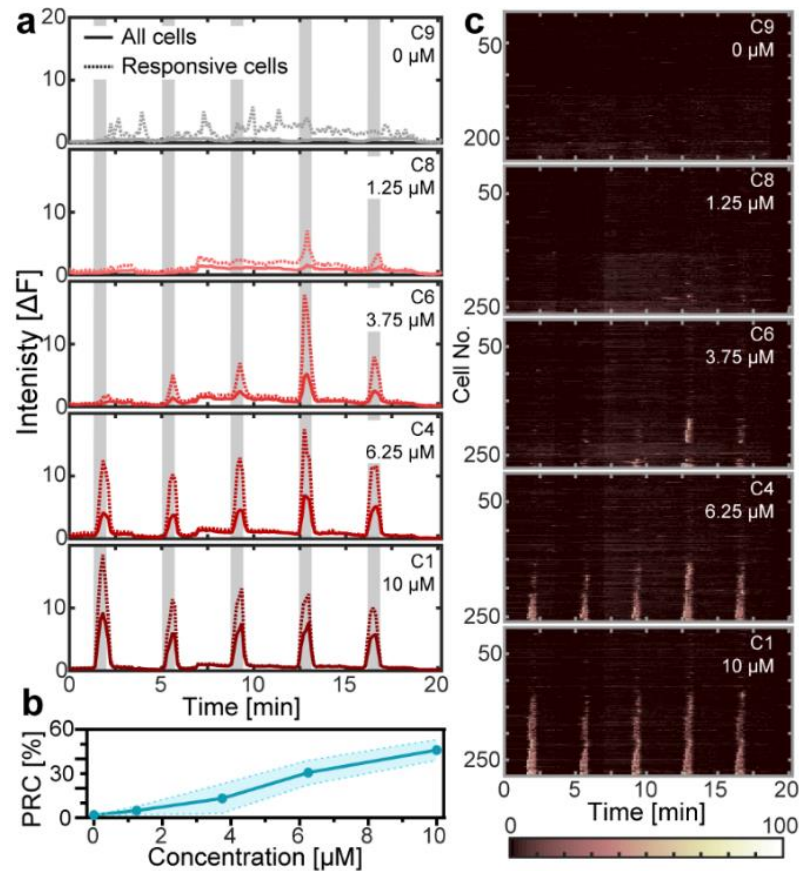


Fig. 4.17 Análisis del experimento a 4.5 mHz. (a) Respuesta promedio de todas las células de la cámara (línea sólida) y de las células responsivas (línea punteada). (b) Gráfica del número de células responsivas en función a la concentración. (c) Mapa de calor mostrando la respuesta de todas las células individuales para cada cámara.

La **Figura 4.17b** muestra una gráfica del número de células que respondió en función de la concentración. Puede observarse que con un estímulo de 1.25 μM , las células responden hasta el cuarto pulso, y sólo alrededor del 15% de las células responden. Para 3.75 μM alrededor del 25% de las células responden, a partir del 2° pulso. A las dos concentraciones más altas, 6.25 y 10 μM , responden alrededor del 30% y 50% de las células, respectivamente, mostrando una respuesta desde el primer pulso, con la misma frecuencia con la que son estimuladas. En la cámara a 0 μM , se observa que una o dos células muestran oscilaciones, pero no con la misma frecuencia de estimulación, por lo que pueden estar siendo activadas por alguna otra vía de señalización o algún proceso celular que involucre Ca^{2+} . En cuanto a las células que no responden en las cámaras con estímulo, es probable que necesiten una mayor concentración de carbacol para generar una respuesta, siguiendo la tendencia observada en la **Figura 4.17b**.

En la **Figura 4.18** se muestran las gráficas de las respuestas individuales de cada célula para el segundo experimento, donde las células fueron estimuladas a 20 mHz. Al igual que en los resultados anteriores, en estas gráficas puede observarse que las células responden con la misma frecuencia con la que son estimuladas, con amplitudes dependientes de la concentración a la que se estimulan, para la mayoría de los casos. Es observable que algunas células estimuladas con 0 μM (buffer) presentan una respuesta oscilatoria que parece tener una frecuencia igual a la frecuencia de estimulación. Aunque es un porcentaje muy bajo de células las que responden, ~4%, esto puede ser debido a un fenómeno reportado anteriormente, donde células HEK-293 presentan oscilaciones de calcio en respuesta a cambios abruptos en el medio, probablemente debida a mecanorreceptores, que son permeables a Ca^{2+} [114]. Esto es interesante, ya que no se observó a 4.5 mHz, lo que indicaría que a ciertas frecuencias estos receptores pueden activar la vía de señalización del Ca^{2+} .

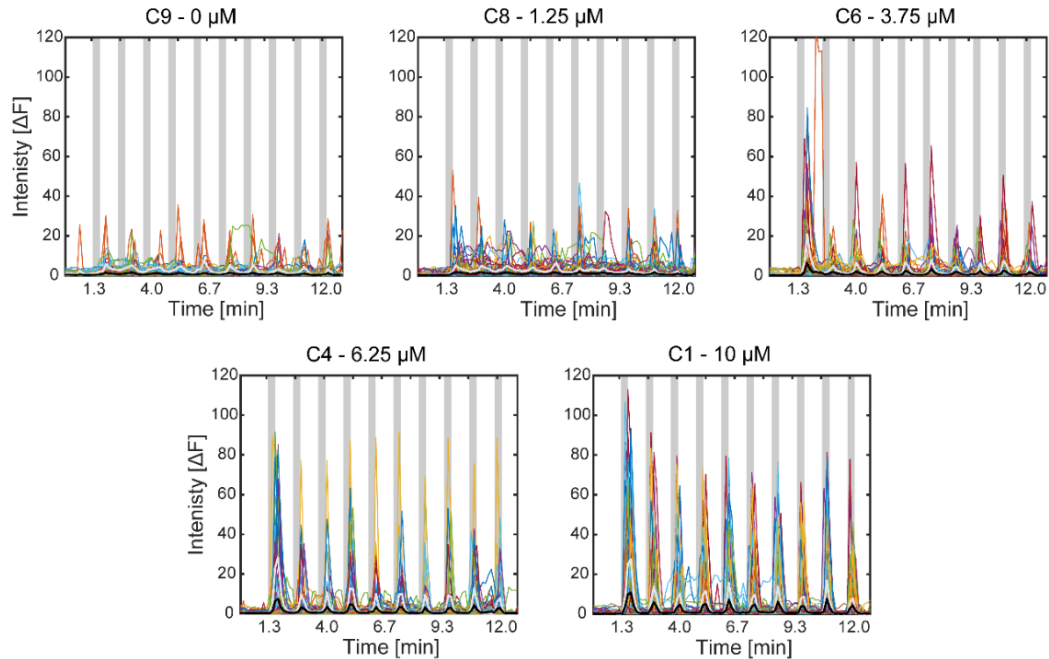


Fig. 4.18 Respuestas de las células individuales para cada cámara/concentración de estímulo, para el experimento a 20 mHz. Cada línea de color representa a una célula individual, mientras que la línea negra representa el promedio de todas las células en la cámara, y la blanca el promedio de las células que respondieron.

En la **Figura 4.19** se muestran las gráficas comparativas de las respuestas promedio de todas las células contra las de sólo las células que responden a los estímulos, los mapas de calor para cada cámara y las gráficas del número de células que responden en función de la concentración. Puede observarse que en todas las concentraciones hay una respuesta desde el primer pulso, por lo menos de algunas células, y que esta respuesta se mantiene con una frecuencia igual a la frecuencia de estimulación. En la cámara estimulada a 1.25 μM se observa que las células responden con una amplitud similar en respuesta a todos los pulsos. A 3.75, 6.25 y 10 μM la respuesta al primer pulso tiene una amplitud mayor, mientras que los nueve subsecuentes pulsos tienen una respuesta con una amplitud similar, menor a la del primer pulso.

En comparación con la respuesta a 4.5 mHz, en este experimento sólo responden $\sim 30\%$ de células a la mayor concentración, disminuyendo

linealmente conforme disminuye la concentración de estímulo. Esta última observación es igual para ambos experimentos.

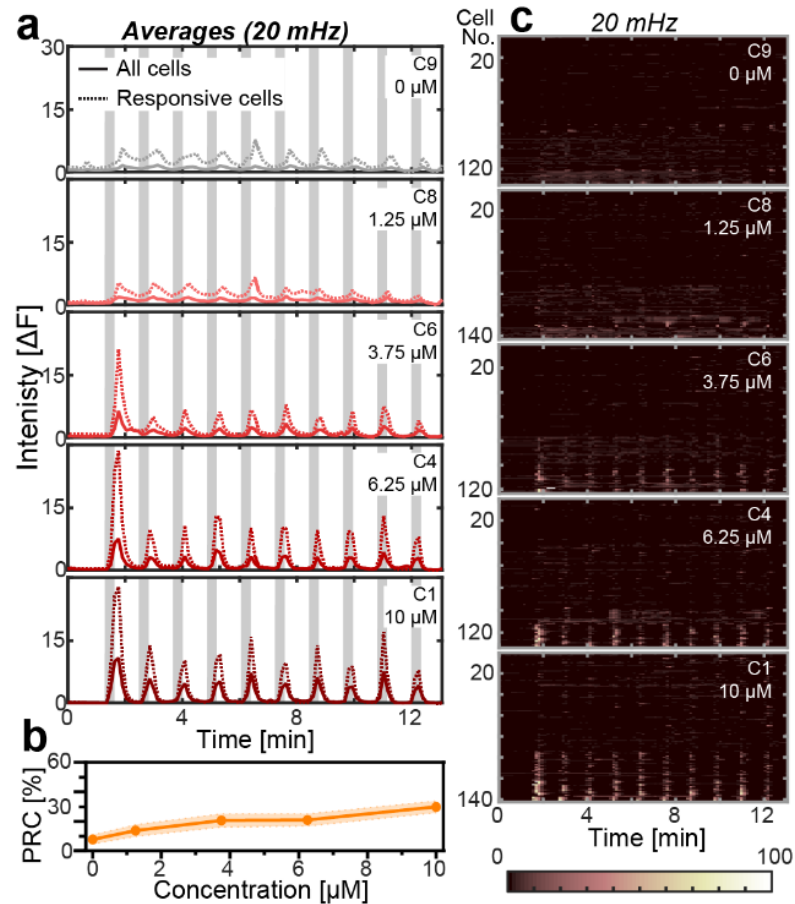


Fig. 4.19 Análisis del experimento a 20 mHz. (a) Respuesta promedio de todas las células de la cámara (línea sólida) y de las células responsivas (línea punteada). (b) Gráfica del número de células responsivas en función a la concentración. (c) Mapa de calor mostrando la respuesta de todas las células individuales para cada cámara.

Con los resultados obtenidos del dispositivo para señalización celular se pudieron determinar distintas ventajas y desventajas de la metodología empleada. Entre las más importantes están el uso del generador de gradientes de concentración. Esta herramienta es muy útil para realizar estudios donde se busca utilizar distintas concentraciones del mismo estímulo, como estudios dosis-respuesta de diversos fármacos, pero impone una limitación temporal. La dinámica alcanzada es relativamente lenta. No se pueden generar señales con una frecuencia arriba de 33.3 mHz (señales

periódicas de 30 s), lo cual puede ser necesario en estudios de vías rápidas, como la respuesta a receptores ionotrópicos. Además, limita a una estimulación igual en frecuencia a todas las cámaras, no permitiendo realizar estudios donde la temporalidad de las señales sea la condición cambiante entre una cámara y otra. Otra desventaja es el número de micropozos; aunque está en el rango de cientos de células (492 micropozos por cámara), cuando la eficiencia de captura no es alta, evidentemente, el número de células analizadas disminuye. Esto se puede solucionar cambiando el arreglo de micropozos y la forma de las cámaras.

4.2 Estudio de la dinámica de formación de NETs en el proceso de NETosis suicida

Los experimentos realizados para el estudio de la dinámica de calcio en células HEK-293 nos permitieron entender más a fondo la complejidad de las técnicas para el análisis de células individuales. El dispositivo presentado permite la interrogación de cientos de células individuales bajo estímulos dinámicos en el tiempo. Sin embargo, ciertas características del dispositivo lo hacen no ideal para el estudio del proceso de NETosis. Las más importantes tienen que ver con las limitaciones que el generador de gradientes de concentración impone en el dispositivo. Al utilizar el GGC, todas las cámaras deben ser estimuladas de manera simultánea, no permitiendo definir dinámicas temporales individuales como una condición experimental, lo cual es relevante en el estudio de NETosis. Una limitación más es el uso de la bomba de jeringas para inyectar las soluciones, ya que necesita el uso de cientos de microlitros de solución para poder emplearse eficientemente, además de ser un equipo extra por utilizar.

Considerando las limitaciones observadas, se hizo una modificación al dispositivo microfluídico empleado en la sección anterior, donde se eliminó el uso del GGC, se incrementó el número de micropozos por cámara para aumentar la estadística, y se eliminó una cámara por simplicidad técnica. Los resultados de la caracterización y experimentos realizados con este dispositivo se describen a continuación.

4.2.1 Dispositivo microfluídico

El nuevo diseño del dispositivo es mostrado en la **Figura 4.20**. En este diseño se eliminó el generador de gradientes de concentración (GGC). Las soluciones estímulo se diluyen fuera del dispositivo y se inyectan en las entradas respectivas. El dispositivo cuenta con ocho cámaras con 1050

micropozos cada una, más de lo doble que el dispositivo anterior. El arreglo de microválvulas permite estimular cada cámara de manera independiente, permitiendo generar señales distintas en cada cámara. Las tres microválvulas que forman la bomba peristáltica se encuentran en la última porción de los canales de salida de las cámaras.

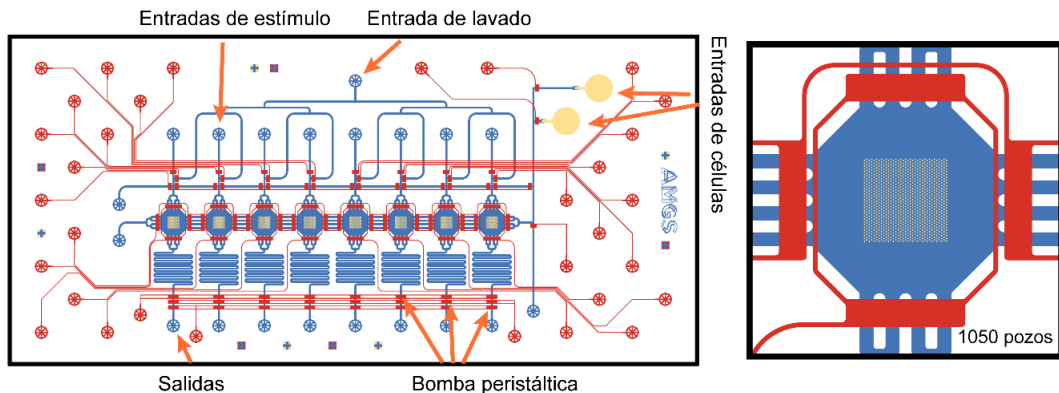


Fig. 4.20 Diseño del dispositivo microfluídico para estudios de NETosis.

La bomba peristáltica [109] es un arreglo de tres microválvulas consecutivas (**Figura 4.21**) en un mismo microcanal que se activan secuencialmente para inducir un flujo en el dispositivo microfluídico. Si consideramos que 1 es el estado presurizado de una microválvula y 0 es un estado depresurizado, la secuencia de activación de las válvulas es una serie de seis pasos que se repiten mientras se quiera tener un flujo. Esta secuencia es la siguiente: 101, 100, 110, 010, 011, 001. Al estar activadas siempre dos microválvulas, se direcciona el flujo hacia una sola dirección.

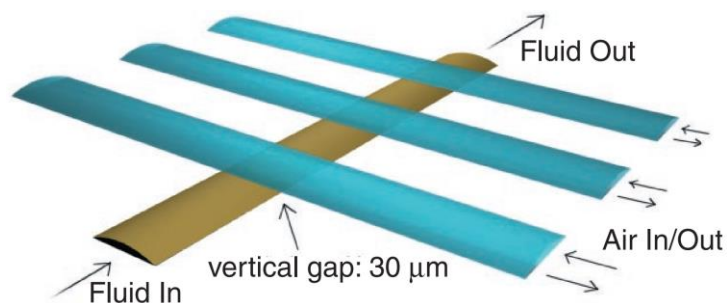


Fig. 4.21 Bomba peristáltica en un canal microfluídico. Las tres microválvulas (canales azules) se activan de manera secuencial para inducir un flujo en el canal de flujo (canal café). Tomada de [109].

Los moldes fabricados para este dispositivo pueden observarse en la **Figura 4.22**. Con cada set de moldes se pueden fabricar dos dispositivos simultáneamente.

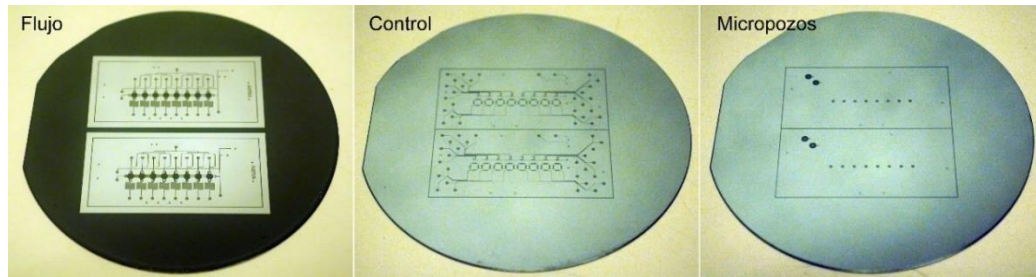


Fig. 4.22 Fotografías de los moldes fabricados por fotolitografía.

Comparado con el dispositivo utilizado para analizar células HEK-293, este dispositivo cuenta con una cámara menos, ocho en lugar de nueve, pero cuenta con más micropozos por cámara, 1,050 contra 492 del anterior. Esto da un total de 8,400 micropozos en total, contra 4,428 del dispositivo anterior. Aunque se redujo el número de cámaras, el número total de células que se pueden analizar casi se duplicó.

En la **Figura 4.23** se muestra una fotografía del dispositivo con colorantes vegetales. En la imagen se observa que las cámaras son totalmente independientes cuando se activan las microválvulas, permitiendo tener microentornos aislados.

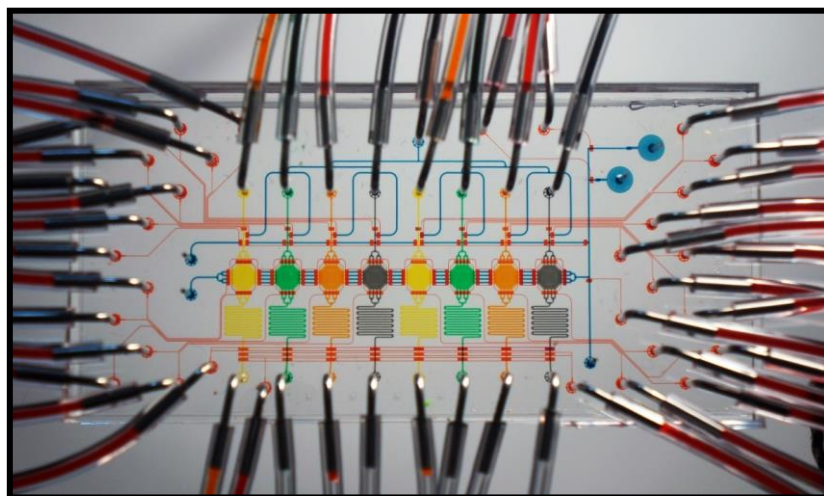


Fig. 4.23 Fotografía del dispositivo microfluídico con colorantes vegetales.

4.2.1 Caracterización del dispositivo

En el dispositivo se eliminó el uso de la bomba de jeringas para incorporar una bomba peristáltica. Esto se hizo para disminuir el uso de reactivos, ya que llenar una jeringa con el fármaco utilizado para estimular a las células requiere cientos de microlitros de solución, mientras que la bomba peristáltica puede funcionar con volúmenes en el rango de nanolitros [109].

Los videos adquiridos para caracterizar el tiempo de intercambio de las soluciones en las cámaras fueron analizados y los resultados se muestran en la **Figura 4.24**. Para ambos pasos, estímulo y lavado, puede observarse que utilizar pasos de 100 ms es más eficiente que 50 y 400 ms. Pasos de 400 ms conllevan a una activación más lenta de las microválvulas, lo que concuerda con los resultados de las gráficas. Para el caso de pasos de 50 ms se esperaba el efecto contrario; generar pasos más cortos debería generar flujos más altos. La razón por la que esto ocurre puede ser que el activar las válvulas con una frecuencia mayor no permita que el canal de flujo recupere su forma en el intervalo donde la válvula es desactivada. Si el canal de flujo no se recupera por completo, una menor cantidad de fluido será desplazada en cada paso, teniendo así el mismo efecto que activar las válvulas con una frecuencia mayor. Con estos resultados, se eligió utilizar 100 ms como el tiempo de cada paso para la bomba peristáltica.

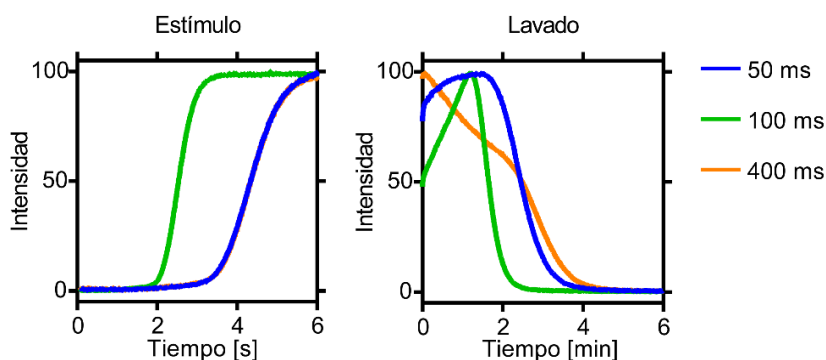


Fig. 4.24 Gráficas del tiempo de intercambio de soluciones con la bomba peristáltica. La gráfica de la izquierda muestra el intercambio de soluciones cuando se fluye la solución fluorescente a través de la entrada de estímulo, mientras que la de la derecha muestra el tiempo de intercambio de soluciones cuando la solución es lavada a través del canal de lavado.

Posteriormente, se hizo una medición del flujo volumétrico en las cámaras con la bomba peristáltica a la frecuencia elegida. El flujo volumétrico medido a consecuencia de la activación de la bomba peristáltica con pasos de 100 ms fue de 36.48 ± 0.25 nL/min para la entrada de estímulo y de 35.81 ± 0.25 nL/min para la de lavado. El flujo dado por la bomba peristáltica disminuye considerablemente comparado con la bomba de jeringas. Para la configuración de este dispositivo no se puede incrementar el flujo, por limitaciones técnicas. Sin embargo, se pueden hacer modificaciones para incrementar el flujo volumétrico, colocando 2 o más canales en paralelo justo debajo de las microválvulas de la bomba peristáltica para que desplacen más fluido por paso. Aun así, para los experimentos aquí realizados, esto no presentó un inconveniente.

4.2.3 Experimentos de formación de NETs

4.2.3.1 Experimentos estáticos

Para comprobar que en nuestro dispositivo se pudieran realizar experimentos de NETosis suicida, se trató de replicar los resultados obtenidos por Jiménez-Valdés [29] (**Figura 1.24, Sección 1.2.3.1**). En este experimento se atraparon neutrófilos en los micropozos y se estimuló cada cámara con una concentración distinta de PMA mezclada con Sytox Green como marcador de NETs. Las concentraciones utilizadas fueron 0, 20, 200 y 400 μ M. Las soluciones se fluyeron por 1 min a 1 psi, para después incubar las células con el estímulo por 4 horas, sellando las cámaras con las microválvulas. Los neutrófilos son marcados previamente con Hoechst para poder observar su núcleo durante el experimento.

En la **Figura 4.25** se muestran las gráficas y mapas de calor de la intensidad de fluorescencia de Sytox Green en función del tiempo para cada célula en cada cámara. para el caso de las gráficas, cada célula está representada por

una línea de color, mientras que la intensidad promedio de todas las células de la misma cámara está representada por la línea negra. Además, se muestran histogramas de la intensidad de fluorescencia (vertical) y el tiempo de respuesta de las células (horizontal).

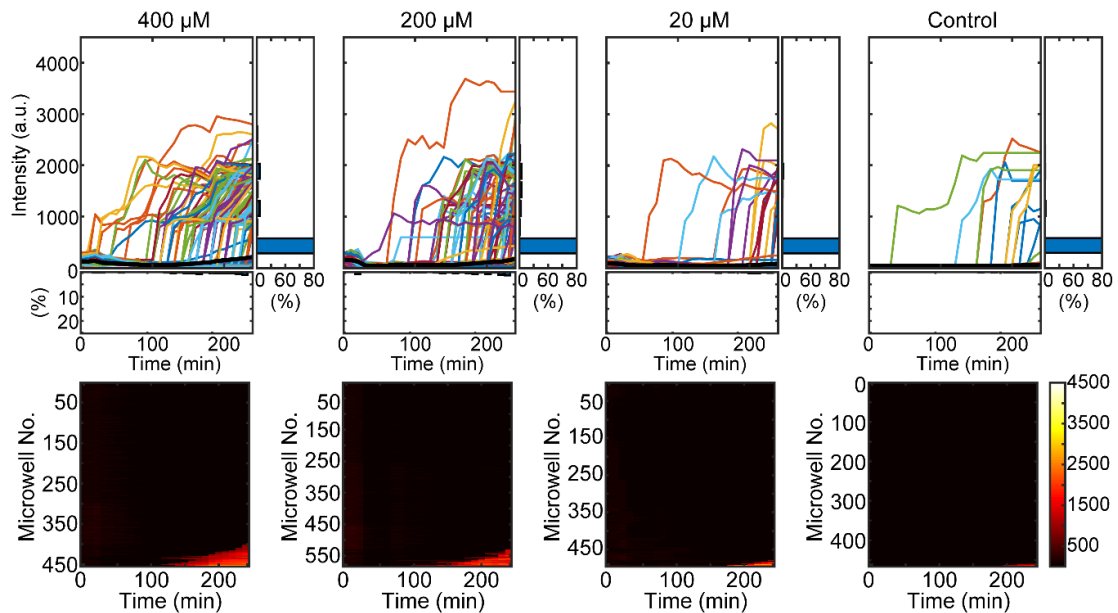


Fig. 4.25 Experimentos de generación de NETs con estímulos estáticos. Las líneas de colores muestran la respuesta temporal de cada célula y la línea negra la respuesta promedio de todas las células. Los histogramas muestran el porcentaje de células que respondieron a cada instante de tiempo y la intensidad final de las células.

Los resultados muestran que las células no forman NETs durante el experimento. De las células estimuladas con 20 μM se observa una respuesta casi nula a la formación de NETs, incrementando a $\sim 10\%$ con 200 μM y a $\sim 15\%$ con 400 μM . De este experimento se esperaba obtener una respuesta positiva, por lo menos en la cámara estimulada con 20 μM de PMA, ya que las condiciones del experimento son similares a las utilizadas por Jiménez-Valdés. Sin embargo, ante repetidas pruebas en distintos dispositivos, días y donadores de sangre, los resultados eran similares.

Durante las distintas pruebas con estímulos estáticos, se realizó un experimento donde una cámara fue perfundida constantemente, con una presión positiva de 0.1 psi. El flujo volumétrico no fue calculado. Los

resultados de ese experimento dieron resultados cualitativos interesantes. Se observó que después de un par de horas, algunas células mostraban un cambio morfológico en el núcleo, probablemente indicando la generación de NETs, como se muestra en la **Figura 4.26**. Estos resultados nos llevaron a pensar que el número de moléculas disponibles por célula en los experimentos estáticos no son suficientes para generar NETs.

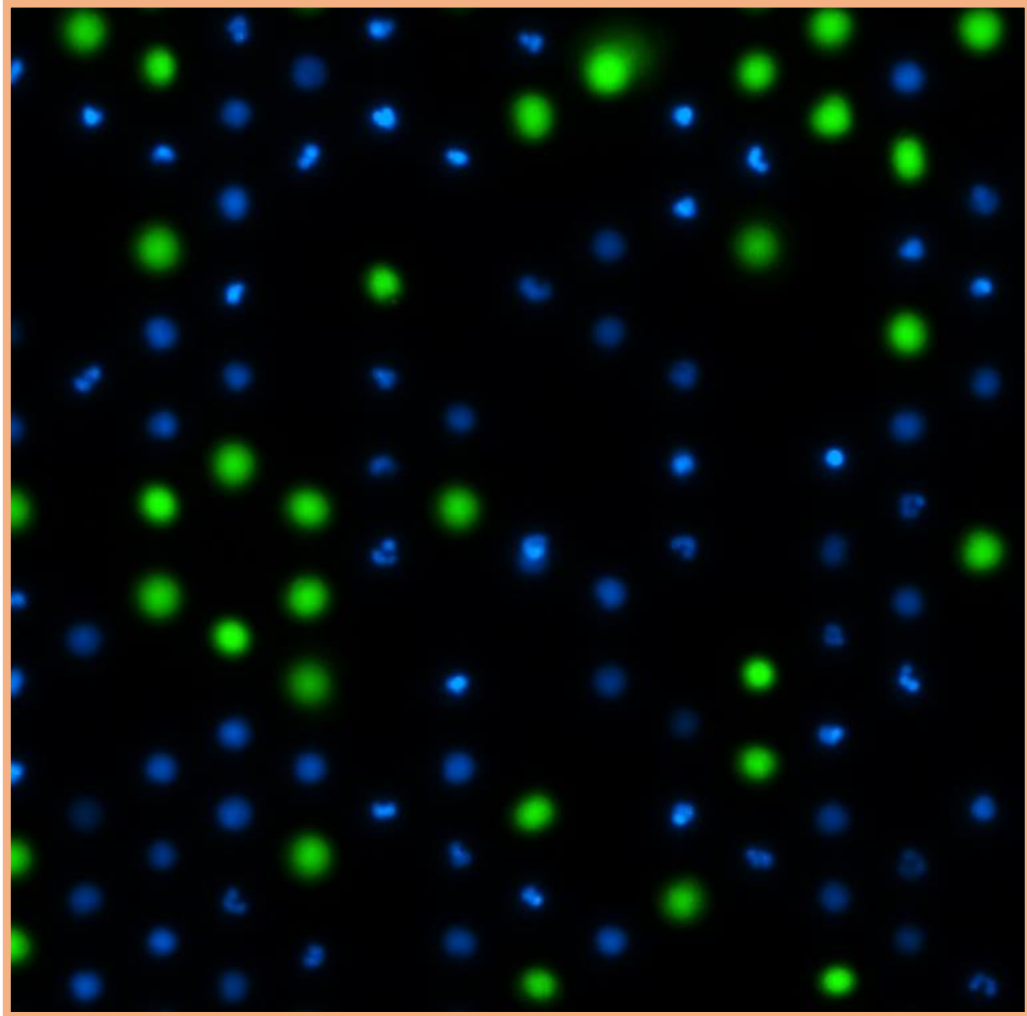


Figura 4.26 Micrografía a una cámara con micropozos durante un experimento de NETosis con estímulo constante. El marcador Hoechst (azul) permite observar un núcleo lobulado en células que no han iniciado el proceso de NETosis, mientras que se observa en forma circular cuando el proceso ya ha iniciado. El marcador Sytox Green (verde) muestra las NETs después de haber sido expulsada de la célula.

4.2.3.2 Experimentos con estímulos sostenidos

A partir de los resultados anteriores se buscaron métodos para lograr inducir la formación de NETs en el dispositivo microfluídico. En base a lo observado en la **Figura 4.26** y a la sospecha de que el estímulo estático no da una señal lo suficientemente fuerte a la célula para generar NETs, fue que se incorporó la bomba peristáltica al dispositivo microfluídico. De esta manera se puede estimular a las células con un flujo constante de PMA a distintas concentraciones.

Los primeros experimentos realizados consistieron en estimular a las células con pulsos sostenidos de estímulo, fluyendo constantemente PMA a través de las cámaras durante todo el experimento. Después de atrapar a los neutrófilos en los micropozos, las cámaras fueron estimuladas con 0, 10, 20 y 40 μM de PMA.

Los resultados del experimento pueden observarse en la **Figura 4.27**. En este experimento se observó una respuesta positiva en las células. Las células formaron NETs en todas las cámaras con todas las concentraciones de estímulo. Los resultados muestran que la cantidad de células que formaron NETs está relacionada con la concentración del estímulo, a una mayor concentración de estímulo se observó una mayor producción de NETs. En el caso del control, se observó que las células comenzaron a morir gradualmente a partir de los 170 min. En comparación, las células que hicieron NETs responden casi al mismo tiempo, generando un pico en el histograma del tiempo de respuesta (horizontal). Estos histogramas muestran que el tiempo de inducción de NETs es similar para las tres concentraciones de PMA. Por otro lado, el histograma de intensidad muestra que los datos están dispersos de manera similar para todas las concentraciones. En estos resultados se observa que el tiempo de activación de las células está en un rango más cercano a lo reportado previamente [84].

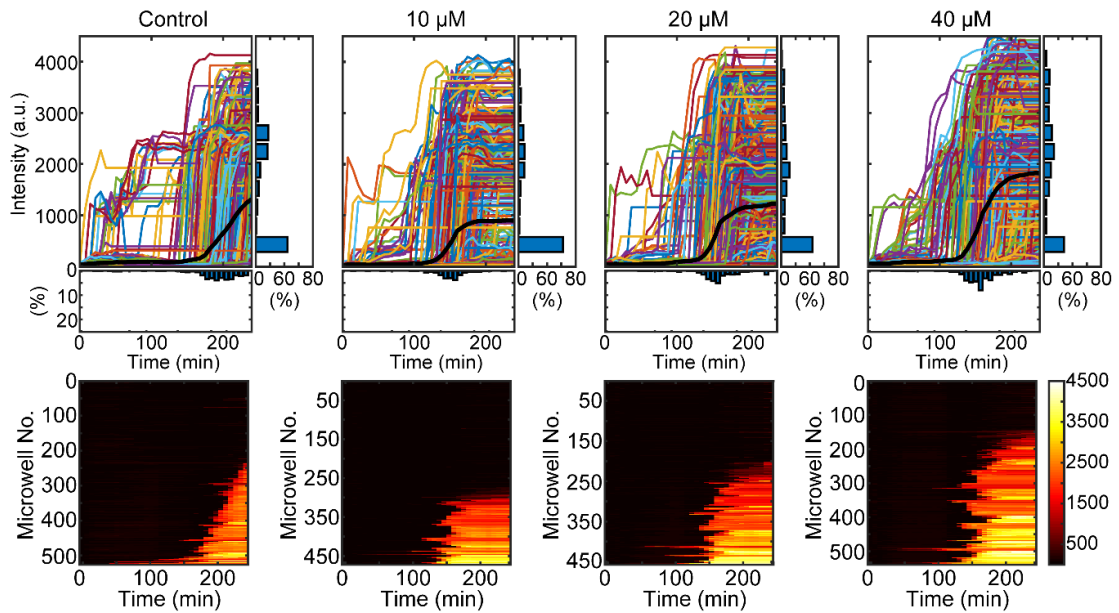


Fig. 4.27 Gráficas y mapas de calor de la generación de NETs con estímulos constantes de PMA a distintas concentraciones.

Con este experimento se pudo mejorar el software de análisis para permitir determinar el momento en el que la membrana plasmática de las células se rompe, dejando pasar el marcador Sytox Green (**Figura 4.28**). Además, permite ver la morfología del núcleo en el canal de Hoechst durante el proceso de NETosis, lo que nos permite seguir con detalle el proceso de formación de NETs, donde es muy clara la decondensación de la cromatina antes del rompimiento de la membrana plasmática.

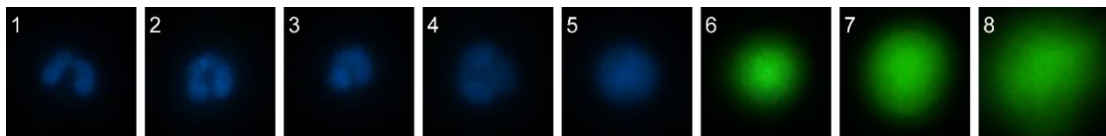


Fig. 4.28 Secuencia de estados del núcleo celular durante el proceso de NETosis suicida. Las micrografías muestran el núcleo teñido en azul (Hoechst) antes de que la membrana plasmática se rompa y en verde (Sytox Green) después de que esto ocurre.

4.2.3.3 Experimentos con pulsos unitarios

Con los resultados anteriores se decidió comparar la respuesta de las células durante distintos tiempos de estímulo, manteniendo una concentración

constante de PMA. En los siguientes dos experimentos, todas las cámaras fueron estimuladas con 20 μM de PMA (a excepción del control negativo). En el primer experimento, una cámara se mantuvo estimulada constantemente, mientras a otras dos se les dieron pulsos de 20 y 40 min. Pasado el tiempo de estímulo, se perfundieron las cámaras con solución HBSS y Sytox Green. En el canal de control negativo se mantuvo un flujo constante de solución HBSS con Sytox Green. La **Figura 4.29** muestra los resultados de este experimento.

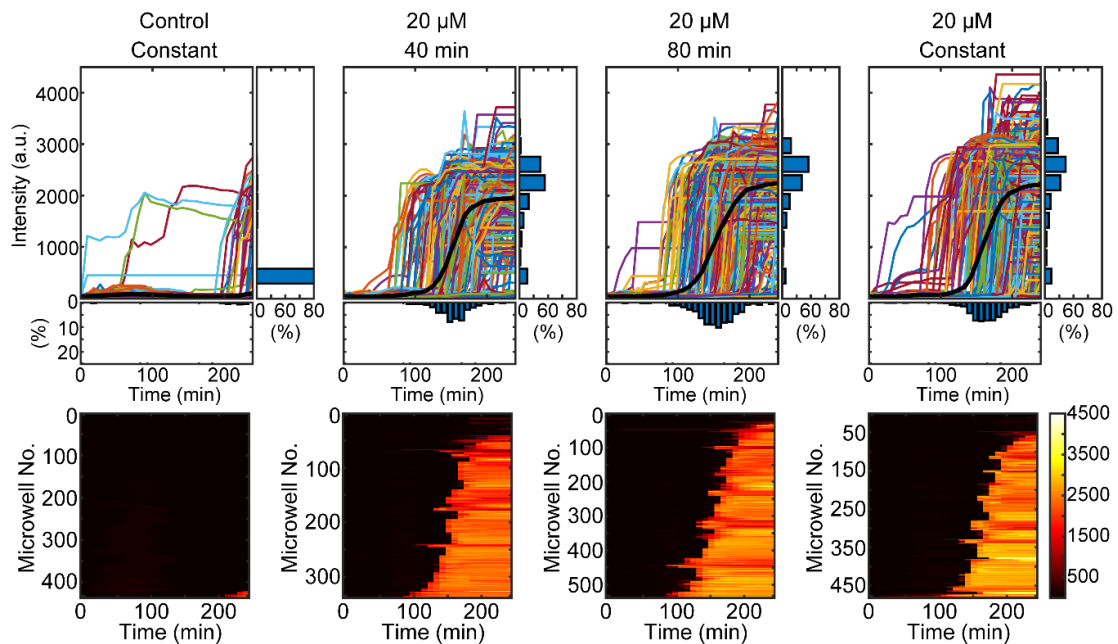


Fig. 4.29 Graficas y mapas de calor de la respuesta de neutrófilos ante estímulos de PMA con distinta duración comparados contra estimulación constante, a una misma concentración.

Las gráficas obtenidas muestran que la mayoría de las células responden al estímulo de PMA formando NETs, sin importar la duración del estímulo. En los histogramas del tiempo de respuesta (horizontales) pareciera que el tiempo de respuesta disminuye con los estímulos de menor duración, aunque sólo ligeramente. Los histogramas de intensidad de todas las cámaras, a excepción del control, muestran una tendencia similar, donde los datos están dispersos alrededor de la media (indicada por la línea negra en las gráficas). En este experimento se esperaba encontrar una diferencia en el estímulo con

menor duración, 40 min, ya que es menos de la mitad del tiempo que les tomó a las células comenzar a mostrar una respuesta en los datos de la **Figura 4.27**. Probablemente, la vía de señalización tiene una dinámica lenta, en la que después de un tiempo mínimo de estímulo, ya no importa si el inductor está presente o no. Para tratar de elucidar esto, en el siguiente experimento se dieron pulsos más cortos.

Para el segundo experimento se estimuló una cámara con un pulso unitario de 5 min, otra por 20 min y la tercera por 40 min. Se espera que las células en la cámara estimulada por 40 min muestren resultados similares al experimento anterior, por lo que se considera el control positivo de formación de NETs. Los resultados pueden observarse en la **Figura 4.30**.

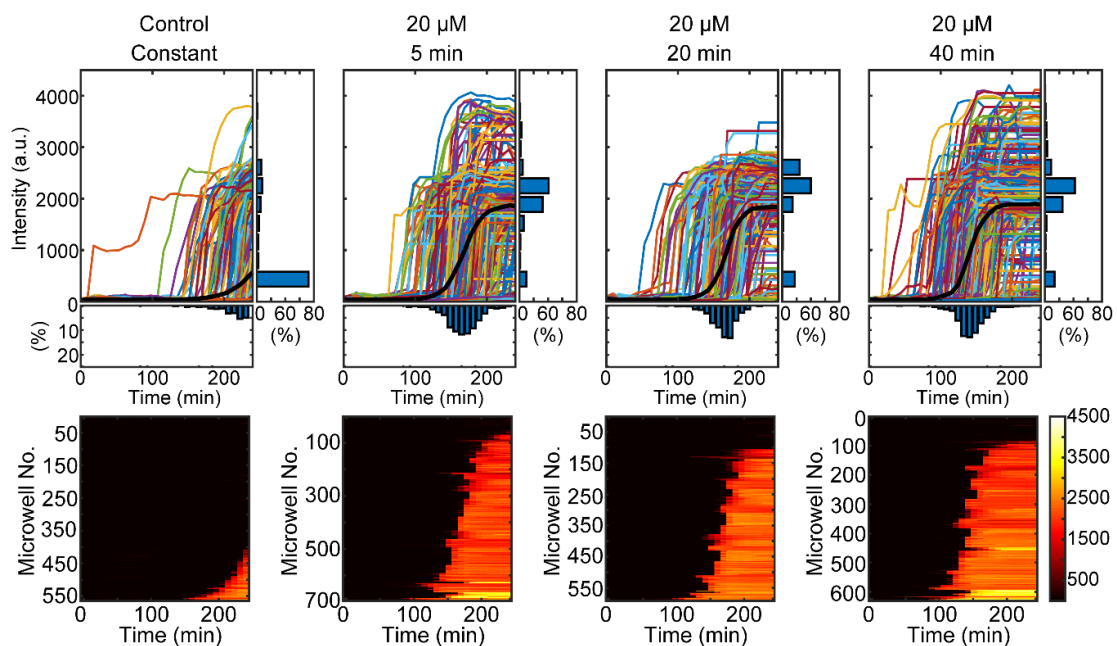


Fig. 4.30 Gráficas y mapas de calor de la respuesta de neutrófilos ante estímulos de PMA con distinta duración a una misma concentración.

Una vez más, los resultados no son lo que se esperaba, aunque no son desalentadores. Como ya se mencionó, se observa que las células comienzan a responder alrededor de los 110-120 min, algunas desde los 80 min ya muestran señal en algunos experimentos, lo que nos llevaba a pensar que un estímulo con un periodo mucho más corto que esto, debería inducir un menor

respuesta en las células. Un estímulo de entre 5 y 10 min abarca menos del 10% de la dinámica de formación de NETs, y aun así provoca una respuesta en la mayoría de las células. Hay células que incluso responden a los 200 min, aun con este pulso tan corto. Los histogramas del tiempo de respuesta muestran que sí hay un retardo en el tiempo de respuesta para los estímulos de menor duración y parece ser más ancha para el estímulo de 5 min. Esto indica que, en promedio, las células estimuladas con un pulso de menor duración sí tardan más en llevar a cabo el proceso de formación de NETs. Los histogramas de la intensidad de fluorescencia final son similares para todos los casos. Estos resultados son alentadores, ya que la temporalidad de la estimulación para inducir NETosis suicida no está estudiada aún, lo que abre un área de oportunidad para su estudio.

De manera general, la metodología empleada para los estudios de NETosis no permitió desarrollar un método de análisis de dicho proceso, donde la respuesta de las células estimuladas bajo las mismas condiciones en dispositivos distintos es replicable. Además, aunque ya fue mencionado, los resultados mostraron una respuesta celular a estímulos mucho más cortos que la dinámica completa del proceso de NETosis, lo cual es un resultado que no se había reportado previamente. Aún hay mejoras que se pueden realizar en el dispositivo, como incorporar una bomba peristáltica más eficiente. Sin embargo, es posible intercambiar soluciones de manera rápida en el dispositivo utilizando presión positiva al momento de dicho cambio, regresando después al uso de la bomba como método de perfusión. Incrementar el número de micropozos con respecto al dispositivo para señalización de calcio, incrementó el número de células analizadas, lo cual demostró ser un resultados positivo.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se describió el desarrollo de dos plataformas microfluídicas para realizar estudios de señalización celular dinámica en grupos de cientos de células individuales. La primera plataforma fue empleada para estudiar oscilaciones de calcio en células HEK-293 bajo estímulos dinámicos de un agonista de la vía del IP₃, carbacol. La segunda plataforma se empleó para el estudio temporal del proceso de NETosis suicida en neutrófilos primarios de humano.

En el primer dispositivo se pueden capturar nueve grupos de hasta 492 células que pueden ser estimulados de forma paralela con señales periódicas de un estímulo, donde cada cámara recibe una concentración distinta. La respuesta de cada una de las células se analiza de manera independiente para obtener información sobre la identidad de cada célula, después comparada con la respuesta promedio de toda la población. Mientras las células son estimuladas, se mantienen en un ambiente con un bajo estrés de corte, lo que evita una activación indeseada de alguna otra vía de señalización celular.

El dispositivo microfluídico puede crear eficientemente un gradiente de concentración lineal a partir de dos soluciones de entrada (estímulo y buffer), entregando nueve distintas concentraciones, que resultan de la mezcla controlada de las dos soluciones de entrada. Con estas soluciones, pueden generarse estímulos periódicos sobre distintos grupos de células con una frecuencia de hasta 33.3 mHz.

Las pruebas al dispositivo demostraron que es posible interrogar cientos de células del mismo tipo en paralelo y obtener información relevante sobre la heterogeneidad en su respuesta. Sumado con el módulo de análisis de imágenes, es una poderosa herramienta para distintos análisis de vías de señalización celular, donde la dinámica de su respuesta esté en el orden de segundos o minutos.

En comparación a los dispositivos microfluídicos reportados en la **Tabla 1.1**, nuestro dispositivo microfluídico es el que permite un análisis en el mayor número de células individuales, 4,428 células repartidas en nueve cámaras independientes. Otros dispositivos capturan hasta 4,000 células, pero sólo analizan unas cuantas de ellas (600 células para el más alto). Comparado con los dispositivos donde se utiliza el método de adhesión celular para capturar a las células, nuestro dispositivo con micropozos protege a las células de un alto estrés de corte, además de que las mantiene en posiciones fijas que facilitan el análisis de su respuesta. Otra ventaja de los micropozos es que se pueden atrapar células adherentes y no adherentes, sin tener que modificar su superficie, lo que le da una ventaja sobre el método de adhesión y sobre el método de captura hidrodinámica, ya que este último requiere un flujo constante para mantener a las células atrapadas, complicando el intercambio de soluciones, además de generar un estrés de corte más alto en las células.

Por otra parte, sólo en tres trabajos se incorpora la capacidad para medir diferentes grupos de células en un mismo dispositivo. La importancia de este parámetro es que el estudiar un mismo mecanismo en diferentes dispositivos implica que las células no están exactamente bajo las mismas condiciones al ser analizadas, agregando un factor de variabilidad a las mediciones.

Una desventaja de nuestro dispositivo es la frecuencia máxima de estimulación (33.3 mHz), ya que hay trabajos donde logran hasta 500 mHz; sin embargo, alcanzan estas frecuencias debido al bajo número de células analizadas, dos órdenes de magnitud por debajo de nuestro dispositivo.

Aunque el dispositivo se pensó tratando de desarrollar una plataforma robusta para estudios de señalización celular dinámica en células individuales, aún hay mejoras que pueden realizarse. La frecuencia máxima de generación de pulsos probada fue de 33.3 mHz, que corresponde a estímulos de 15 s; esto limita su aplicación a procesos donde la dinámica sea más rápida. El número de micropozos podría incrementarse cambiando la geometría de la cámara, haciendo más eficiente el intercambio de soluciones.

El segundo dispositivo no cuenta con el generador de gradientes de concentración, por lo que las soluciones con el estímulo se preparan a mano, pero agrega la ventaja de que puedan usarse distintas moléculas en el mismo dispositivo. Otra de sus ventajas es que las cámaras pueden considerarse microambientes independientes, donde pueden realizarse experimentos de distintos tipos, duraciones y dinámicas bajo el mismo dispositivo.

Los resultados de los experimentos de NETosis presentados, mostraron que los métodos experimentales a partir de los cuales se desarrolló este capítulo no son del todo replicables. A pesar de esto, se logró desarrollar una metodología que permite obtener resultados repetibles en cuanto a la formación de NETs. El análisis de los datos juega un papel importante, ya que se observó que es necesario analizar la morfología del núcleo de los neutrófilos durante todo el experimento, para de esta manera validar que el proceso está siguiendo su curso como ha sido reportado.

Este análisis puede considerar más parámetros a futuro, como el tiempo en el cual el núcleo comienza a decondensarse, y cuánto dura en esta forma antes de romper la membrana plasmática para cada célula. El encontrar si existe una relación entre este parámetro y la concentración o tiempo de estímulo, podría hablarnos de la dinámica temporal de las vías de señalización ligadas al proceso de NETosis suicida.

Por otro lado, los resultados de los experimentos con pulsos unitarios mostraron que existe una dependencia del tiempo de respuesta de las células contra al tiempo de estímulo. Se sabe que en el proceso de NETosis suicida se generan especies reactivas de oxígeno por la oxidasa NADPH. Una posible explicación es que las especies reactivas de oxígeno generadas a partir del pulso más corto sean más que suficientes para desencadenar todo el proceso de NETosis. Con un pulso más largo, la dinámica de la oxidasa NADPH es más larga, resultando en la generación de más especies reactivas de oxígeno, y por lo tanto una formación de NETs más rápida.

6. PERSPECTIVAS

Los dispositivos microfluídicos aquí presentados, muestran una aplicación potencial cada uno para el análisis de señalización celular en células individuales, que puede ser explorada más allá de los alcances de este trabajo. Ambos dispositivos muestran una manera distinta de realizar estudios de señalización celular en células únicas. Cualquiera de los dos dispositivos podría emplearse para estudiar distintas vías de señalización celular en células individuales, siempre y cuando se pueda tener una señal fluorescente medible relacionada con la respuesta de las células.

Durante la realización de este proyecto se pensaron en alternativas que podrían añadir módulos de análisis al dispositivo. Por ejemplo, se puede agregar un módulo de captura de anticuerpos para medir secreción de citocinas como respuesta a un estímulo. También puede incorporarse una manera de atrapar más de un tipo celular para medir la respuesta de la comunicación celular bajo estímulos controlados.

Los resultados que se han obtenido de estos experimentos pueden ser utilizados para generar modelos matemáticos de los datos experimentales. El análisis de la respuesta en células individuales proporciona información de la estocasticidad del sistema que no se puede obtener al hacer estudios poblacionales, por lo que los modelos matemáticos generados con estos datos deberían de reproducir y predecir una dinámica celular más exacta.

Por último, a partir de las imágenes obtenidas de los experimentos de NETosis, se está considerando la posibilidad de desarrollar sistemas de análisis de imágenes por *Deep Learning*. Estos análisis permitirían analizar los datos de manera más exacta, donde podrían encontrarse parámetros que no son claramente visibles con análisis en softwares como Matlab, donde el usuario ajusta todos los parámetros del análisis a experiencia y conveniencia.

7. REFERENCIAS

- [1] B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed. New York: W. W. Norton & Company, 2015.
- [2] G. M. Cooper and R. E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*, 4th ed. Sinauer Associates Inc., 2007.
- [3] R. A. Bradshaw and E. A. Dennis, *Handbook of Cell Signaling*, 2nd ed. Academic Press, 2009.
- [4] K. Sakimura, "Ionotropic Receptor," in *Encyclopedia of Neuroscience*, M. D. Binder, N. Hirokawa, and U. Windhorst, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, pp. 2056–2060.
- [5] A. Scott, K. Weir, C. Easton, W. Huynh, W. J. Moody, and A. Folch, "A microfluidic microelectrode array for simultaneous electrophysiology, chemical stimulation, and imaging of brain slices.," *Lab Chip*, vol. 13, no. 4, pp. 527–35, Feb. 2013.
- [6] S. R. Goodman, Ed., "Intercellular Signaling," in *Medical Cell Biology*, Third Edit., San Diego: Elsevier, 2008, pp. 227–248.
- [7] D. M. Rosenbaum, S. G. F. Rasmussen, and B. K. Kobilka, "The structure and function of G-protein-coupled receptors," *Nature*, vol. 459, no. 7245, pp. 356–363, May 2009.
- [8] A. J. Venkatakrishnan, X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler, and M. M. Babu, "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors," *Nature*, vol. 494, no. 7436, pp. 185–194, Feb. 2013.
- [9] H. Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology*, 8th ed. New York, NY: W.H. Freeman, 2016.
- [10] C. González-Espinosa and F. Guzmán-Mejía, "Basic Elements of Signal Transduction Pathways Involved in Chemical Neurotransmission," *Identif. Neural Markers Accompanying Mem.*, pp. 121–133, Jan. 2014.
- [11] F. Bronner, "Extracellular and Intracellular Regulation of Calcium Homeostasis," *Sci. World J.*, vol. 1, pp. 919–925, 2001.
- [12] G. Dupont, L. Combettes, and L. Leybaert, "Calcium Dynamics: Spatio-Temporal Organization from the Subcellular to the Organ Level," in *International Review of Cytology*, vol. 261, no. 07, 2007, pp. 193–245.
- [13] C. O. Mechanisms, *Cellular Oscillatory Mechanisms*, vol. 641. New York, NY: Springer New York, 2009.
- [14] M. J. Berridge, M. D. Bootman, and H. L. Roderick, "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 7, pp. 517–529, Jul. 2003.
- [15] M. J. Berridge, "Calcium signal transduction and cellular control mechanisms," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1742, no. 1–3, pp. 3–7, Dec. 2004.
- [16] A. Verkhratsky, "Calcium and Cell Death," in *Calcium Signalling and Disease*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2007, pp. 465–480.
- [17] J. Keener and J. Sneyd, "Calcium Dynamics," in *Mathematical Physiology*, 2nd ed., no. January, Springer New York, 2009, pp. 273–346.
- [18] H. L. Roderick, M. J. Berridge, and M. D. Bootman, "Calcium-induced calcium release," *Curr. Biol.*, vol. 13, no. 11, p. R425, May 2003.
- [19] J. E. Purvis and G. Lahav, "Encoding and Decoding Cellular Information through Signaling

- Dynamics," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 945–956, Feb. 2013.
- [20] R. P. Alexander, P. M. Kim, T. Emonet, and M. B. Gerstein, "Understanding modularity in molecular networks requires dynamics," *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 81, 2009.
- [21] M. Behar and A. Hoffmann, "Understanding the temporal codes of intra-cellular signals," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 20, no. 6, pp. 684–693, 2010.
- [22] R. E. Dolmetsch, K. Xu, and R. S. Lewis, "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression," *Nature*, vol. 392, no. 6679, pp. 933–936, Apr. 1998.
- [23] X. Gu and N. C. Spitzer, "Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients," *Nature*, vol. 375, no. 6534, pp. 784–787, Jun. 1995.
- [24] A. Loewer and G. Lahav, "We are all individuals: Causes and consequences of non-genetic heterogeneity in mammalian cells," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 21, no. 6, pp. 753–758, 2011.
- [25] D. Di Carlo, H. T. K. Tse, and D. R. Gossett, "Introduction: Why Analyze Single Cells?," vol. 853, S. Lindström and H. Andersson-Svahn, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, pp. 1–10.
- [26] S. J. Altschuler and L. F. Wu, "Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference?," *Cell*, vol. 141, no. 4, pp. 559–563, May 2010.
- [27] B. Snijder and L. Pelkmans, "Origins of regulated cell-to-cell variability," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 2, pp. 119–125, Feb. 2011.
- [28] A. Loewer, E. Batchelor, G. Gaglia, and G. Lahav, "Basal Dynamics of p53 Reveal Transcriptionally Attenuated Pulses in Cycling Cells," *Cell*, vol. 142, no. 1, pp. 89–100, Jul. 2010.
- [29] R. J. Jimenez-Valdes, R. Rodriguez-Moncayo, D. F. Cedillo-Alcantar, and J. L. Garcia-Cordero, "Massive Parallel Analysis of Single Cells in an Integrated Microfluidic Platform," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 10, pp. 5210–5220, May 2017.
- [30] P. Liu, T. Z. Young, and M. Acar, "Yeast Replicator: A High-Throughput Multiplexed Microfluidics Platform for Automated Measurements of Single-Cell Aging," *Cell Rep.*, vol. 13, no. 3, pp. 634–644, Oct. 2015.
- [31] A. S. Kniss-James, C. A. Rivet, L. Chingozha, H. Lu, and M. L. Kemp, "Single-cell resolution of intracellular T cell Ca²⁺ dynamics in response to frequency-based H₂O₂ stimulation," *Integr. Biol.*, vol. 9, no. 3, pp. 238–247, 2017.
- [32] A. Piehler, N. Ghorashian, C. Zhang, and S. Tay, "Universal signal generator for dynamic cell stimulation," *Lab Chip*, vol. 17, no. 13, pp. 2218–2224, 2017.
- [33] L. Chingozha, M. Zhan, C. Zhu, and H. Lu, "A Generalizable, Tunable Microfluidic Platform for Delivering Fast Temporally Varying Chemical Signals to Probe Single-Cell Response Dynamics," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 20, pp. 10138–10147, Oct. 2014.
- [34] L. He, A. Kniss, A. San-Miguel, T. Rouse, M. L. Kemp, and H. Lu, "An automated programmable platform enabling multiplex dynamic stimuli delivery and cellular response monitoring for high-throughput suspension single-cell signaling studies," *Lab Chip*, vol. 15, no. 6, pp. 1497–1507, 2015.
- [35] L. Chen, F. Azizi, and C. H. Mastrangelo, "Generation of dynamic chemical signals with microfluidic C-DACs," *Lab Chip*, vol. 7, no. 7, p. 850, 2007.
- [36] J. Olofsson, H. Bridle, J. Sinclair, D. Granfeldt, E. Sahlin, and O. Orwar, "A chemical waveform synthesizer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 23, pp. 8097–102, 2005.
- [37] A. Ainla, I. Gözen, O. Orwar, and A. Jesorka, "A microfluidic diluter based on pulse width flow

- modulation," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 13, pp. 5549–5556, 2009.
- [38] F. Azizi and C. H. Mastrangelo, "Generation of dynamic chemical signals with pulse code modulators," *Lab Chip*, vol. 8, no. 6, p. 907, 2008.
- [39] K. Woodruff and S. J. Maerkl, "Microfluidic Module for Real-Time Generation of Complex Multimolecule Temporal Concentration Profiles," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 1, pp. 696–701, Jan. 2018.
- [40] L. Cao, X. Zhang, A. Grimley, A. R. Lomasney, and M. G. Roper, "Microfluidic multi-analyte gradient generator," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 5, pp. 1985–1991, 2010.
- [41] X. Zhang, A. Grimley, R. Bertram, and M. G. Roper, "Microfluidic system for generation of sinusoidal glucose waveforms for entrainment of islets of langerhans," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 15, pp. 6704–6711, 2010.
- [42] J. Atencia, J. Morrow, and L. E. Locascio, "The microfluidic palette: A diffusive gradient generator with spatio-temporal control," *Lab Chip*, vol. 9, no. 18, p. 2707, 2009.
- [43] M. Morel, J.-C. Galas, M. Dahan, and V. Studer, "Concentration landscape generators for shear free dynamic chemical stimulation," *Lab Chip*, vol. 12, no. 7, p. 1340, 2012.
- [44] P. Chen *et al.*, "Microfluidic Chemical Function Generator for Probing Dynamic Cell Signaling," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 17, pp. 9209–9217, Sep. 2017.
- [45] J. Sun, P. Chen, X. Feng, W. Du, and B. F. Liu, "Development of a microfluidic cell-based biosensor integrating a millisecond chemical pulse generator," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 8, pp. 3413–3419, 2011.
- [46] R. Dhumpa, T. M. Truong, X. Wang, and M. G. Roper, "Measurement of the entrainment window of islets of Langerhans by microfluidic delivery of a chirped glucose waveform," *Integr. Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 1061–1067, 2015.
- [47] L. Yi, X. Wang, R. Dhumpa, A. M. Schrell, N. Mukhitov, and M. G. Roper, "Integrated perfusion and separation systems for entrainment of insulin secretion from islets of Langerhans," *Lab Chip*, vol. 15, no. 3, pp. 823–832, 2015.
- [48] Y. T. Kim, S. D. Joshi, W. C. Messner, P. R. LeDuc, and L. A. Davidson, "Detection of dynamic spatiotemporal response to periodic chemical stimulation in a *Xenopus* embryonic tissue," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011.
- [49] P. Hersen, M. N. McClean, L. Mahadevan, and S. Ramanathan, "Signal processing by the HOG MAP kinase pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 105, no. 20, pp. 7165–7170, 2008.
- [50] K. R. King, S. Wang, A. Jayaraman, M. L. Yarmush, and M. Toner, "Microfluidic flow-encoded switching for parallel control of dynamic cellular microenvironments," *Lab Chip*, vol. 8, no. 1, pp. 107–116, 2008.
- [51] J. J. VanDersarl, A. M. Xu, and N. A. Melosh, "Rapid spatial and temporal controlled signal delivery over large cell culture areas," *Lab Chip*, vol. 11, no. 18, p. 3057, 2011.
- [52] B. Kuczynski, W. C. Ruder, W. C. Messner, and P. R. LeDuc, "Probing cellular dynamics with a chemical signal generator," *PLoS One*, vol. 4, no. 3, 2009.
- [53] J. Atencia, G. A. Cooksey, and L. E. Locascio, "A robust diffusion-based gradient generator for dynamic cell assays," *Lab Chip*, vol. 12, no. 2, pp. 309–316, 2012.
- [54] A. Folch, *Introduction to BioMEMS*, 1st ed. Florida: CRC Press, 2012.
- [55] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*, 1st ed. New York: Oxford University Press, 2008.

- [56] J. L. Garcia-Cordero and S. J. Maerkl, "Multiplexed surface micropatterning of proteins with a pressure-modulated microfluidic button-membrane," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 13, pp. 1264–1266, 2013.
- [57] M. Kasendra *et al.*, "Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 2871, Dec. 2018.
- [58] K. K. Zeming, N. V. Thakor, Y. Zhang, and C.-H. Chen, "Real-time modulated nanoparticle separation with an ultra-large dynamic range," *Lab Chip*, vol. 16, no. 1, pp. 75–85, 2016.
- [59] S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, Noo Li Jeon, and G. M. Whitesides, "Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 6, pp. 1240–1246, 2001.
- [60] X. Wang, Z. Liu, and Y. Pang, "Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 48, pp. 29966–29984, 2017.
- [61] K. Campbell and A. Groisman, "Generation of complex concentration profiles in microchannels in a logarithmically small number of steps," *Lab Chip*, vol. 7, no. 2, pp. 264–272, 2007.
- [62] C. Probst, A. Grünberger, W. Wiechert, and D. Kohlheyer, "Microfluidic growth chambers with optical tweezers for full spatial single-cell control and analysis of evolving microbes," *J. Microbiol. Methods*, vol. 95, no. 3, pp. 470–476, Dec. 2013.
- [63] M. Evander *et al.*, "Noninvasive Acoustic Cell Trapping in a Microfluidic Perfusion System for Online Bioassays," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 7, pp. 2984–2991, Apr. 2007.
- [64] C. Sun, H. Hassanisaber, R. Yu, S. Ma, S. S. Verbridge, and C. Lu, "Paramagnetic Structures within a Microfluidic Channel for Enhanced Immunomagnetic Isolation and Surface Patterning of Cells," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, pp. 1–9, 2016.
- [65] M. C. Jo, W. Liu, L. Gu, W. Dang, and L. Qin, "High-throughput analysis of yeast replicative aging using a microfluidic system," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 30, pp. 9364–9369, Jul. 2015.
- [66] K. Woodruff and S. J. Maerkl, "A High-Throughput Microfluidic Platform for Mammalian Cell Transfection and Culturing," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. September 2015, pp. 1–12, 2016.
- [67] H.-S. Moon *et al.*, "Inertial-ordering-assisted droplet microfluidics for high-throughput single-cell RNA-sequencing," *Lab Chip*, vol. 18, no. 5, pp. 775–784, 2018.
- [68] J. R. Rettig and A. Folch, "Large-Scale Single-Cell Trapping And Imaging Using Microwell Arrays," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 17, pp. 5628–5634, Sep. 2005.
- [69] D. A. Rubenstein, W. Yin, and M. D. Frame, *Biofluid Mechanics*, 2nd ed. Elsevier, 2012.
- [70] J. Rosser and D. J. Thomas, "Bioreactor processes for maturation of 3D bioprinted tissue," in *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery*, Elsevier, 2018, pp. 191–215.
- [71] J. Lee, K. Kim, and S. Kim, "Kidney on chips," 2018, pp. 85–104.
- [72] V. Ranjan, R. Waterbury, Z. Xiao, and S. L. Diamond, "Fluid shear stress induction of the transcriptional activator c-fos in human and bovine endothelial cells, HeLa, and Chinese hamster ovary cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 49, no. 4, pp. 383–390, Mar. 2000.
- [73] J. Kwon *et al.*, "The Nonphagocytic NADPH Oxidase Duox1 Mediates a Positive Feedback Loop During T Cell Receptor Signaling," *Sci. Signal.*, vol. 3, no. 133, pp. ra59-ra59, Aug. 2010.
- [74] A. Jovic *et al.*, "Phase-Locked Signals Elucidate Circuit Architecture of an Oscillatory Pathway," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 6, no. 12, p. e1001040, Dec. 2010.
- [75] A. Jovic, S. M. Wade, R. R. Neubig, J. J. Linderman, and S. Takayama, "Microfluidic interrogation

- and mathematical modeling of multi-regime calcium signaling dynamics," *Integr. Biol.*, vol. 5, no. 7, p. 932, 2013.
- [76] M. Junkin *et al.*, "High-Content Quantification of Single-Cell Immune Dynamics," *Cell Rep.*, vol. 15, no. 2, pp. 411–422, Apr. 2016.
- [77] A. J. Kaestli, M. Junkin, and S. Tay, "Integrated platform for cell culture and dynamic quantification of cell secretion," *Lab Chip*, vol. 17, no. 23, pp. 4124–4133, 2017.
- [78] P.-H. Huang *et al.*, "A sharp-edge-based acoustofluidic chemical signal generator," *Lab Chip*, vol. 12, pp. 4955–4959, 2018.
- [79] J. K. Actor, "Cells and Organs of the Immune System," in *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology*, Elsevier, 2012, pp. 7–16.
- [80] S.-J. Lu, E. A. Kimbrel, Q. Feng, F. Li, and R. Lanza, "Blood Components from Pluripotent Stem Cells," in *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, 2014, pp. 1041–1057.
- [81] B. Shah, N. Burg, and M. H. Pillinger, "Neutrophils," in *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*, Tenth Edit., Elsevier, 2017, p. 169–188.e3.
- [82] A. Khanna-Gupta and N. Berliner, "Granulocytopoiesis and Monocytopoiesis," in *Hematology*, Elsevier, 2018, p. 321–333.e1.
- [83] V. Brinkmann and A. Zychlinsky, "Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?," *J. Cell Biol.*, vol. 198, no. 5, pp. 773–783, Sep. 2012.
- [84] V. Delgado-Rizo, M. A. Martínez-Guzmán, L. Iñiguez-Gutierrez, A. García-Orozco, A. Alvarado-Navarro, and M. Fafutis-Morris, "Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. FEB, pp. 1–20, Feb. 2017.
- [85] W. M. Nauseef and N. Borregaard, "Neutrophils at work," *Nat. Immunol.*, vol. 15, no. 7, pp. 602–611, Jul. 2014.
- [86] H. Takei, A. Araki, H. Watanabe, A. Ichinose, and F. Sendo, "Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 59, no. 2, pp. 229–240, Feb. 1996.
- [87] V. Brinkmann, "Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria," *Science (80-.)*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535, Mar. 2004.
- [88] T. Hoppenbrouwers *et al.*, "In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review," *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0176472, May 2017.
- [89] K. C. Navegantes, R. de Souza Gomes, P. A. T. Pereira, P. G. Czaikoski, C. H. M. Azevedo, and M. C. Monteiro, "Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity," *J. Transl. Med.*, vol. 15, no. 1, p. 36, Dec. 2017.
- [90] G. Sollberger, D. O. Tilley, and A. Zychlinsky, "Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization," *Dev. Cell*, vol. 44, no. 5, pp. 542–553, Mar. 2018.
- [91] A. J. Dicker *et al.*, "Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 141, no. 1, pp. 117–127, Jan. 2018.
- [92] K. Martinod and D. D. Wagner, "Thrombosis: tangled up in NETs," *Blood*, vol. 123, no. 18, pp. 2768–2776, May 2014.
- [93] Y. Yu and K. Su, "Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus," *J. Clin.*

- Cell. Immunol.*, vol. 04, no. 02, 2013.
- [94] B. McDonald *et al.*, "Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice," *Blood*, vol. 129, no. 10, pp. 1357–1367, Mar. 2017.
- [95] E. Corsiero, F. Pratesi, E. Prediletto, M. Bombardieri, and P. Migliorini, "NETosis as Source of Autoantigens in Rheumatoid Arthritis," *Front. Immunol.*, vol. 7, no. NOV, pp. 1–9, Nov. 2016.
- [96] K. H. Lee *et al.*, "Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review," *Autoimmun. Rev.*, vol. 16, no. 11, pp. 1160–1173, Nov. 2017.
- [97] J. M. Agraz-Cibrian, D. M. Giraldo, F.-M. Mary, and S. Urcuqui-Inchima, "Understanding the molecular mechanisms of NETs and their role in antiviral innate immunity," *Virus Res.*, vol. 228, pp. 124–133, Jan. 2017.
- [98] S. K. Jorch and P. Kuberski, "An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease," *Nat. Med.*, vol. 23, no. 3, pp. 279–287, Mar. 2017.
- [99] S. Yousefi, C. Mihalache, E. Kozłowski, I. Schmid, and H. U. Simon, "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps," *Cell Death Differ.*, vol. 16, no. 11, pp. 1438–1444, Nov. 2009.
- [100] S. Masuda *et al.*, "NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers," *Clin. Chim. Acta*, vol. 459, pp. 89–93, Aug. 2016.
- [101] E. Pieterse, N. Rother, C. Yanginlar, L. B. Hilbrands, and J. van der Vlag, "Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps," *Front. Immunol.*, vol. 7, no. NOV, pp. 1–13, Nov. 2016.
- [102] E. F. Kenny *et al.*, "Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways," *Elife*, vol. 6, pp. 1–21, Jun. 2017.
- [103] S. Tay, "Single-Cell Analysis: The Differences That Kill," *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1208–1210, 2015.
- [104] X. Yu, J. Tan, and S. L. Diamond, "Hemodynamic force triggers rapid NETosis within sterile thrombotic occlusions," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 16, no. 2, pp. 316–329, Feb. 2018.
- [105] J. Perdomo *et al.*, "Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 1322, Dec. 2019.
- [106] S. F. Moussavi-Harami *et al.*, "Microfluidic device for simultaneous analysis of neutrophil extracellular traps and production of reactive oxygen species," *Integr. Biol.*, vol. 8, no. 2, pp. 243–252, 2016.
- [107] E. Delamarche and G. V. Kaigala, *Open-Space Microfluidics: Concepts, Implementations, Applications*. Wiley-VCH, 2018.
- [108] J. Schindelin *et al.*, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jun. 2012.
- [109] M. a Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S. R. Quake, "Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography.," *Science*, vol. 288, no. 5463, pp. 113–116, 2000.
- [110] A. M. Malek, "Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis," *JAMA*, vol. 282, no. 21, p. 2035, Dec. 1999.
- [111] P. Thomas and T. G. Smart, "HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant

- proteins," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 51, no. 3, pp. 187–200, May 2005.
- [112] G. P. Hussmann, R. P. Yasuda, Y. Xiao, B. B. Wolfe, and K. J. Kellar, "Endogenously Expressed Muscarinic Receptors in HEK293 Cells Augment Up-regulation of Stably Expressed α 4 β 2 Nicotinic Receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 46, pp. 39726–39737, Nov. 2011.
- [113] A. Jovic, S. M. Wade, A. Miyawaki, R. R. Neubig, J. J. Linderman, and S. Takayama, "Hi-Fi transmission of periodic signals amid cell-to-cell variability," *Mol. Biosyst.*, vol. 7, no. 7, p. 2238, 2011.
- [114] J. Tong, G. G. Du, S. R. W. Chen, and D. H. MacLennan, "HEK-293 cells possess a carbachol- and thapsigargin-sensitive intracellular Ca²⁺ store that is responsive to stop-flow medium changes and insensitive to caffeine and ryanodine," *Biochem. J.*, vol. 343, no. 1, pp. 39–44, Oct. 1999.