

Técnicas de separação biomimética em microfluídica

Vera Faustino^{1,2}, Diana Pinho², Raquel Rodrigues¹, Valdemar Garcia¹, Rui Lima^{1,2}

¹Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Campus St^a Apolónia, 5301-857 Bragança, Portugal

²CEFT, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Porto, Portugal

1. Importância do estudo de técnicas de separação biomiméticas em microfluídica

A separação e a identificação de células são essenciais em várias aplicações biomédicas, incluindo a biologia celular e os métodos de diagnóstico e terapêuticos.

O sangue é um fluido não-Newtoniano contendo inúmeras informações preciosas sobre o estado fisiológico e patológico do corpo humano. No entanto, devido à sua complexidade, existem actualmente poucos métodos de análise precisos. A maioria das técnicas convencionais usadas na separação e contagem de células são dispendiosas e normalmente é necessário usar agentes externos adicionais para identificar as células [1-3].

As técnicas biomiméticas de separação em microfluídica usam fenómenos microfluídicos, que ocorrem à microescala, para realizar a separação de determinadas células sanguíneas. Estes fenómenos incluem a separação do plasma, a camada livre de células (CLC), a migração dos glóbulos brancos (GBs), também designados por leucócitos, e a lei da bifurcação [1]. Recentemente, vários investigadores têm replicado estes efeitos, que acontecem em ambientes *in vivo*, em sistemas microfluídicos, ou seja, em ambientes *in vitro*. Nos microcanais, os glóbulos vermelhos (GVs), devido à sua deformabilidade e ao gradiente de velocidades (às forças de sustentação), tendem a concentrar-se na zona central dos microcanais, enquanto os GBs e os GVs rígidos (tal como, os GVs infectados com malária) tendem a migrar para a CLC que se forma nas zonas próximas das paredes. A lei da bifurcação estabelece, relativamente ao comportamento dos GVs, que em microcanais com bifurcações eles tendem a escolher o microcanal de secção maior.

2. A biomicrofluídica: aplicações e desafios no diagnóstico clínico

Durante a última década têm sido desenvolvidos vários dispositivos microfluídicos para tirar vantagem destes fenómenos naturais da hemodinâmica. Por exemplo, Shevkoplyas e colaboradores [4] desenvolveram um microdispositivo com uma sucessão de redes microvasculares e, aplicando o efeito da marginalização conseguiram separar os GBs a partir de uma amostra de sangue composta por uma mistura de GVs e GBs, tal como é demonstrado na Figura 1.

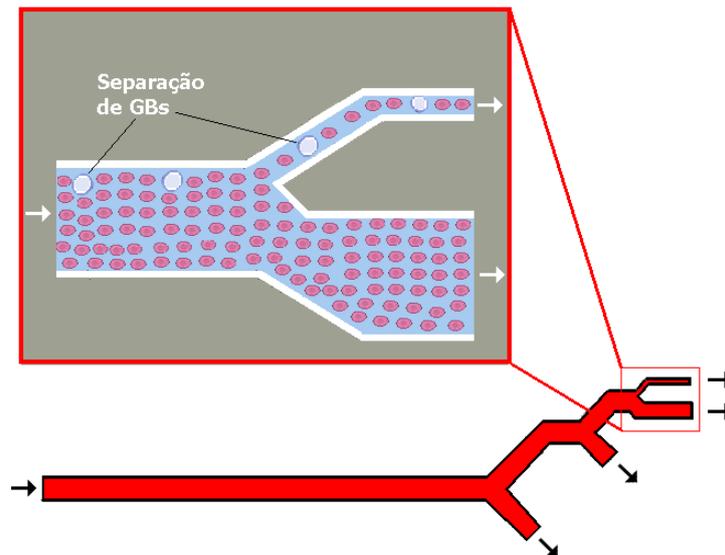


Figura 1 - Um dispositivo microfluídico para isolar GBs de uma amostra de sangue utilizando o efeito da marginalização (adaptado de [4]).

Recentemente, investigadores da Universidade de Singapura propuseram um microdispositivo biomimético para separar GVs infetados com malária dos GVs saudáveis [5]. Os GVs infetados com malária perdem a capacidade de se deformarem e ficam rígidos. Este fenómeno proporciona uma migração destes GVs para junto das paredes, o que conseqüentemente torna possível a separação dos GVs rígidos infetados com malária dos GVs saudáveis, como é observável na Figura 2.

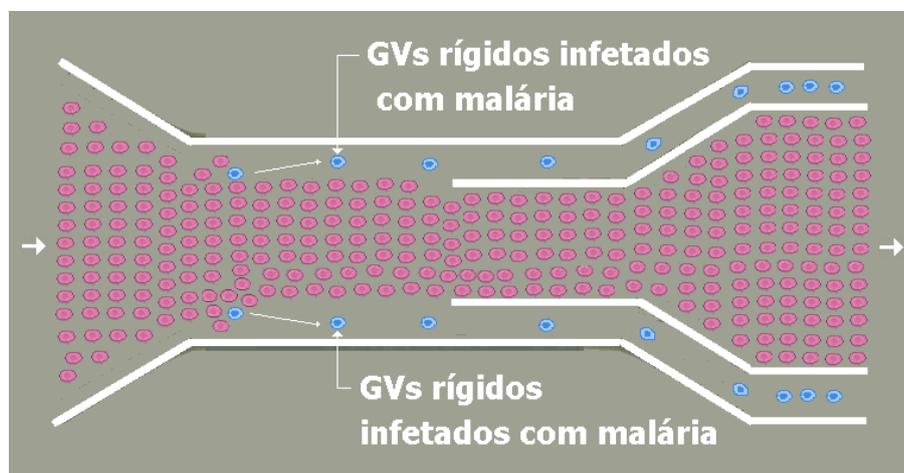


Figure 2 - Microdispositivo biomimético para separar GVs infetados com malária dos GVs saudáveis. (adaptado de [5]).

Outros investigadores encontraram diversas vantagens para controlar e manipular o escoamento sanguíneo em dispositivos microfluídicos. Fujiwara e colaboradores [6] encontraram evidências de que não só é possível criar uma CLC artificial sob adequadas condições hemodinâmicas e geométricas, como também a espessura da CLC é fortemente influenciada pela deformabilidade dos GVs. Também na Universidade de Princeton, um grupo liderado por Stone desenvolveu uma contracção, seguida por uma expansão, com o intuito de separar o plasma a partir de uma amostra de sangue composta por GVs suspensos em solução de dextrano e representada pela Figura 3.



Figura 3 - Microdispositivo microfluídico capaz de extrair o fluido fisiológico com uma pureza semelhante à obtida com métodos convencionais de centrifugação (adaptado de [7]).

Este grupo de investigação foi ainda capaz de extrair o fluido fisiológico com uma pureza semelhante à obtida com métodos convencionais de centrifugação, normalmente usados em laboratórios clínicos [7]. Outros investigadores desenvolveram um outro microdispositivo em que utilizaram a lei da bifurcação, para conseguir uma separação altamente eficiente do plasma. Neste microdispositivo foram fabricados microcanais com ramos perpendiculares sucessivos ao longo do microcanal principal, de forma a removerem o plasma. Este fenómeno de separação deve-se à elevada diferença entre o caudal no microcanal principal e o caudal existente nos microcanais derivados, fazendo com que os GV's tendam a passar através do microcanal principal enquanto o plasma é recolhido a partir dos microcanais derivados [8]. Muito recentemente, investigadores do Instituto Politécnico Bragança em colaboração com colegas Japoneses da Universidade de Tohoku, descobriram que também é possível extrair o plasma por intermédio da aplicação de bifurcações e confluências sucessivas [9], demonstrado pela Figura 4.

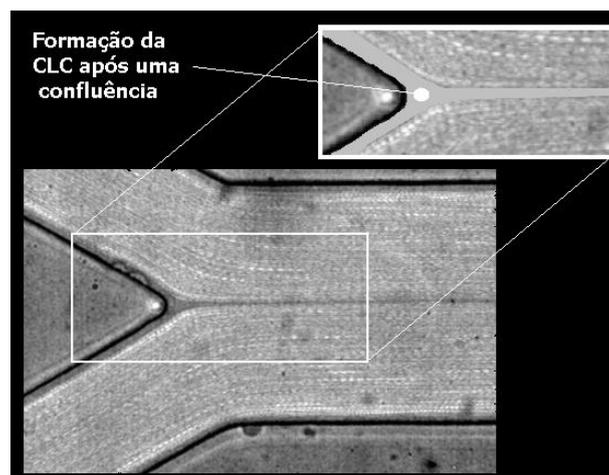


Figure 4 - Microdispositivo microfluídico capaz de extrair as células sanguíneas do fluido em suspensão por intermédio de uma confluência. (adaptado de [9]).

Actualmente investigadores do Instituto Politécnico Bragança em colaboração com colegas do CEFT da Universidade do Porto e da Universidade de Tohoku encontram-se a desenvolver um dispositivo microfluídico com intuito de realizar uma separação parcial. A principal finalidade deste sistema é de realizar num único microdispositivo

diferentes tarefas, tais como, a separação e a determinação do índice de deformação dos GVs [10-12], possibilitando uma maior compreensão do comportamento celular sanguíneo e numa fase final, no desenvolvimento de um dispositivo biomédico simples e de baixo custo para o diagnóstico de algumas doenças relacionadas com a perda de deformabilidade dos GVs. Na Figura 5 pode observar-se o microdispositivos em fase de desenvolvimento.

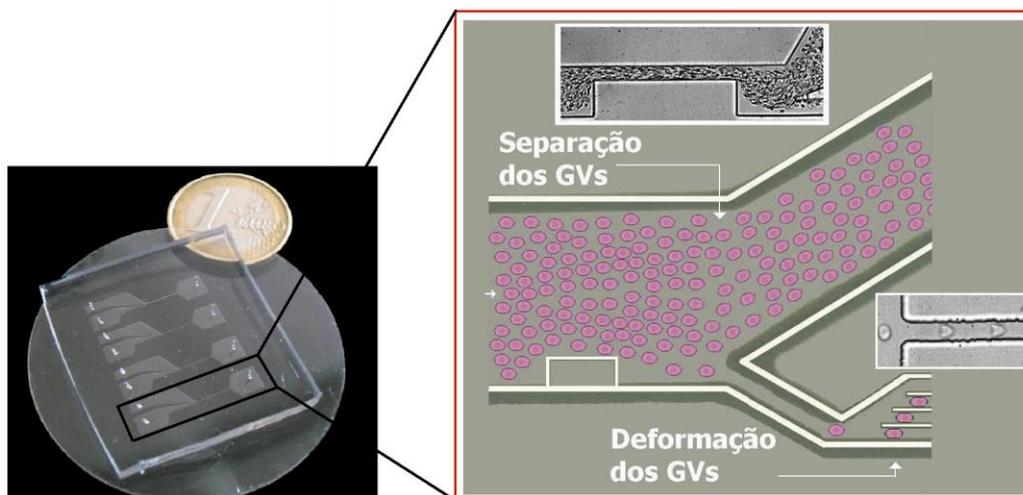


Figure 5 - Dispositivo microfluídico capaz de realizar num único passo diferentes tarefas tais como a separação e a determinação do índice de deformação dos GVs (<http://csdchip.ipb.pt/index.html>; <http://www.ipb.pt/~ruimec/>).

Informação adicional relativa a este dispositivo microfluídico pode ser encontrada em: <http://www.ipb.pt/~ruimec/> ; <http://csdchip.ipb.pt/index.html>.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FCT, COMPETE, QREN e União Europeia (FEDER) pelo financiamento através dos seguintes projetos: PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/EME-MFE/099109/2008 e PTDC/SAU-ENB/116929/2010.

Referências

- [1] Gossett D. R., Weaver W. M., Mach A. J., Hur S. C., Tse H. T. K., Lee W., Amini H., Carlo D. D., Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem* 397, 3249–3267, 2010
- [2] Lima, R., Ishikawa, T., Imai, Y., Yamaguchi, T., In: *Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering*, Dias R, Martins A.A., Lima R., Mata T.M. (Eds) Bentham Science Publishers: Netherlands, 513–547, 2012
- [3] Garcia, V., Dias, R., Lima, R., *Applied Biological Engineering – Principles and Practice*, Ganesh R. Naik (ed.), InTech, 17, 394-416, 2012
- [4] Shevkoplyas S. S., Yoshida T., Munn L. L., Bitensky M. W., Biomimetic Autoseparation of Leukocytes from Whole Blood in a Microfluidic Device. *Anal. Chem.*, 77, 933-937

- [5] Hou H. W., Bhagat A. A., Chong A. G., Mao P., Tan K. S., Han J., Lim C. T., Deformability based cell margination - A simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation, *Lab Chip*, 10, 2605–2613, 2010
- [6] Fujiwara, H., Ishikawa T., Lima, R., Marsuki, N., Imai, Y., Kaji, H., Nishizawa, M., and Yamaguchi, T., Red blood cell motions in a high hematocrit blood flowing through a stenosed micro-channel. *Journal of Biomechanics*, 42, 838-843, 2009
- [7] Abkarian, M., Faivre, M., Horton, R., Smistrup, K., Best-Popescu, C. A., Stone, H. A., Cellular-scale hydrodynamics. *Biomed. Mater.* 3, 034011, 2008
- [8] Yang S., Undar A., Zahn J.D., A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation. *Lab Chip* 6:871, 2006
- [9] Leble V., Lima R., Dias R., Fernandes C., Ishikawa T., Imai Y., Yamaguchi T., Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation. *Biomicrofluidics* 5:044120, 2011
- [10] Yaginuma T., Oliveira M.S.N., Lima R., Ishikawa T., Yamaguchi T., Red blood cell deformation in flows through a PDMS hyperbolic microchannel, *Proceedings of NSTI-Nanotech 2011* (2) 505-507, 2011b
- [11] Novais S., Pinho D., Bento D., Pinto E., Yaginuma T., Fernandes C. S., Garcia V., Pereira A. I., Lima J., Mujika M., Dias R., Arana S., Lima R., “Cell-free layer (CFL) measurements in complex geometries: contractions and bifurcations.” In: *Visualizations and simulations of complex flows in biomedical engineering*. R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai & M. S. N. Oliveira (Eds), Springer, 2013
- [12] Faustino, V., Pinho, D., Yaginuma, T., Calhelha, R., Kim, G., Arana, S., Lima, R., Ferreira, I., Oliveira, M., “The influence of hyperbolic microchannels on red blood cells deformability: comparison between two different hyperbolic microchannels.” In: *Visualizations and simulations of complex flows in biomedical engineering*. Lima, R., Ishikawa, T., Imai, Y., and Oliveira, M. S. N. (Eds), Springer, 2013