

Análisis Numérico del Efecto de la Termoforesis para la Separación de Diferentes Poblaciones de Exosomas

A. Errarte¹, M. Aginagalde¹, A. Martín¹, E. González³, I. Iloro^{2,5}, J. M. Falcón-Pérez^{3,4}, F. Elorza^{2,5}, M. Bou-Ali¹.

1. ¹ Manufacturing Department, MGEP Mondragon Goi Eskola Politeknikoa, Loramendi 4 Apartado 23, 20500 Mondragon, Spain. (mbouali@mondragon.edu)
2. CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 801 A, 48160 Derio, Spain.
3. Exosomes Lab., CIC bioGUNE, CIBERehd, Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 801 A, 48160 Derio, Spain.
4. IKERBASQUE Research Foundation, Bilbao, Spain.
5. CIBERehd, ProteoRed-ISCHII.

Resumen

Los sistemas microfluídicos han demostrado ser una alternativa prometedora ante procesos convencionales de separación y caracterización. Este trabajo muestra el estudio numérico del fenómeno de la termoforesis en un microdispositivo para la separación de diferentes poblaciones de exosomas (vesículas entre 40-250nm liberadas por la mayoría de las células) en base a su tamaño. Empleando el software ANSYS Fluent v.16.0 se han analizado diferentes modelos geométricos del microdispositivo, gradientes de temperatura entre la pared superior e inferior y flujos de entrada, con el fin de determinar la trayectoria de los exosomas a través del dispositivo microfluídico y extraer las diferentes poblaciones. En base a los resultados obtenidos se muestra el dispositivo propuesto para la fabricación de un dispositivo eficiente.

1. Introducción

Las técnicas de detección y diagnóstico médico, como las técnicas de laboratorio han avanzado considerablemente durante los últimos años [1], [2]. Varios estudios han demostrado la importancia de la miniaturización en la biotecnología, por lo que los sistemas microfluídicos se han convertido en una prometedora alternativa a las técnicas de investigación y laboratorio convencionales; los volúmenes de muestras y reactivos utilizados en los experimentos son menores, debido a su tamaño los equipos son generalmente portátiles y se pueden realizar más de una acción simultáneamente obteniendo información cualitativa y cuantitativa reduciendo el tiempo de análisis [3].

En este escenario, el estudio de los exosomas está avanzando rápidamente ya que son vesículas de gran importancia como marcadores biológicos en el desarrollo de la biopsia de fluidos biológicos.

Los exosomas son pequeñas vesículas (40-250nm) liberadas al medio extracelular por la mayoría de los tipos celulares. Estas vesículas formadas por una bicapa lipídica pueden contener en su interior lípidos, proteínas, RNA mensajero (mRNA), micro RNA (miRNA), metabolitos o proteínas específicas de la célula que las libera [4], [5].

Durante las últimas décadas, los exosomas han sido considerados desechos celulares. El estudio de los componentes, en cambio, ha demostrado su gran potencial en el descubrimiento de marcadores biológicos que pueden ser directamente asociados con patologías como el cáncer o el Alzheimer, ya que trabajan como mensajeros celulares [4]. Además, pueden contener información relevante sobre el estado en el que se encuentra la célula, permitiendo definir la tipología, localización y grado de la patología.

Uno de los principales objetivos de la medicina preventiva aborda el desarrollo de nuevas técnicas de purificación que ayuden a analizar los marcadores biológicos de una manera rápida, barata y no invasiva [6], [7]. Por esta razón, los exosomas han sido extraídos por casi todos los fluidos corporales como la orina, el plasma o el líquido sinovial. No obstante, las técnicas de aislamiento actuales han dificultado el avance de las investigaciones debido a los largos y laboriosos procesos [4], [8], [9]. Con el objetivo de obtener una técnica de aislamiento rápida, fácil y barata, se ha diseñado un microdispositivo donde se han empleado gradientes de temperatura para direccionar, estratificar y separar diferentes poblaciones de exosomas en base a su tamaño.

La termoforesis es la generación de un gradiente de concentraciones inducido por un gradiente de temperatura. Este fenómeno es un transporte de partículas adicional a la difusión donde el flujo másico de una mezcla multicomponente se define como [10]:

$$\vec{J}_i = -\rho \left(\sum_{k=1}^{n-1} D_{ik} \nabla c_k + D'_{T,i} \nabla T \right) \quad i=1, \dots, n-1$$

donde \vec{J}_i es el flujo másico del componente i , ρ es la densidad de la mezcla, D_{ik} es el tensor de la difusión molecular, ∇c_k es el gradiente espacial de la fracción másica del componente k , $D'_{T,i}$ es el coeficiente de termodifusión del componente i , T es la temperatura y

∇T es el gradiente espacial de temperatura a través de la mezcla.

La magnitud representante del fenómeno de la termodifusión es el coeficiente Soret, que en una mezcla binaria se define como la relación entre el coeficiente de termodifusión y el coeficiente de difusión molecular, $S_T = D_T / D$.

Cuando una suspensión coloidal es posicionada ante un gradiente de temperatura, las partículas se desplazan hacia la zona caliente o fría a una velocidad de arrastre uniforme $v_T = -D_T \nabla T$, llegando a un estado estacionario de concentraciones [11], [12].

El coeficiente Soret puede ser positivo o negativo dependiendo de la dirección de desplazamiento del componente base. Cuando $S'_{T,i} > 0$, la suspensión se denomina termofóbica, donde el componente más denso se mueve hacia la zona fría, mientras que el componente menos denso se desplaza hacia la zona caliente. La opuesta y menos común tendencia de desplazamiento se define como termofílica. A consecuencia del desplazamiento de los diferentes componentes, se genera un gradiente de concentraciones y con el objetivo de homogenizar la mezcla, se genera otro flujo en la dirección opuesta debido a la difusión molecular.

En base a este fenómeno, este trabajo analiza numéricamente este estudio y propone un nuevo microdispositivo microfluídico para controlar el desplazamiento de los exosomas y separar diferentes poblaciones bajo el efecto del gradiente térmico.

2. Análisis numérico

El estudio numérico se ha llevado a cabo mediante el software ANSYS Fluent v.16.0. En primer lugar, se ha analizado la tendencia de desplazamiento de las vesículas ante un gradiente de temperatura. A continuación, se ha estudiado la extracción de los exosomas, y finalmente, en base a los resultados obtenidos se propone un dispositivo final para la fabricación. Durante todas las simulaciones se describen tres apartados diferentes: el dominio geométrico, el modelo numérico y el resultado.

2.1. Comportamiento del exosoma ante un gradiente térmico

Dominio geométrico

En primer lugar, con el fin de analizar la tendencia de desplazamiento de los exosomas ante el gradiente térmico, se ha ideado un canal rectangular bidimensional tal y como muestra la Figura 1.

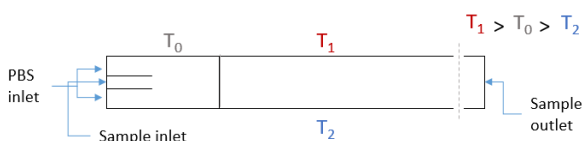


Figura 1: Esquema del microdispositivo estudiado.

En la entrada, se ha establecido un citómetro para limitar la zona de entrada de los exosomas y aplicar un gradiente

de temperatura homogéneo a toda la muestra. En cuanto a la altura, la cavidad central se ha establecido como 1/5 de la altura total del dispositivo donde se han analizado alturas diferentes: 50µm, 100µm, 200µm, 400µm, 800µm and 1600µm. Para la salida del flujo se ha establecido una única salida, ya que en esta primera simulación únicamente se va a analizar el perfil de desplazamiento.

Modelo numérico

La muestra de exosomas consta de una población de vesículas suspendida en PBS, previamente tratada y aislada de otros tipos celulares. En base a la naturaleza de la muestra, el modelo de simulación empleado ha sido el DPM, donde se ha definido una población de exosomas entre 40 y 250 nm [13], [14]. La muestra ha sido introducida por la cavidad central del citómetro a la misma velocidad que el fluido portador y una temperatura media de 298.16 K.

Las partículas suspendidas han sido estudiadas en el flujo laminar empleando el método Eulerian-Lagrangian, donde se ha analizado el desplazamiento de cada una de las vesículas.

La fase continua y discreta intercambian calor, masa y momento, pero la interacción entre las vesículas ha sido ignorada debido a su baja concentración, no obstante, la fuerza termoforética ha sido activada. Para la introducción del coeficiente de termodifusión se ha realizado un cambio de variable de acuerdo con el trabajo de Eslamian *et al.* [15], y se ha introducido empleando una Función Definida por el Usuario (UDF), definiendo el coeficiente de termodifusión en función del diámetro de las partículas [16]:

$$D_{T \text{ fluent}} = 6\pi \cdot \mu \cdot T \cdot D_{T \text{ exp}} \cdot \frac{P_{DIAM(p)}}{2}$$

donde μ es la viscosidad, $D_{T \text{ exp}}$ es el coeficiente de termodifusión experimental y $P_{DIAM(p)}$ es el diámetro de las partículas. Por otra parte, al tratarse de partículas submicrométricas, se ha activado la fuerza Saffman Lift.

Al mismo tiempo, se han definido las propiedades de los materiales presentes en la mezcla: exosomas y PBS. En el caso del fluido portador, fue determinado en el Laboratorio de Mecánica de Fluidos de Mondragon Unibertsitatea [17]. En cuanto a los exosomas, se ha partido de datos de moléculas sintéticas parecidas, los liposomas.

Para finalizar con el modelo numérico se han impuesto las condiciones de contorno y trabajo mostradas en la Tabla 1:

Tabla 1: Condiciones de contorno aplicadas.

Condiciones de contorno	
Pared Sup.	302.16 K
Pared Inf.	294.16 K
Citómetro	298.16
V. Entrada	Dependiente del caso
Outlet	Outflow=1

Con el fin de analizar diferentes separaciones se han definido varias velocidades de entrada, tanto del flujo portador como de la muestra. Se ha definido el parámetro $f_q = \frac{Q_c}{Q_r}$, relación entre el flujo de entrada del citómetro y el flujo total. Los valores empleados han sido 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025 para unas velocidades de entrada totales de 50, 100 y 200 ml/min, para cada una de las alturas de dispositivo estudiadas.

Resultados

Todas las simulaciones han mostrado un desplazamiento de las vesículas hacia la pared fría. En cuanto a la separación poblacional, solamente algunas condiciones hacen posible su separación (Figura 2).

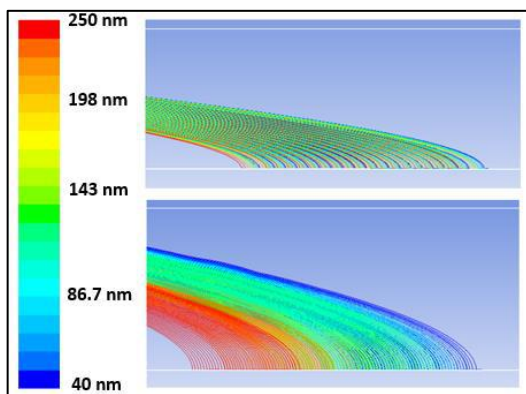


Figura 2: Desplazamiento de los exosomas hacia la pared fría (zona de precipitación).

Entre los casos donde se ha obtenido una separación poblacional, se ha realizado un estudio del grado de separación de cada uno, donde se ha visto que los casos con menor número de Reynolds y mayor relación de flujos de entrada, mayor es el grado de estratificación.

Aparte del grado de estratificación, se ha analizado también, el tiempo de separación seleccionando. Como ejemplo de un caso, donde la separación es alta y el tiempo de procesamiento es relativamente bajo (~ 1.5 h): 400 μm , flujo total de entrada debe ser de 100 ml/min y relación de flujos de entrada 0.025.

2.2. Extracción de los exosomas

Tras seleccionar las condiciones de trabajo idóneas, se ha simulado la extracción de las vesículas. Para ello, se ha empleado el mismo modelo realizando cambios en las condiciones de contorno respecto a las salidas.

Dominio geométrico

En este caso, se han establecido dos salidas en la pared inferior donde se precipitan las vesículas con el fin de extraer las vesículas de mayor tamaño desde la primera salida y las de menor tamaño desde la segunda (Figura 3).

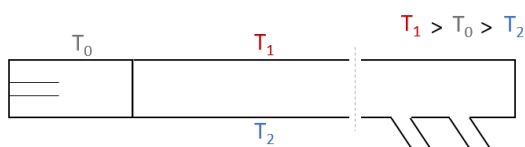


Figura 3: Microdispositivo de dos salidas simulado.

Modelo de simulación

Todos los parámetros descritos en el apartado anterior han sido mantenidos en excepción de las condiciones de entrada y salida que han sido ajustadas para direccionar las vesículas hacia las salidas. Para las condiciones de salida, se ha impuesto la condición *outflow* donde se ha de definir el porcentaje del flujo a extraer desde cada salida.

Resultados

Al analizar los resultados, se ha visto que las partículas tienden a desplazarse hacia la pared inferior, extrayendo las diferentes poblaciones desde cada una de las salidas. La mejor separación se ha obtenido al establecer un flujo total de un 5% en la salida inferior (condición *Outflow*). Además, se ha visto que los cambios en las condiciones de entrada permiten al usuario separar diferentes poblaciones (Figura 4).

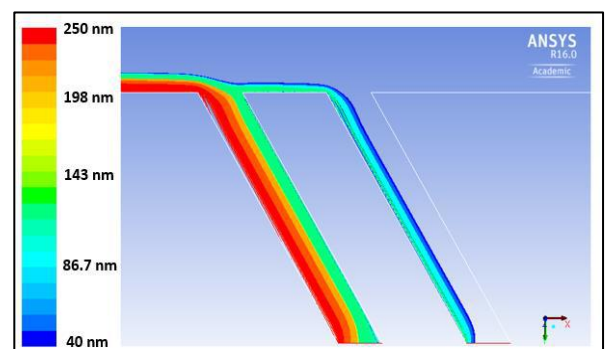


Figura 4: Resultado de simulación de dos salidas.

2.3. Estudio tridimensional

Finalmente, con el fin de definir las condiciones de contorno a emplear en las pruebas experimentales, se ha realizado un breve estudio tridimensional partiendo de la geometría anterior.

Dominio geométrico

Se ha empleado la misma geometría empleada para la extracción de los exosomas, donde se ha asignado un fondo de dispositivo de 200 μm .

Modelo de simulación

Para este modelo, se ha utilizado el modelo anterior, cambiando las condiciones de entrada y salida para direccionar las vesículas en dicha geometría.

Resultados

Como en los casos anteriores, se ha logrado separar dos poblaciones de exosomas (una entre 40-160nm y otra 160-250nm) (Figura 5). Para obtener buena separación se estableció una velocidad de entrada de 2.8 $\mu\text{m/s}$ para el PBS y 0.28 $\mu\text{m/s}$ para la muestra de exosomas (debido a la no linealidad del perfil de temperatura dentro del microdispositivo, ya que las paredes laterales se han mantenido en temperatura ambiente).

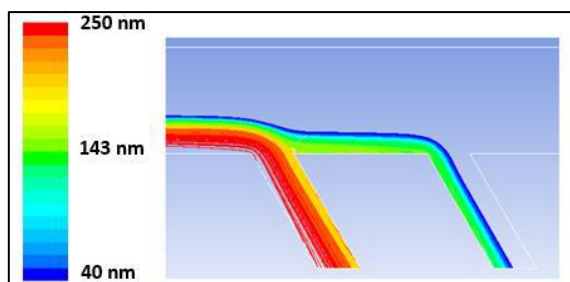


Figura 5: Resultado del estudio tridimensional.

3. Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado numéricamente el fenómeno de la termoforesis en una muestra de interés biológico con el fin de separar diferentes poblaciones de exosomas. En primer lugar, se ha estudiado el comportamiento de las vesículas ante un gradiente de temperatura. Tras definir su movimiento, se ha posicionado dos salidas para separar al menos dos poblaciones. En cuanto a las salidas, se ha visto que los cambios en las condiciones de contorno permiten al usuario extraer diferentes poblaciones de exosomas. Finalmente, se han deducido las condiciones de trabajo a emplear en las pruebas experimentales mediante un último estudio en un microdispositivo tridimensional.

Mediante este estudio, se ha demostrado que la termomodificación es un mecanismo eficiente para separar exosomas en comparación con técnicas convencionales empleadas hasta la fecha. Todas las técnicas y geometrías analizadas se resumen en el patente número P201631380. Actualmente, se está trabajando en los procedimientos experimentales para validar el modelo numérico.

Agradecimientos

La autora quiere agradecer la ayuda de BG2015(KK-2015/0000089), Research Groups (IT009-16) y MICROXON (PI_2014_1_70) del Gobierno Vasco y TERDISOMEZ (FIS2014-58950-C2-1-P) de MINECO.

Referencias

- [1] J. M. Köhler and T. Henkel, "Chip devices for miniaturized biotechnology," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 69, no. 2, pp. 113–125, 2005.
- [2] S. Clerc and B. Roussel, "Microfluidic Applications - Yole Development Market & Technology Report," 2015.
- [3] W. Yang, "Integrated Affinity Column Capillary Electrophoresis Microdevices for Biomarker Analysis," 2010.
- [4] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends," *J. Cell Biol.*, vol. 200, no. 4, pp. 373–383, 2013.
- [5] L. Palomo, E. Casal, F. Royo, D. Cabrera, S. van-Liemphd, and J. M. Falcon-Perez, "Considerations for applying metabolomics to the analysis of extracellular vesicles," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. DEC, pp. 23–26,

- 2014.
- [6] V. R. Minciocchi, M. R. Freeman, and D. Di Vizio, "Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 40, pp. 41–51, Apr. 2015.
- [7] H. C. Anderson, D. Mulhall, and R. Garimella, "Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis," *Lab. Investig.*, vol. 90, no. 11, pp. 1549–1557, 2010.
- [8] C. Théry, "Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications," *F1000 Biol. Rep.*, vol. 3, no. July, pp. 1–8, 2011.
- [9] C. Chen *et al.*, "Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles," *Lab Chip*, vol. 10, no. 4, pp. 505–511, 2010.
- [10] P. Blanco, M. M. Bou-Ali, J. K. Platten, D. A. De Mezquia, J. A. Madariaga, and C. Santamaría, "Thermodiffusion coefficients of binary and ternary hydrocarbon mixtures," *J. Chem. Phys.*, vol. 132, no. 11, 2010.
- [11] R. Piazza and A. Parola, "Thermophoresis in colloidal suspensions," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 20, no. 15, p. 153102, Apr. 2008.
- [12] A. Mialdun and V. Shevtsova, "Communication: New approach for analysis of thermodiffusion coefficients in ternary mixtures," *J. Chem. Phys.*, vol. 138, no. 16, 2013.
- [13] T. D. Canonsburg, "ANSYS FLUENT User's Guide," *ANSYS FLUENT User's Guid.*, vol. 15317, no. November, p. 2498, 2013.
- [14] T. D. Canonsburg, "ANSYS Fluent Theory Guide," vol. 15317, no. November, pp. 724–746, 2013.
- [15] M. Eslamian and M. Z. Saghir, "Novel thermophoretic particle separators: Numerical analysis and simulation," *Appl. Therm. Eng.*, vol. 59, no. 1–2, pp. 527–534, Sep. 2013.
- [16] M. Braibanti, D. Vigolo, and R. Piazza, "Does Thermophoretic Mobility Depend on Particle Size?," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, no. 10, p. 108303, Mar. 2008.
- [17] E. Lapeira *et al.*, "Transport properties of the binary mixtures of the three organic liquids toluene, methanol, and cyclohexane," *J. Chem. Phys.*, vol. 146, no. 9, 2017.