

Diseño y simulación de un filtro de células de tipo linfocitos *T* en un sistema de microfluidos

Design and Simulation of a T-Type Lymphocyte Cells Filter on a Microfluidic System

Desenho e simulação de um filtro de células de tipo linfócitos *T* em um sistema de microfluidos

Daniel A. Quiroga T.¹, Cristian M. Montenegro M.², Ana M. Leguizamón F.³

Recibido: 5 de noviembre de 2014 • Aceptado: 30 de abril de 2015

Doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud14.01.2016.02](https://doi.org/10.12804/revsalud14.01.2016.02)

Para citar este artículo: Quiroga TDA, Montenegro, MCM, Leguizamón FAM. Diseño y simulación de un filtro de células de tipo linfocitos *T* en un sistema de microfluidos. Rev Cienc Salud. 2016;14(1):21-28. doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud14.01.2016.02](https://doi.org/10.12804/revsalud14.01.2016.02)

Resumen

Este trabajo consistió en diseñar y validar, mediante simulación experimental por computadora, un sistema de filtraje de linfocitos *T* en un sistema basado en microfluidos para detección del virus del VIH. *Materiales y métodos:* se utilizó la herramienta de simulación AutoDesk® Inventor, con la cual se realizó el diseño del sistema de microfluídica. El sistema de filtraje se probó haciendo una simulación por computadora en la herramienta de simulación AutoDesk® Simulation CFD (computational fluid dynamics software) en la cual diferentes partículas con varios diámetros (5 μm , 10 μm , 15 μm) fluían por el sistema a probar. *Resultados y conclusiones:* los resultados demostraron que el sistema de filtraje permitió el paso de las partículas esperadas, sin embargo, se observó que permitió el paso de partículas más grandes que las deseadas, por lo cual hay que seguir trabajando en el perfeccionamiento del sistema. La eficiencia del sistema de filtraje fue de un 33,33 %.

Palabras clave: Microfluidos, sistema de filtraje, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

1 Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Grupo de Investigación de Ingeniería Biomédica (GIIB_UMB) de la Universidad Manuela Beltrán. Correo electrónico: danielquiroga_05@hotmail.com

2 Hospital Civil de Ipiales ESE. Grupo de Investigación de Ingeniería Biomédica (GIIB_UMB) de la Universidad Manuela Beltrán.

3 Microscopios y Equipos Especiales S.A.S. Grupo de Investigación de Ingeniería Biomédica (GIIB_UMB) de la Universidad Manuela Beltrán.

Abstract

This work consisted in designing and validating, by experimental computational simulation, a T-Lymphocytes filtering system based on microfluidics for HIV virus detection. *Material and methods:* It was used AutoDesk® Inventor simulation tool was used with which the microfluidic system design was performed. The filter system was tested by a computer simulation in the AutoDesk® Simulation CFD (computational fluid dynamics software, simulation tool in which different particles with different diameters (5 µm, 10 µm, 15 µm) flow through the system to test. *Results and conclusions:* Results showed that this system allowed to pass the expected particles, however, it also was observed that it allows bigger particles than desired, for this reason it is necessary to keep on working on system perfecting. Filtering system efficiency was of a 33.33 %.

Keywords: Microfluidics, Filtering system, Human Immunodeficiency Virus (HIV).

Resumo

Este trabalho consistiu em desenhar e validar, mediante simulação experimental por computador, um sistema de filtragem de linfócitos T em um sistema baseado em microfluidos para detecção do vírus do VIH. *Materiais e metodos:* utilizou-se a ferramenta de simulação AutoDesk® Inventor, com a qual se realizou o desenho do sistema de microfluídica. O sistema de filtragem provou-se fazendo uma simulação por computador na ferramenta de simulação AutoDesk® Simulation CFD (computational fluid dynamics software) na qual diferentes partículas com vários diâmetros (5 µm, 10 µm, 15 µm) fluíam pelo sistema a provar. *Resultados e conclusões:* Os resultados demonstraram que o sistema de filtragem permitiu a passagem das partículas esperadas, no entanto, se observou que permitiu a passagem de partículas mais grandes que as desejadas, pelo qual deve-se seguir trabalhando no aperfeiçoamento do sistema. A eficiência do sistema de filtragem foi de 33,33 %.

Palavras-chave: Microfluidos, sistema de filtragem, Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH).

Introducción

Según el último reporte emitido por el programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH/sida (por sus siglas en inglés, Unaid), en el año 2013, 35 millones de personas estaban infectadas con el VIH en el mundo. Sumado a esto, se presentaron 2,1 millones de casos nuevos y alrededor de 1,5 millones de muertes a causa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) para ese año (1). En 2012 se invirtieron 18900 millones de dólares para los programas de VIH en países de ingresos medios y bajos, de los cuales, aproximadamente, 9900 millones hacen parte del recurso nacional y 8900 millones corresponden a ayuda

internacional. El 55 % de los recursos se destinó al tratamiento y atención de pacientes, mientras que un 19 %, a programas de prevención de la enfermedad. La Unaid, por medio de su programa Tratamiento 2015, está planteando provisionar, para el año 2015, una inversión aproximada de 24000 millones de dólares destinada al tratamiento antirretroviral, ya que, por una parte, permite salvar vidas (o al menos prolongar la esperanza de vida de los afectados) de las personas que viven con este virus y, por otro lado, contribuye en gran medida a contener la propagación de la enfermedad (2, 3).

Para el caso específico de Colombia, se estima que, en el año 2013, 140000 personas estaban

infectadas con el VIH. Por otra parte, se presentaron para ese año 8700 casos nuevos y, aproximadamente, 6500 muertes a causa del SIDA (1). Según la Unaid, Colombia no tiene una alta dependencia de fuentes financieras internacionales para el tratamiento y prevención del VIH, ya que tiene, como máximo, una ayuda internacional del 24 %, comparado con otros países, valor que puede ascender hasta un 70 %, los fondos restantes proceden de los recursos nacionales (2). En el país se reportan 34280 personas en tratamiento antirretroviral, de las cuales solo el 26 %, actualmente, tienen cobertura por el sistema de salud y están recibiendo el tratamiento. Colombia es uno de los países donde la falta de cobertura a la población infectada que necesita tratamiento antirretroviral asciende al 90 % (1, 2).

Un problema actual en el tratamiento, es el diagnóstico tardío del virus, ya que cuanto más avanzada esté la infección, existe un mayor riesgo de enfermedad y, por ende, mayor mortalidad. A partir de lo anterior, se demostró que las pruebas domiciliarias puerta a puerta mejoraron el incremento en el número de personas que se realizan las pruebas de VIH. Sumado a esto, estas pruebas de diagnóstico rápido proporcionan un resultado en algo menos de treinta minutos y se pueden realizar en la privacidad del hogar. Sin embargo, se presentan problemas en esta iniciativa de los exámenes puerta a puerta, debido a sus costos altos, la falta de anonimato y la negación de la población a realizarse las pruebas de diagnóstico (2). Uno de los factores que podría contribuir a que las personas con VIH reciban un diagnóstico de manera más temprana y eficiente sería disminuir el costo de la prueba de diagnóstico.

Existen diferentes pruebas para el diagnóstico del VIH, las cuales incluyen anticuerpos y detección de antígenos. La prueba convencional de anticuerpos se realiza por el método ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Este consiste en realizar una marcación sobre

las células que poseen determinados antígenos con técnicas de fluorescencia. Con un láser proyectado sobre cada gota de sangre y un detector de fluorescencia se identifican las células infectadas por emisión de luz (4). En la prueba ELISA, el 50 % emite un positivo dentro de los veintidós días de la transmisión del VIH si la persona está infectada, 95 % dentro de las seis semanas después de la transmisión y cuenta con una sensibilidad mayor al 99,9 % (5). La prueba que funciona como validación de la anterior es la Western blot, esta técnica contiene los anticuerpos para una variedad de proteínas del VIH, cuando se combina con la prueba ELISA presentan una especificidad mayor al 99,9 %. Esta prueba presenta resultados indeterminados con infecciones tempranas de VIH o VIH-2 (5). Por otra parte, existen las pruebas rápidas de anticuerpos de la sangre o fluido oral que ofrecen un resultado en un intervalo de diez a veinte minutos; si el resultado es positivo, se solicita realizar una prueba estándar (ELISA y/o Western blot) (5).

Las pruebas rápidas presentan algunas desventajas como lo son el control de calidad en múltiples sitios, tiempo corto en la duración de la permanencia de la indicación del diagnóstico en los elementos de registro y lectura de los resultados, interpretación confusa en algunos casos, variación de eficacia según el fabricante, entre otras. De igual manera, las pruebas estándar presentan costos elevados, mayor tiempo para brindar un resultado, entre otras (6). Lo anterior lleva a la necesidad de la búsqueda constante de nuevos métodos de diagnóstico que logren resolver los aspectos antes planteados, siendo este el problema científico de interés.

Un interesante diseño, basado en un sistema de simulación de microfluidos, consta de cinco cámaras⁴ para llegar al diagnóstico del VIH y

4 Deposición de sangre, filtrado, rompimiento de membranas, detección de antígenos y anticuerpos y registro de resultados.

ha sido propuesto por Montenegro y col (7). Sin embargo, debido a que los diámetros de los cilindros usados en la cámara de filtrado son muy grandes, comparados con el tamaño de las células, y que se encontraban en una región de área muy pequeña entre la cámara de filtrado y del rompimiento de membranas (una alta densidad de cilindros), provocaba que, por un lado, las velocidades del fluido en las cámaras antes mencionadas fueran muy altas y, por otro lado, que el filtraje no fuera el correcto, ya que se dejaban pasar células muy grandes, teniendo, finalmente, en la cámara de detección células no deseadas. Todo esto provocaba que la especificidad del sistema propuesto no fuera el deseado.

Como es de esperar, el sistema de filtrado que se encuentra entre las cámara de deposición de la muestra y la de rompimiento de membrana es la piedra angular del sistema, ya que es el primer paso que permite que las células útiles (linfocitos *T*) puedan ser analizados para diagnosticar el VIH. Entonces, se debe procurar tener una cámara de filtrado altamente eficiente. Por tanto, el objetivo de este trabajo consistió en diseñar y validar, mediante simulación experimental por computadora, un sistema de filtraje de linfocitos *T* en un sistema basado en microfluidos⁵ para detección del virus del VIH.

Materiales y métodos

Se diseñó un modelo del sistema basado en microfluidos con el software Autodesk® Inventor, el cual constó, como mínimo, con tres cámaras. La primera de ellas es la cámara de deposición de sangre, en la que se colocará la muestra de sangre a evaluar. A continuación, se procedió a realizar el sistema de filtrado, partiendo del principio de desplazamiento lateral determinístico sugerido por Inglis, Herman y Vesey (8). Este

permite la filtración de elementos de diámetro del orden de los micrómetros (μm), según su tamaño en entornos microfluídicos a partir de un ordenamiento característico de cilindros, lo que permite que recorran un camino determinado y se lleve a cabo una selección específica de las estructuras de interés. En este caso en particular, el filtro estuvo compuesto por filas de cilindros ubicados perpendicularmente al paso del fluido, es decir, que el fluido pasa perpendicularmente al área transversal de los cilindros; este grupo de filas de cilindros tuvo un espesor de 10 mm. El espacio entre los cilindros se disminuyó gradualmente en todo su espesor hasta llegar un valor de 10 μm en la última fila, esto debido a que se deseó permitir solamente el paso de los linfocitos (9). Obviamente, el espacio entre los cilindros del filtro se disminuyó al aumentar gradualmente el diámetro de los cilindros desde 300 μm , en la primera fila, hasta 1 mm en la última fila (figura 1). Después de múltiples simulaciones, se decidió que esta cantidad de cilindros y su tamaño eran los más óptimos para la finalidad del filtro.

Después de realizar el modelo del filtro, se procedió a observar la simulación del flujo de sangre por el filtro. Para esto se utilizó el programa Autodesk® Simulation CFD (computational fluid dynamics software), el cual permite simular fluidos similares a las características físicas de la sangre, valores de velocidad, presión, tiempos de estadía en cada cámara del sistema, y permite modificar los parámetros tales como densidad del fluido, diámetro de las partículas y otras propiedades físicas de este (10).

Finalmente, se verificó la efectividad del filtro implementado en el sistema de Microfluídica, para esto se escogieron cinco partículas que recorrieron el sistema. Estas iban cambiando de diámetro, para observar el comportamiento del flujo por el filtro. Los valores de diámetros que se simularon fueron de 5 μm , 10 μm y 15 μm .

5 También llamado sistema basado en microfluídica.

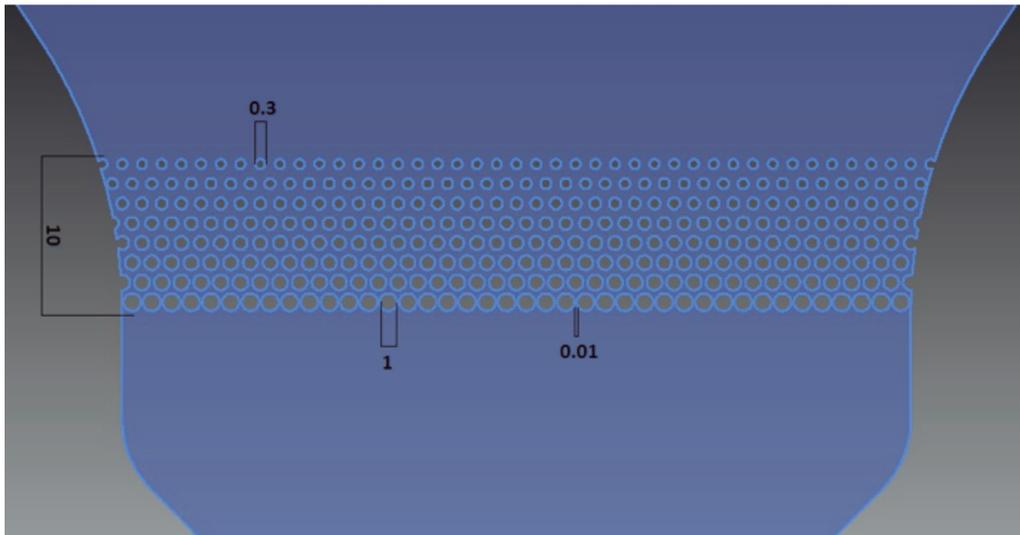


Figura 1. Filtro por gradiente del dispositivo

Resultados

En la figura 2 se observa el comportamiento de las partículas de sangre en el filtro cuando se

tiene un diámetro de $5\ \mu\text{m}$. Se puede observar que las cinco partículas pasan sin ningún problema por el sistema propuesto.

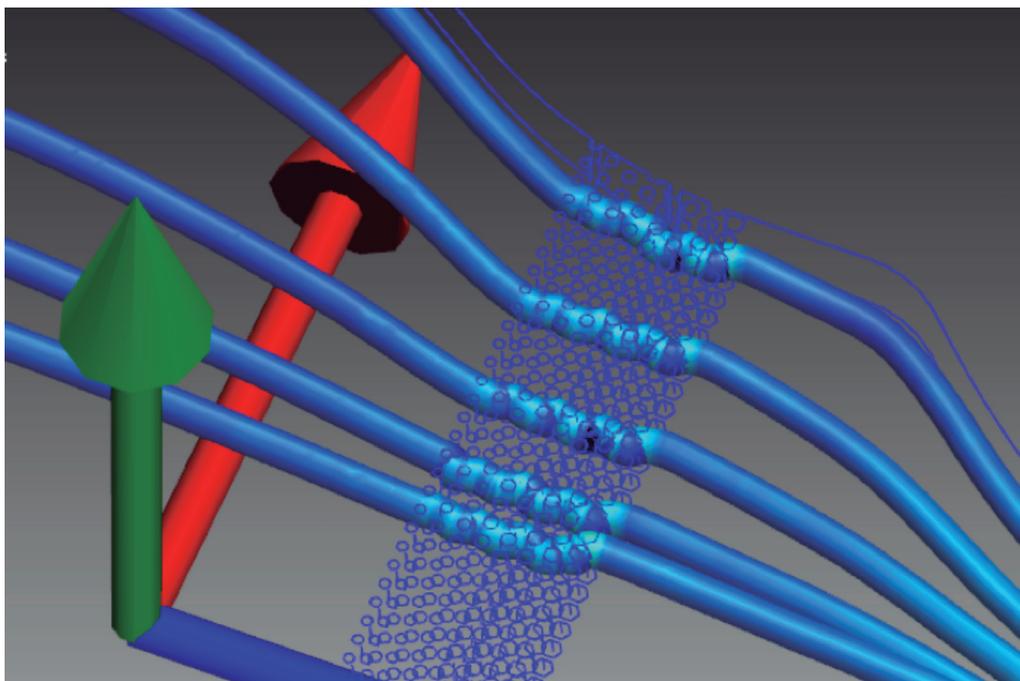


Figura 2. Partículas $5\ \mu\text{m}$ en el filtro

Para el caso de los 10 μm , se puede evidenciar, en la figura 3, que algunas partículas de sangre presentan un estrangulamiento en el filtro, pero, de igual manera que en el caso anterior, todas las partículas se dirigen a la siguiente fase.

Para el último caso, en la figura 4, se observan las partículas de sangre de 15 μm . De igual manera, se ve que dos de las cinco partículas no atraviesan por el filtro, mientras que las tres restantes modifican su forma para poder pasar.

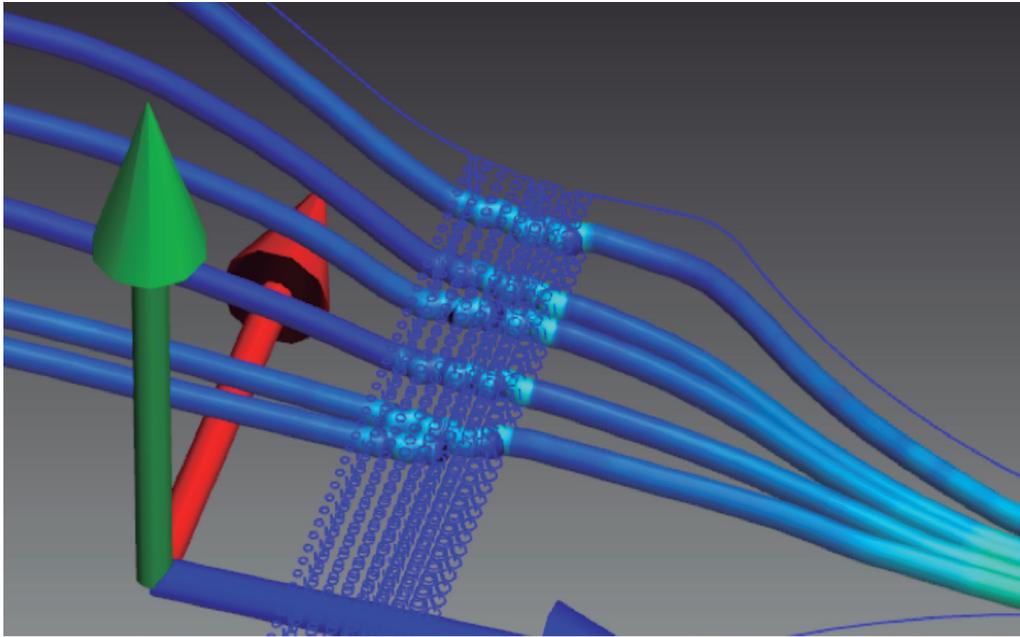


Figura 3. Partículas 10 μm en el filtro

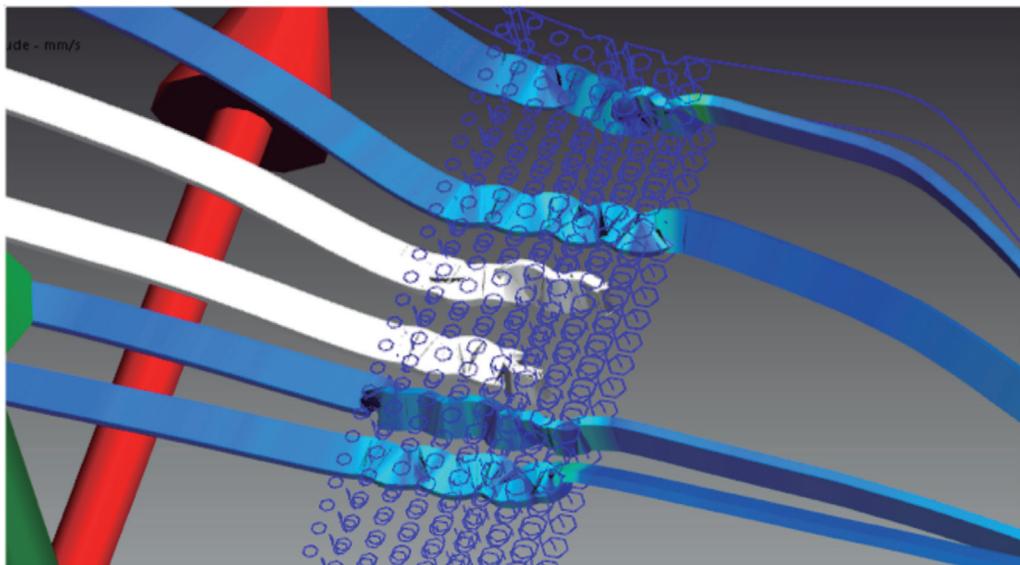


Figura 4. Partículas 15 μm en el filtro

Si se tiene en cuenta la cantidad de partículas que fueron detenidas en el sistema, se encuentra que la eficacia del filtro solamente es de un 33,33 %. Este valor se encuentra a partir de la razón de la cantidad de partículas detenidas, sobre el total de partículas que pasaron por el filtro, por último se multiplica por 100 para tener el valor en porcentaje.

Discusión

Es posible que el comportamiento de los componentes sanguíneos se vea afectado por la forma de los conductos o espacios dispuestos dentro del filtro. Si es así, la filtración será realizada de forma incorrecta dentro del dispositivo, lo que permitirá el paso de partículas innecesarias hacia las etapas posteriores, lo que ocasiona un retardo en el proceso total hasta la obtención del resultado o, incluso, un error en este (falso positivo o falso negativo).

Tal como sugieren Pries, Secomb, Gaehtgens y Gross y Guo, Duffy, y su equipo, las células sanguíneas modifican su posición e incluso su estructura al encontrarse en ambientes de microcirculación, con tal de garantizar la existencia de flujo (11, 12). A pesar de que dentro de las experimentaciones se resalta cuáles condiciones de fenómenos reológicos no son tenidas en cuenta, los resultados arrojan datos significativos que sugieren que el comportamiento de componentes celulares en la sangre se ve afectado por el diámetro de los vasos por donde esta transita. Si bien, fue posible observar, a partir de las simulaciones, que, efectivamente, las células sanguíneas pueden cambiar su trayectoria, debido a este motivo, la efectividad del filtro implementado en esta investigación es solo del 33,33 %. Se evidencia la necesidad de replantear el diseño del filtro e implementar pruebas en prototipos reales para verificar su validez.

Así, el paso a seguir con el dispositivo es la simulación bioquímica de la ruptura de membrana

y la detección de virus por medio de un Software que permita observar estas reacciones. A partir de estos resultados, se puede realizar el prototipo de un sistema de microfluidos para la detección del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Es claro indicar que los resultados obtenidos en las simulaciones representan un comportamiento ideal bajo condiciones estables, sin embargo, corresponden a un punto de partida apropiado para la determinación de generalidades que puedan considerarse ventajas o desventajas a la hora de fabricar el dispositivo, principalmente, con respecto a características estructurales de este.

Conclusiones

Se puede concluir que el diseño del filtro propuesto para el sistema de microfluidos en este trabajo no es el adecuado para la detección del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), ya que su eficiencia es de solamente del 33,33 %.

Por otra parte, se debe tener en cuenta el cambio de posición y estructura de las células sanguíneas en el momento de rediseñar el filtro, para aumentar su eficiencia. Esto se debe realizar con el fin de evitar resultados erróneos.

Por último, por medio de la simulación, se puede comprobar que el funcionamiento del dispositivo es el que se está buscando, llegado el caso que no sea así, se pueden realizar cambios hasta encontrar un diseño final, el cual podrá ser fabricado, lo que permite reducir costos en la construcción del dispositivo.

Agradecimientos

Agradecemos al Ingeniero Camilo A. Rojas Cifuentes por su constante apoyo, su paciencia, y por compartir sus conocimientos para que fuera posible la realización de esta investigación.

Descargos de responsabilidad

La responsabilidad de las opiniones expresadas en este artículo incumbe exclusivamente a sus

autores. Este trabajo es inédito, original y se realiza a partir de la tesis de pregrado "Diseño y simulación de sistema de microfluídica para detección de virus de inmunodeficiencia humana a partir de sangre" de la universidad Manuela Beltrán del Grupo de Investigación de Ingeniería Biomédica (GIIB_UMB). El tema ha sido presentado en el Pan

American Health Care Exchanges (pahce) en el año 2013 para conferencia entre el 29 de abril y 4 de mayo. También se expuso este tema en el ii seminario de tendencias en Tecnologías Biomédicas de la Universidad Manuela Beltrán el 30 de mayo de 2013.

Referencias

1. Unaid. The GAP Report 2014: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Ginebra: Unaid; 2014.
2. Unaid. Global report: Unaid report on the global AIDS epidemic 2013: Join United Nations Programme on HIV/AIDS. Ginebra: Unaid; 2013.
3. ONUSIDA. Tratamiento 2015: Programa conjunto de las naciones unidas sobre el VIH/SIDA. Ginebra: Unaid; 2013.
4. Crowther JR. The ELISA Guidebook. 1.ª ed. Estados Unidos: Humana Press; 2001.
5. Katz MH, Komarov L. HIV Infection & AIDS. In: Papadakis MA, McPhee SJ, Rabow MW. eds. Current Medical Diagnosis & Treatment 2015. New York, NY: McGraw-Hill; 2014
6. Unicef. HIV diagnosis: a guide for selecting rapid diagnostic test (RDT) kits. Copenhagen: Unicef; 2008.
7. Montenegro C., Leguizamón A., Quiroga D., Rojas C. Design, simulation and characterization of microfluidic system for human immunodeficiency virus detection. Health Care Exchanges (PAHCE). 2013;29:1-6.
8. Inglis W, Herman, N, Vesey, G. Highly accurate deterministic lateral displacement device and its application to purification of fungal spores. Biomicrofluidics. 2010;4(2),24109:1-8
9. Gartner LP, Hiatt JL. Histología Texto y Atlas. 5.ª ed. Chile: McGraw-Hill; 2011.
10. Autodesk. Autodesk Simulation CFD. [internet]. 2013 [citado 2015 ago 8]. Disponible en: <http://www.autodesk.com/products/simulation-cfd/overview>.
11. Axel RP, Timothy WS. Blood Flow in Microvascular Networks, In Microcirculation. 3.ª ed. San Diego: Academic Press; 2008.
12. Quan Guo, Simon P. Duffy, Kerry Matthews, Aline T. Santoso, Mark D. Scott, Hongshen Ma. Microfluidic analysis of red blood cell deformability. Biomechanics. 2014;47(8):1767-76.