



## Fabricación de un Biosensor de Celda Microfluídica para la Estandarización de Muestras de ADN Metilado en Individuos con Obesidad y Diabetes.

P. Arenas-Márquez<sup>1</sup>, N. Hernández-Como<sup>2</sup>, J.L. Hernández-López<sup>3</sup>, N.M. Pérez-Vielma<sup>4</sup>, H. González-Martínez<sup>2</sup>, A. Milar-García<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional.

<sup>2</sup> Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías. Instituto Politécnico Nacional.

<sup>3</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, Parque Tecnológico Querétaro.

<sup>4</sup> Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud. Unidad Santo Tomás. Instituto Politécnico Nacional.

\*angel.miliar@yahoo.com.mx

**Resumen**— La integración de técnicas de microfluídica y plataformas de detección de resonancia de plasmones superficiales (SPR) tiene la ventaja de contar con una gran sensibilidad en tiempo real en la detección de bajas concentraciones de ADN. El presente trabajo tiene como objetivo la fabricación de un biosensor que al combinar una celda microfluídica sobre un sensor de SPR permita la estandarización de muestras para determinar la metilación de los genes FTO y ABCC8 (SUR 1) empleando este. Las muestras fueron amplificadas a partir de sangre periférica de individuos con obesidad y diabetes. El biosensor de celda microfluídica fue fabricado mediante técnicas de microfabricación utilizando Polidimetilsiloxano (PDMS) y un vidrio con películas delgadas de Cr/Au. El cual funciona a partir de una muestra de al menos 20  $\mu$ l y permite detectar ADN en una concentración del orden de nanogramos por microlitro.

**Palabras clave**—Celda microfluídica, Diabetes, Metilación, Obesidad.

### I. INTRODUCCIÓN

La epigenética ayuda a explicar los mecanismos no dependientes de la secuencia genética por los que los nutrientes y otros factores ambientales contribuyen a regular la expresión de los genes. Su naturaleza reversible abre la puerta no sólo a comprender, sino también a tratar enfermedades de origen poligénico y multifactorial, como son la obesidad y la diabetes. Producto de la relativa facilidad de análisis de genes específicos, la metilación del ADN es la más ampliamente estudiada en investigaciones que relacionan los efectos sobre la salud de los cambios epigenéticos, incluyendo la obesidad. La metilación del ADN es una modificación química de la estructura inducida por grupos de enzimas conocidas como ADN metil transferasas que unen covalentemente un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) al carbono 5 de la citosina. Se le ha asociado a procesos metabólicos clave relacionados con la obesidad y diabetes [1].

Esto puede ser una poderosa herramienta para entender la etiología y tratamiento de muchas enfermedades y a medida que se conozcan los cambios específicos que caracterizan a cada condición patológica podremos entender mejor los mecanismos y determinar conductas más eficaces para asegurar la salud del humano [2].

Durante las últimas décadas, el desarrollo de la biotecnología ha realizado diferentes estudios para comenzar

a atender las necesidades de desarrollar dispositivos para el diagnóstico molecular, que sean de alto rendimiento, miniaturizados y capaces de ser producidos de forma masiva, para cumplir con tal fin, se ha explotado el área de biosensores [3].

La fabricación y aplicación de biosensores presenta mecanismos de detección de un amplio rango de biomoléculas de interés en la industria y en el diagnóstico clínico, a través de diversos fenómenos físicos como la variación de masa, de esfuerzo de resistencia y del índice de refracción. Por lo que la detección de la metilación es un punto esencial, existen diferentes métodos de detección como técnicas de biología molecular, estrategias basadas en la electroquímica, en transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET), en la detección óptica, en la fluorescencia, en electroquimioluminiscencia (ECL), en la espectrometría de masas (MS), en nanoporos, Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), basados en inmuno-reconocimiento específico y resonadores de anillo óptico (OFRRs) [4].

Este grupo de trabajo realizó previamente ensayos de interacción con la microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D) donde fue posible detectar ADN metilado, en el que se observan diferencias en la curva de frecuencia y disipación entre las muestras cuando se someten a una digestión con una enzima de restricción que reconoce sitios metilados. Recientemente se han integrado dispositivos de microfluídica con plataformas de detección de plasmones superficiales (SPR). Las ventajas de esta integración van desde el empleo de volúmenes mínimos y procesamiento rápido, hasta el aumento de la eficiencia en la detección con diseños específicos y adecuados; como el aquí presentado [5,6].

La técnica de resonancia de SPR aprovecha una propiedad óptica menos conocida de los metales, y es que bajo ciertas condiciones la luz puede viajar por las superficies metálicas sin alejarse de ellas. Esta es una propiedad muy peculiar, ya que en condiciones normales la luz viaja por las tres dimensiones del espacio y no se le confina con facilidad. Al confinar la luz en la superficie del metal se genera una onda que no consiste sólo en un campo electromagnético, sino que involucra también los electrones libres presentes en los metales. A estas ondas superficiales se les conoce como plasmones superficiales [7]. SPR es una técnica analítica muy potente a la hora de monitorizar con gran sensibilidad y en

tiempo real interacciones moleculares superficiales. Al utilizar la técnica de SPR es posible medir el cambio en el índice de refracción del entorno dieléctrico sobre la superficie de un metal [8].

Por otro lado, un biosensor a base de una celda microfluídica permite la manipulación de líquidos en espacios de escala micrométrica. En la actualidad, la microfluídica ha cobrado importante relevancia en el área de investigación como plataforma para el desarrollo de nuevos sistemas analíticos de ensayos biológicos portátiles y aplicaciones en la industria farmacéutica, química, energética y biotecnológica entre muchas otras. Al combinar la técnica de SPR con una celda microfluídica podemos pensar en desarrollar biosensores con una gran sensibilidad en la detección de pequeños grupos moleculares, con un bajo consumo de reactivos, muestras y energía en un mínimo espacio [9]. El presente trabajo tiene como objetivo la fabricación de un biosensor al combinar una celda microfluídica sobre un sensor de SPR.

## II. METODOLOGÍA

La metodología usada consistió en 3 etapas.

En la primera etapa la celda microfluídica se fabricó en tres pasos principales que se muestran en la Fig. 1:

a) Se realizó el molde para dos microcanales sobre una oblea de silicio, en el cual se deposita mediante centrifugación la resina negativa SU-8 3050, obteniendo un espesor de 100  $\mu\text{m}$ . Este proceso se realiza al transferir hacia la resina un patrón de dos líneas paralelas (2mm x 7mm) separadas por una distancia de 8 mm (figura 1a). Estas dimensiones están determinadas por la posición y dimensión del doble haz que utiliza el equipo NanoSPR6-321.

b) Se obtiene la celda microfluídica a base de Polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184. Para evitar que el PDMS se derrame sobre toda la oblea, este paso requiere colocar paredes sobre la oblea de silicio cercando a los microcanales. Las paredes cubren un área 2cm x 2cm con una altura de 1 cm y se obtienen a través de una impresora 3D. Una vez colocadas las paredes, el PDMS se vacía en el volumen delimitado por las paredes y la oblea. Adicionalmente se coloca una tapa con cuatro tubos de 0.8 mm de diámetro y 3 cm de largo que definen las líneas de entrada/salida a los microcanales como se presenta en la Fig. 1b. El secado del PDMS se realiza en un horno a 95 °C por 3 horas.

c) A un vidrio, de 2.54cm x 2.54cm e índice de refracción de 1.61, se depositan 5 nm de cromo y 45 nm de oro con un evaporador de metales en alto vacío ( $1 \times 10^{-6}$  Torr). En la Fig. 1c, se muestra como el vidrio con Cr/Au se une al bloque de PDMS. La adhesión entre ambas partes sucede al someter ambas superficies con el equipo UV/ozono ProCleaner durante 5 minutos. La Fig. 1c resalta en el bloque de PDMS los microcanales y las líneas de entrada/salida. El volumen total (tubo de entrada + microcanal + tubo de salida) es igual a 20  $\mu\text{l}$ .

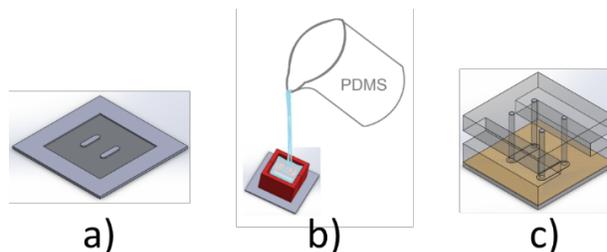


Fig. 1. Proceso de fabricación del biosensor de celda microfluídica.

En la Fig. 2 se observa la celda microfluídica una vez finalizado el proceso de manufactura, donde además se muestra la posición donde se encuentran los microcanales de 100  $\mu\text{m}$  de altura.

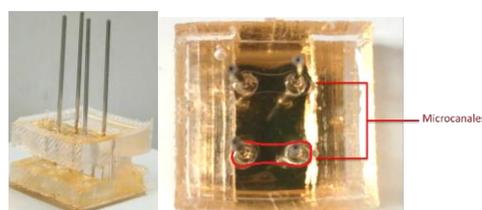


Fig. 2. Imagen del biosensor una vez finalizado.

La segunda etapa consistió en realizar la extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo y posteriormente se empleó la técnica de bisulfito, la cual convierte las regiones de ADN metiladas. Se amplificaron las regiones de los genes FTO y ABCC8 (SUR1) metilados y el gen CAT como control sin metilar, mediante PCR punto final. Posteriormente, las muestras fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con un peso de 101pb para FTO, 257pb para ABCC8 (SUR 1) y de 449 para CAT. Después se purificaron y cuantificó su concentración. Por último se ajustaron las concentraciones de los genes a 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 y 5.5 ng/ $\mu\text{l}$  para realizar la estandarización mediante el biosensor de celda microfluídica. Dichas concentraciones fueron utilizadas y validadas previamente en la QCM-D, mostrando cambios importantes en frecuencia y disipación.

La tercera etapa consistió en la medición de SPR, la cual se llevó a cabo con el equipo NanoSPR6-321 utilizando un prisma de retroflexión trapezoidal. Cada espectro de SPR se obtiene en el rango de 55.5° a 65.5°. Para verificar el funcionamiento de la celda microfluídica, se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de sacarosa (0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 g/ml) diluidas en agua desionizada. De manera similar se realizan las mediciones de SPR con las diferentes concentraciones de los genes FTO, ABCC8 (SUR 1) y CAT. El volumen inyectado por solución y agua es de 20  $\mu\text{l}$ . En todas las mediciones se utilizó únicamente un microcanal.

## III. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las mediciones SPR para cada concentración de sacarosa se muestran en la Fig. 3. Estas mediciones se obtuvieron al inyectar la sacarosa de menor a mayor concentración. Las mediciones con sacarosa permiten

validar el funcionamiento de la celda microfluidica fabricada, así como la confianza en las mediciones obtenidas por SPR. Con estos resultados se pudo observar que la celda microfluidica no presenta fugas y que es necesario controlar la presión con que se inyecta el líquido para evitar desprender el PDMS del vidrio con Cr/Au.

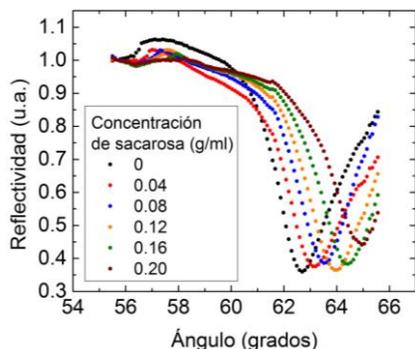


Fig. 3. Curvas de SPR para la sacarosa.

Una vez obtenidos los resultados con sacarosa, se procedió a realizar las estandarizaciones de SPR con los genes propuestos. En Fig. 4 se observan los resultados de la estandarización obtenidos al realizar las mediciones de los genes metilados FTO y ABCC8 (SUR 1) y del gen CAT como control, sin metilar. Para la medición de cada gen, las concentraciones realizadas fueron preparadas in-situ a temperatura ambiente.

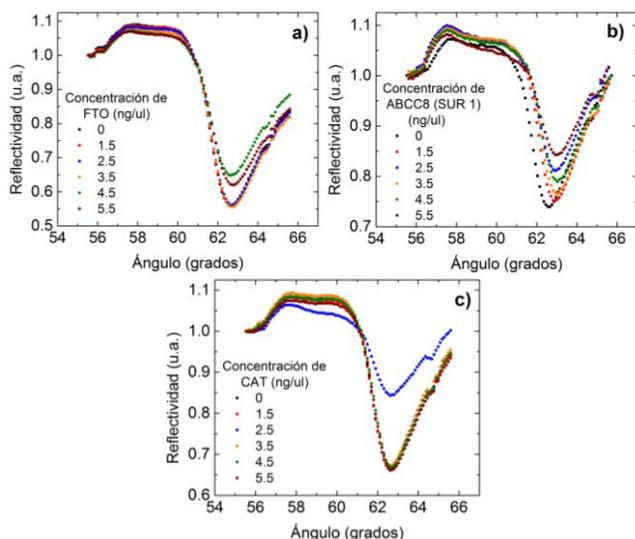


Fig. 4. Curvas de SPR para a) FTO, b) ABCC8 (SUR 1) y c) CAT.

#### IV. DISCUSIÓN

Las curvas presentadas en la Fig. 3, muestran las concentraciones de sacarosa obtenidas en las mediciones SPR observando un corrimiento proporcional a la concentración. Este corrimiento está asociado con el cambio en el índice de refracción del medio que está por arriba de la superficie metálica del oro. Para corroborar esto, cada espectro de SPR

fue simulado con el programa WinSpall 3.02 utilizando la estructura multicapa siguiente: vidrio/Cr/Au/solución. En esta estructura el vidrio incluye el prisma trapezoidal, un fluido óptico para unir el sensor con el prisma y el vidrio del sensor, todos tienen el mismo índice de refracción de 1.61. Los espesores y constantes ópticas del Cr/Au se obtienen de la literatura. De acuerdo a la simulación, el espesor del Cr y del Au es de 1.62nm y 43.44nm, respectivamente. Ambos valores están por debajo de los valores de 5nm y 45nm, lo cual es totalmente tolerable y se deriva del error del equipo de medición de espesores utilizado durante el depósito de cada metal. Una vez que se ajusta la primera curva (sacarosa 0 g/ml) con el programa WinSpall, la única variable en la simulación es el índice de refracción de la solución. De esta manera obtenemos una variación lineal del índice de refracción.

La Fig. 5 muestra esta variación, con lo cual afirma que el biosensor está calibrado para poder detectar soluciones con concentraciones de sacarosa desconocidas en función del ángulo de SPR que se mida. Un ajuste lineal a la curva de índice de refracción vs. concentración de sacarosa permite determinar que la pendiente, que indica el incremento en el índice de refracción con la concentración de sacarosa, es de 0.115 con un coeficiente de determinación (R2) de 0.9992.

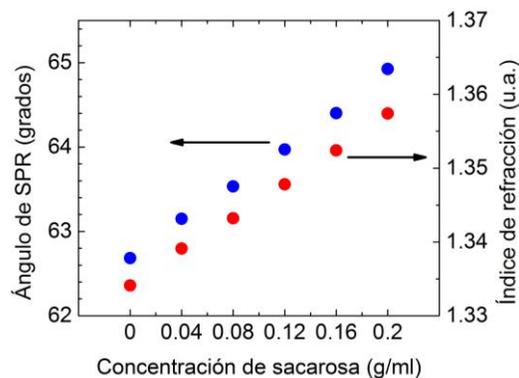


Fig. 5. Variación del ángulo de SPR y del índice de refracción con la concentración de sacarosa

Por otro lado, en las mediciones por SPR de los genes, se puede observar una variación del ángulo de SPR mucho menor respecto a lo obtenido con la sacarosa (Fig. 4). Lo anterior se debe al uso de menores concentraciones en el caso de los genes.

La variación del ángulo de SPR con la concentración de cada gen se muestra en la Fig. 6. Las variaciones obtenidas demuestran la detección de diversas concentraciones de los genes metilados FTO y ABCC8 (SUR 1) y del gen CAT como control. El ángulo de SPR no es consistente con una variación totalmente lineal. Lo anterior está asociado a dos fenómenos: 1) cantidad de masa presente en la superficie del oro y 2) absorción de los genes en la superficie sin posibilidad de removerlos durante cada enjuague. El primer fenómeno podría afectar menos al gen ABCC8 en comparación con los otros dos, mientras que el segundo fenómeno afecta a los tres

genes. Esto podría significar que, al realizar las mediciones de manera secuencial, utilizando un solo microcanal, la superficie del oro va absorbiendo parte de los genes lo que agrega un error en las mediciones.

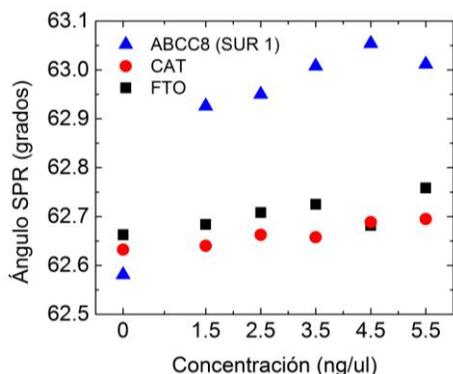


Fig. 6. Variación del ángulo de SPR con la concentración de los genes ABCC8 (SUR 1), FTO y CAT.

Lo anterior no permite obtener por ahora más información tal como el índice de refracción ya que el patrón de las curvas es complejo. Una forma de mitigar estos fenómenos es utilizar un microcanal por concentración de un gen o realizar un enjuague con otra solución diferente al agua para garantizar una superficie limpia. En la literatura se encuentran trabajos previos en los que mediante SPR se ha usado ADN como analito; específicamente ADN fetal, productos de PCR de *E. coli* y ADN genómico. En cuanto al empleo de SPR para la detección de secuencias de ADN metilado, se han empleado nanopartículas de oro unidas a ADN monohebra que contiene un dominio para la hibridación específica con secuencias de ADN metiladas obtenidas de líneas celulares de cáncer. Así mismo, se ha reportado un chip de inmunoensayo de secuencia específica basado en microfluidica para la evaluación de la metilación de oligonucleótidos sintéticos de ADN. Sin embargo, este es el primer trabajo en el cual se han detectado diferentes concentraciones de ADN metilado, concretamente los genes FTO y ABCC8 (SUR 1) obtenidos de muestras sanguíneas de individuos con obesidad y diabetes [10, 11, 12].

## V. CONCLUSIÓN

Se presenta un proceso de fabricación de un biosensor de celda microfluidica compatible con la técnica de SPR. Los resultados obtenidos demuestran que es posible realizar la detección de genes metilados tales como el FTO y el ABCC8 (SUR 1) asociados con la obesidad y la diabetes, respectivamente. La ventaja de este tipo de biosensor es que la cantidad de muestra es mínima (<20  $\mu$ l) y la sensibilidad es alta (concentraciones del orden de ng/ $\mu$ l).

Hasta ahora, es la primera vez que se reporta la interacción de secuencias de ADN codificantes con una superficie funcionalizada y detectadas por SPR. Esto nos permite tener como perspectiva la aplicación a futuro de este

biosensor para la detección de diversos genes metilados relacionados con obesidad y diabetes en seres humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Milagro, F. I., Martínez, J. A. "Epigenética en obesidad y diabetes tipo 2: papel de la nutrición, limitaciones y futuras aplicaciones", *Endocrinología y Diabetes*, pp. 108, 2013.
- [2]. Park, S. S., Skaar, D. A., Jirtle, R. L., Hoyo, C. "Epigenetics, obesity and early-life cadmium or lead exposure", *Epigenomics*, Vol 9, no. 1, pp. 57-75, 2017.
- [3]. Godber, B., et al. "Profiling of molecular interactions in real time using acoustic detection". *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22 (9) 2382-2386.
- [4]. Zahra Taleat, Klaus Mathwig, Ernst J.R. Sudhölter, Liza Rassaei, "Detection strategies for methylated and hypermethylated DNA", *Trac*, vol 66, pp. 80-89, 2015.
- [5]. Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ, "DNA biosensors and microarrays", *Chem. Rev.*, Vol 108, no. 1, pp. 109-139, 2008.
- [6]. Wang DS, Fan SK, "Microfluidic surface plasmon resonance sensors: From principles to point-of-care applications", *Sensors*, Vol 16, no. 8, pp. 1175, 2016.
- [7]. Lee, K.-S., Son, J.M., Jeong, D.-Y., Lee, T.S., Kim, W.M., "Resolution Enhancement in Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Waveguide Coupled Mode by Combining a Bimetallic Approach", *Sensors*, Vol 10, pp. 11390-11399, 2010.
- [8]. Hemmi, A., et al. "Development of a novel two dimensional surface plasmon resonance sensor using multiplied beam splitting optics", *Sensors*, Vol 13, pp. 801-812, 2013.
- [9]. Lee H, Xu L, Koh D, Nyayapathi N, Oh KW, "Various On-chip sensors with microfluidics for biological applications", *Sensors*, Vol 14, no. 9, pp. 17008-17036, 2014.
- [10]. Masson JF., "Surface plasmon resonance clinical biosensors for medical diagnostics", *ACS Sensors*, Vol 2, no. 1, pp. 16-30, 2017.
- [11]. Kurita R, Yanagisawa H, Yoshioka K, Niwa O., "On-Chip sequence-specific immunochemical epigenomic analysis utilizing outward-turned cytosine in a DNA bulge with handheld surface plasmon resonance equipment", *Anal Chem*, Vol 17;87, no. 22, pp. 11581-6, 2015.
- [12]. Chen K, Zhang M, Chang YN, Xia L, Gu W, Qin Y, Li J, Cui S, Xing G., "Utilizing gold nanoparticle probes to visually detect DNA Methylation", *Nanoscale Res Lett*. 2016 Dec; 11(1):304.