



ESTADO DEL ARTE EN LA MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS EMPLEANDO DIELECTROFORESIS

STATE OF THE ART ON PROTEIN MANIPULATION EMPLOYING DIELECTROPHORESIS

L.D. Garza-García¹ y B.H. Lapizco-Encinas^{2*}

¹Centro de Biotecnología, Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. Ave. Eugenio Garza Sada
2501 Sur, Monterrey, NL 64849, México.

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Monterrey, Vía del Conocimiento
201, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, Autopista Monterrey-Aeropuerto km 9.5,
Apodaca NL, 66600, Mexico.

Recibido 8 de Abril 2010; Aceptado 4 de Junio 2010

Resumen

Los microsistemas para análisis o laboratorios montados en un microdispositivo están tomando cada vez mayor importancia en el campo de las bioseparaciones. Estos microsistemas pueden realizar todas las funciones de un equipo de laboratorio convencional, con las ventajas de realizar el análisis más rápido, requerir menos muestra y ser portátiles. Existe un interés creciente en el desarrollo de técnicas de bioseparación aplicables en microescala. Entre las técnicas más utilizadas en microescala se encuentra la dielectroforesis. La dielectroforesis consiste en el movimiento de partículas, resultado de la polarización inducida por campos eléctricos no uniformes. Es un método de respuesta rápida con selectividad suficiente para la manipulación y separación de biopartículas, tales como microorganismos y biomoléculas (proteínas y ADN).

Debido a la gran importancia de las proteínas en los procesos biotecnológicos y farmacéuticos, este artículo presenta un análisis de los avances alcanzados en procesos de separación, concentración y purificación de proteínas empleando la técnica de dielectroforesis en microdispositivos. Se incluyen los logros obtenidos por importantes grupos de investigación alrededor del mundo en el uso de esta técnica en microescala para la manipulación de partículas de proteínas. Se seleccionaron estratégicamente importantes grupos de investigación y sus resultados con el objetivo de mostrar al lector el panorama sobre el estado del arte en el empleo de la técnica de dielectroforesis para la manipulación y concentración de proteínas en microdispositivos.

Palabras clave: proteínas, dielectroforesis, microescala, microsistemas, microdispositivos, bioseparaciones.

Abstract

Microanalytical systems or lab-on-a-chip devices are becoming more important in the field of bioseparations. These microsystems are able to handle the same tasks as conventional lab equipments with the advantages of faster analysis time, requiring less sample and being portable. There is a growing interest on the development of bioseparation techniques applicable at microscale. Dielectrophoresis (DEP) is among the most used microscale techniques. DEP is the movement of particles as result of polarization effects due to nonuniform electric fields. DEP is a fast response method, with enough selectivity for the manipulation and separation of bioparticles such as microorganisms and macromolecules (proteins and DNA).

Due to the importance of proteins in biotechnological and pharmaceutical processes, this article presents an analysis of the advances in the area of separation, concentration and purification processes of proteins, employing the technique of dielectrophoresis at microscale. The findings of important research groups around the world are included in the use of this microscale technique for protein manipulation. Important research groups were strategically selected with the objective of providing the reader with an overview on the state of the art on the utilization of dielectrophoresis for the manipulation and concentration of protein in microdevices.

Keywords: proteins, dielectrophoresis, microscale, microsystems, microdevices, bioseparations.

* Autora para la correspondencia. E-mail: blapizco@cinvestav.mx
Tel. (81) 1156-1740, ext. 4512 Fax (81) 1156-1741

1 Introducción

El término laboratorio montado en un microdispositivo (*lab-on-a-chip* por sus siglas en inglés) se refiere a microsistemas que son capaces de realizar las funciones de uno o varios equipos de laboratorio de tamaño convencional (Whitesides, 2006). Los microsistemas ofrecen atractivas ventajas tales como tiempos de proceso cortos y menor consumo de muestra y reactivos, lo cual es sumamente importante cuando se están analizando productos biológicos de alto valor agregado. La miniaturización favorece la automatización, por lo que el empleo de microsistemas disminuye significativamente los requerimientos de mano de obra calificada, y por tanto los análisis tienen menor costo que los realizados por los equipos de laboratorio convencionales. En los microsistemas una corriente de fluido, en lugar de la mano humana, es la encargada del transporte de la muestra hacia los distintos pasos de un proceso, donde se manejan volúmenes en el rango de microlitros y tiempos de proceso en rangos de segundos. Estas microtecnologías para análisis han tenido un crecimiento acelerado en la última década con un número creciente de congresos y revistas científicas dedicadas a esta área. Este campo de la ciencia, que tiene como objetivo el desarrollo de laboratorios portátiles, seguirá en crecimiento acelerado, ya que son inagotables el número de aplicaciones posibles. Las aplicaciones potenciales van desde dispositivos para análisis clínicos que podrían utilizarse en hospitales o para brindar atención médica rápida en zonas de desastres; hasta analizadores en línea que permitan monitorear en tiempo real procesos de producción de alimentos y fármacos, etc. (Washizu, 2005; Lapizco-Encinas, 2008).

Las proteínas tienen una gran importancia en la industria biofarmacéutica, por lo que existe un creciente interés en el desarrollo de técnicas de identificación y purificación de proteínas con aplicaciones en medicina. En particular, se busca mejorar los procesos empleados para la purificación de proteínas. El costo de los biofármacos es generalmente elevado, lo que los hace poco accesibles a una gran parte de la población. Este elevado costo se debe en su mayor parte a los bajos rendimientos y altas pérdidas que se tienen en los procesos de purificación que se utilizan actualmente en la industria. El desarrollo

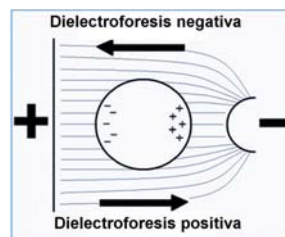


Fig. 1: Representación esquemática de una partícula neutra expuesta a un campo eléctrico no homogéneo, incluyendo la dirección del movimiento para dielectroforesis positiva y dielectroforesis negativa.

de un método de purificación de proteínas, eficiente y económico, generaría una reducción en el costo total de los biofármacos, haciéndolos más accesibles para la población en general (Kang y col., 2008a).

Algunos de los métodos de separación y purificación empleados para purificar proteínas son dielectroforesis, electroforesis, cromatografía, filtración con membranas y sistemas de dos fases acuosas. De éstas técnicas, la dielectroforesis es la que posee un mayor potencial para ser usada en microdispositivos (Hughes, 2002). La dielectroforesis es un fenómeno que solo ocurre en presencia de campos eléctricos no homogéneo, y se ocasiona por efectos de polarización. Cuando una partícula se encuentre expuesta a un campo no homogéneo, las cargas dentro de la partícula tendrán un desbalance, que inducirá un movimiento en la partícula. La partícula puede ser atraída (dielectroforesis positiva) o repelida (dielectroforesis negativa) de la región donde el campo eléctrico tenga un mayor gradiente o cambio (Hughes, 2002; Ozuna-Chacón y col., 2007). La Fig. 1 muestra una representación sencilla y esquemática de dielectroforesis, donde un campo eléctrico no-homogéneo fue generado utilizando dos electrodos de distinta geometría. Una partícula neutra es expuesta a este campo, y el desbalance de carga ocurre, lo que ocasiona que la partícula neutra se mueva dentro del campo, ya sea con dielectroforesis positiva o negativa.

Existen dos maneras principales para generar un campo eléctrico no homogéneo, y son empleando un arreglo de electrodos o un arreglo de estructuras aisladoras. La mayoría de los estudios de investigación sobre dielectroforesis han utilizado arreglos de microelectrodos (Hughes, 2002; Lapizco-Encinas y Rito-Palomares, 2007).

En el presente artículo se incluyen estudios de ambos tipos de dielectroforesis.

A continuación, de manera breve se describe la teoría de dielectroforesis. La fuerza dielectroforética ejercida sobre la partícula esférica se define como:

$$F_{DEF} = 2\pi\epsilon_m r_p^3 f_{CM} \nabla E^2 \quad (1)$$

donde ϵ_m es la permitividad del medio de suspensión, r_p es el radio de la partícula, E es la magnitud del campo eléctrico aplicado, y f_{CM} es el factor de Clausius-Mossotti (CM) o factor de polarización, el cual se define como:

$$f = \left[\frac{\tilde{\sigma}_p - \tilde{\sigma}_m}{\tilde{\sigma}_p + 2\tilde{\sigma}_m} \right] \quad (2)$$

donde $\tilde{\sigma}_p$ y $\tilde{\sigma}_m$ son las conductividades complejas de la partícula y del medio respectivamente. Como puede observarse en la Ec. (1), los parámetros que mayormente afectan la fuerza dielectroforética son: el tamaño de la partícula, las propiedades dieléctricas de la partícula y del medio de suspensión, y la magnitud y gradiente del campo eléctrico aplicado. La manipulación dielectroforética de partículas puede optimizarse modificando las condiciones de operación, como las características del medio de suspensión y la distribución del campo eléctrico, convirtiendo a la dielectroforesis en un método de separación atractivo para la separación y manipulación de una gran variedad de biopartículas, desde macromoléculas hasta microorganismos (Voldman, 2006; Lapizco-Encinas y Rito-Palomares, 2007). Algunas de las ventajas de la dielectroforesis, en comparación con otras técnicas de separación, es que es una técnica no destructiva, rápida y aplicable en microescala. Las aplicaciones analíticas de la dielectroforesis han permitido identificar células cancerígenas (Kang *y col.*, 2008b), manipular proteínas (Zheng *y col.*, 2004a; Clarke *y col.*, 2005; Lapizco-Encinas *y col.*, 2008) y ADN (Regtmeier *y col.*, 2007; Gallo-Villanueva *y col.*, 2009), entre otras importantes aplicaciones.

Los biofármacos o proteínas terapéuticas han revolucionado la medicina. Es por esto que existe un creciente interés en el desarrollo de técnicas que permitan separar y purificar proteínas, conservando sus propiedades biológicas. La aplicación de procesos en microescala para análisis de biopartículas aumenta rápidamente.

La dielectroforesis es una técnica que ya ha sido exitosamente probada para la separación y concentración de proteínas. El presente artículo de revisión fue preparado con el objetivo de introducir al lector, interesado en campo de procesos de separación y purificación de proteínas, a la técnica de dielectroforesis aplicada en microescala. Para reunir la información aquí presentada en este se realizó una detallada revisión bibliográfica de los estudios e investigaciones publicadas a partir del año 2000, con el fin presentar información reciente que refleje el estado del arte en este tema. Se encontraron importantes contribuciones realizadas por diferentes grupos de investigadores alrededor del mundo. A continuación se presenta un análisis crítico de los avances y resultados logrados en el empleo de la técnica de dielectroforesis para la manipulación y concentración de proteínas.

2 Metodología

Para la elaboración se realizó una minuciosa búsqueda de artículos en las bases de datos *ISI Web of Knowledge de Thomsom* (<http://www.isiwebofknowledge.com/>), la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (<http://redalyc.uaemex.mx/>) y *google scholar* (<http://scholar.google.com/>). Se encontraron numerosos artículos sobre el tema de dielectroforesis, sin embargo, solo seis grupos de investigación reportaban la aplicación de esta técnica electrocinética para manipulación de proteínas. Cabe mencionar que con el fin de incluir información que presentara los últimos avances, sólo se seleccionaron artículos y reportes científicos publicados a partir del año 2000.

3 Dielectroforesis para manipulación de biopartículas

La dielectroforesis ha sido utilizada con éxito para detectar y concentrar una gran variedad de biopartículas desde macromoléculas como ADN y proteínas, hasta microorganismos como virus, bacterias y levaduras, y parásitos (Quinn *y col.*, 1996; Voldman, 2006; Lapizco-Encinas y Rito-Palomares, 2007). Como se muestra en la Ec. (1), la fuerza dielectroforética

depende del tamaño de la partícula (dependencia con r_p^3), lo que significa que mayor fuerza es ejercida entre mayor sea el tamaño de la partícula. Por tal motivo, las primeras aplicaciones de dielectroforesis se llevaron a cabo con microorganismos (Pohl y Hawk, 1966). La manipulación de macromoléculas, vino después, una vez que fue posible lograr campos eléctricos más intensos gracias al avance de las técnicas de fabricación de microelectrodos (Lapizco-Encinas y Rito-Palomares, 2007).

La mayoría de los estudios realizados con dielectroforesis se han desarrollado con arreglos de microelectrodos, los cuales permiten obtener un gradiente de campo eléctrico elevado, utilizando bajos voltajes. Una desventaja importante en el uso de los microelectrodos es la alta probabilidad de presentarse electrolisis, rápida deterioración y pérdida de funcionalidad debido a ensuciamiento, lo cual es frecuente cuando se trabaja con biopartículas. Una reciente alternativa ha sido la utilización de estructuras aisladoras, en lugar de electrodos, para la generación de campos eléctricos no homogéneos. Esta nueva técnica dielectroforética, aún en desarrollo, se denomina dielectroforesis con estructuras aisladoras, *iDEP* por sus siglas en inglés (Cummings y Singh, 2003), la cual ya se ha empleado exitosamente para la manipulación dielectroforética de numerosas biopartículas (Moncada-Hernández y Lapizco-Encinas, 2010). La dielectroforesis con estructuras aisladoras posee atractivas características tales como sencillez en el proceso de fabricación de dispositivo, bajo costo de producción y la capacidad de funcionar a pesar de ensuciamiento, lo que abre la posibilidad de escalamiento para aplicaciones de alto flujo. Adicionalmente, estos dispositivos pueden fabricarse de materiales económicos como el plástico (Simmons y col., 2006), lo que permite tener dispositivos desechables, ideales para pruebas y análisis clínicos; con gran potencial para aplicaciones en medicina y salud.

4 Estudios sobre manipulación dielectroforética de proteínas

Como ya se ha mencionado, existe un gran interés en la manipulación y concentración de partículas de proteínas. La industria biofarmacéutica es uno de los principales impulsores del desarrollo

de las técnicas para purificar proteínas, ya que busca mejorar los procesos de producción y control de calidad de biofármacos. Así mismo, las aplicaciones clínicas analíticas también impulsan el desarrollo de estas técnicas, por las características de algunas proteínas como marcadores de ciertas enfermedades, donde el poder detectar, atrapar y concentrar estas proteínas marcadoras sería un excelente herramienta de diagnóstico clínico (Hughes, 2002). El primer reporte de manipulación de partículas de proteínas fue publicado en 1994 por el grupo de investigación liderado por el Dr. Masao Washizu (Washizu y col., 1994). Este grupo demostró el uso de dielectroforesis positiva para atrapar la proteína avidina, dominando con esto el movimiento Browniano, el cual se creía que no podía ser dominado por fuerzas dielectroforéticas. Este trabajo fue muy importante, ya que demostró por primera vez que los métodos electrocinéticos en microescala, como la dielectroforesis, son los suficientemente poderosos para la manipulación de macromoléculas como proteínas y ADN.

A continuación se hace una reseña de los avances más recientes logrados por grupos de investigación alrededor del mundo que han trabajado con técnicas dielectroforéticas para la concentración y purificación de soluciones de proteínas. La descripción de estos estudios de investigación es en forma resumida, para mayor detalle, se invita al lector a consultar las publicaciones originales citadas en este artículo.

5 Manipulación de proteínas con microelectrodos y campos eléctricos de corriente alterna

5.1 *Microsistema híbrido de dielectroforesis cromatográfica*

El grupo de investigación del Dr. Masao Washizu en Japón fue el primero en reportar la manipulación dielectroforética de proteínas en 1994 (Washizu y col., 1994). En una investigación posterior Kawabata y Washizu (2001) demostraron por primera vez la separación de proteínas mediante una técnica híbrida: dielectroforesis cromatográfica, empleando electrodos corrugados y campos eléctricos de

corriente alterna. Nuevamente, este grupo reportó resultados pioneros en el campo de las separaciones en microescala. La dielectroforesis cromatográfica consiste en fraccionar un flujo de macromoléculas al hacerlas pasar a través de un arreglo de microelectrodos. Cada macromolécula exhibirá una fuerza dielectroforética distinta (dependiendo de sus propiedades dieléctricas, forma y tamaño) y, por tanto, tendrá una “afinidad” o “atracción” por los microelectrodos, similar a la afinidad de los analitos por la fase estacionaria en una columna cromatográfica. En este caso, la fuerza proviene de la dielectroforesis, la cual se genera utilizando un arreglo de electrodos planos instalados en el microdispositivo. El aparato de dielectroforesis cromatográfica utilizado por Kawabata y Washizu fue fabricado de polidimetilsiloxano, contó con 2016 electrodos (1008 pares) de aluminio acomodados en un microcanal (Fig. 2a). Los electrodos corrugados (Fig. 2b) fueron fabricados de aluminio, con un ancho de $20\ \mu\text{m}$ espaciados $7\ \mu\text{m}$ entre ellos, y ocupando un espacio de $14\ \text{mm} \times 3\ \text{mm}$, con una profundidad de $25\ \mu\text{m}$. El campo eléctrico utilizado para manipular las partículas de proteína fue entre $1.3\ \text{MV/m}$ a $3.0\ \text{MV/m}$ con una frecuencia de $1.0\ \text{MHz}$. Se utilizaron las proteínas insulina ($6\ \text{kDa}$), BSA ($66\ \text{kDa}$) e IgM ($900\ \text{kDa}$), las cuales fueron teñidas con fluoresceína para lograr su visualización mediante fluorescencia. Las proteínas se introdujeron en el dispositivo a una velocidad de flujo de $800\ \text{m/s}$, al llevarse a cabo el experimento se midieron las eficiencias de recolección, donde, como era esperado, las proteínas de mayor peso molecular pudieron ser retenidas con menores campos eléctricos. Al igual que en los sistemas de cromatografía, se obtuvo un cromatograma al medir la señal fluorescencia de la salida del microcanal como función del tiempo. La Fig. 3 muestra una representación de los cromatogramas típicos obtenidos, graficando fluorescencia vs. tiempo en función de la magnitud del campo eléctrico aplicado. Se observa en la figura como la señal de fluorescencia a la salida del microcanal disminuye cuando el campo eléctrico está siendo aplicado; esto se debe a que las proteínas, que son las partículas fluorescentes, están siendo retenidas dielectroforéticamente por el arreglo de electrodos. Al eliminar el campo eléctrico, las proteínas concentradas son eluidas del microcanal, lo que se observa como un “pico cromatográfico” en la señal de fluorescencia. Sólo

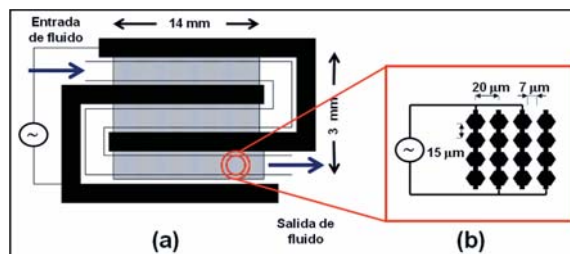


Fig. 2: Representación del sistema de dielectroforesis cromatográfica empleado por Kawabata y Washizu (2001) (a) Microcanal empleado. (b) Magnificación de la geometría de los electrodos corrugados.

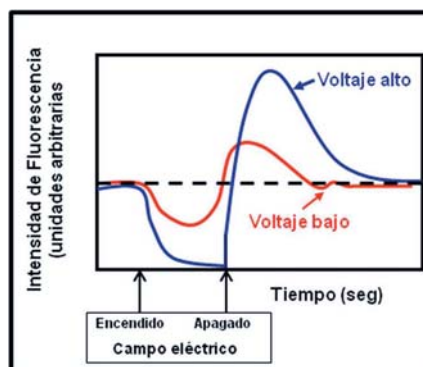


Fig. 3: Representación de los cromatogramas típicos obtenidos como función de la magnitud del campo eléctrico aplicado (Kawabata y Washizu, 2001).

se realizaron experimentos con una proteína a la vez. Los resultados de este estudio son de gran importancia porque demuestran como la técnica de dielectroforesis puede funcionar como técnica híbrida al combinarse con métodos tradicionales para el análisis y concentración de proteínas.

5.2 Primer reporte de dielectroforesis negativa de proteínas

En el año 2001, el grupo de investigación del Dr. Hywel Morgan en el Reino Unido demostró el atrapamiento con dielectroforesis positiva y negativa de la proteína avidina ($\text{PM} = 68\ \text{kDa}$), empleando electrodos polinomiales con una separación de $2\ \mu\text{m}$, los electrodos se fabricaron de titanio, paladio y oro, y se usaron con campos eléctricos de corriente alterna (Hughes y Morgan, 2001). Esta fue la primera demostración reportada de

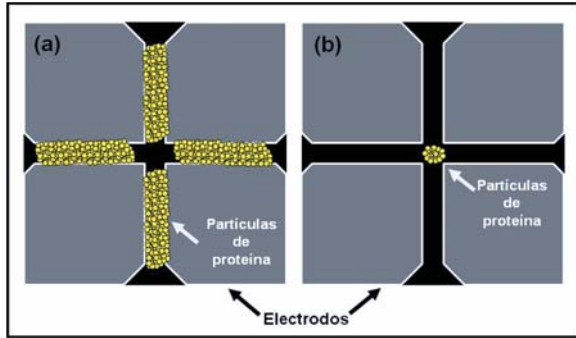


Fig. 4: Atrapamiento de partículas de proteína avidina (amarillo) en electrodos polinomiales (estructuras de color gris). (a) Dielectroforesis positiva, partículas atraídas hacia los bordes de los electrodos. (b) Dielectroforesis negativa, partículas repelidas por los electrodos y concentradas en el centro del sistema (Hughes y Morgan, 2001).

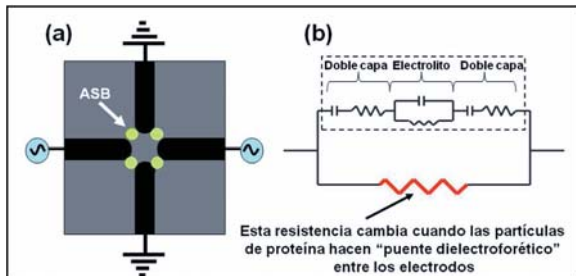


Fig. 5: (a) Representación del sistema de electrodos utilizado por Zheng *y col.* (2004b) mostrando cómo se atraparon las partículas de ASB. (b) Representación del circuito empleado para la medición de conductancia de la proteína ASB.

atrapamiento de proteínas con dielectroforesis negativa. Las partículas de avidina fueron teñidas con isotiocianato de fluoresceína para lograr su visualización mediante fluorescencia. Soluciones de avidina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se prepararon utilizando una solución buffer 0.1 mM KCl, conductividad de 1.4 mS/m y pH de 6.5. Atrapamiento positivo de avidina, *i.e.* partículas de avidina colectadas en el borde de los electrodos, se demostró cuando se aplicaron potenciales de 10 V pico-a-pico con una frecuencia menor a 9 MHz (Fig. 4a). Al incrementarse la frecuencia del campo eléctrico por encima de 9 MHz el comportamiento de las partículas de avidina cambiaba a dielectroforesis negativa, *i.e.* las partículas se concentraban en el centro de los

electrodos, lo más alejadas posible de los bordes de los electrodos (Fig. 4b). Estos resultados son de gran importancia al ser el primer reporte de dielectroforesis negativa de partículas de proteína. Demostrando que una proteína puede cambiar su respuesta dielectroforética en función de la frecuencia del campo aplicado. Estos hallazgos abren la posibilidad del uso de dielectroforesis para la separación de mezclas de proteínas, donde al manipularse la frecuencia, se podría concentrar y liberar selectivamente las partículas de un tipo de proteína reteniendo las demás proteínas en la muestra. Esta posible aplicación tendría gran importancia en la industria farmacéutica.

5.3 Medición de propiedades dieléctricas de proteínas

En una investigación realizada en el 2004, el grupo del Dr. Peter Burke en EUA (Zheng *y col.*, 2004a; Zheng *y col.*, 2004b) reportaron el atrapamiento dielectroforético la proteína albúmina de suero de bovino (ASB) (PM = 68 kDa) y la primera medición de propiedades dieléctricas, la conductancia, de una proteína. Las partículas de la proteína ASB son esféricas y tienen un diámetro de 5 nm aproximadamente. Estas partículas, teñidas con tetrametilrodamina, fueron atrapadas con campos eléctricos de corriente alterna usando electrodos planos de geometría cuádruples; diseñados para obtener el mayor gradiente de campo eléctrico en las orillas de los electrodos, lo que sería la zona de dielectroforesis positiva. La Fig. 5a muestra un esquema del sistema empleado, donde se observó dielectroforesis positiva de ASB aplicando campos eléctricos con frecuencias de 50 kHz a 5 MHz, donde el atrapamiento más efectivo se presentó con frecuencias entre 200 y 300 kHz, usando diferentes separaciones de electrodos (5, 10 y 20 μm).

Para medir la conductancia, primeramente se atraparon dielectroforéticamente las partículas de ASB, las cuales se mantuvieron inmóviles aplicando el campo eléctrico por 24 horas, hasta lograr que la solución se secase y sólo quedaran las partículas de proteínas como “puente” o resistencia conectando los dos electrodos. La Fig. 5b muestra una representación esquemática del circuito empleado para las mediciones de conductancia. Después de transcurrido el periodo de 24 horas, se estimó la conductancia de las

partículas de proteínas ASB con un valor máximo de 25 nS. El impacto de este estudio consiste en que es el primer reporte de las propiedades dieléctricas de partículas de proteínas (Zheng *y col.*, 2004a; Zheng *y col.*, 2004b); información que es difícil de obtener y es necesaria para diseñar sistemas dielectroforéticos para la manipulación de proteínas.

5.4 Atrapamiento de partículas individuales de proteína

En el año 2005 el grupo de investigación del Dr. Frank F. Bier en Alemania de investigación reportó el atrapamiento reversible de la proteína fluorescente R-ficoeritrina (partículas de 5.6 nm de diámetro), utilizando un campo eléctrico de corriente alterna y electrodos angostos en forma de aguja, fabricados en oro sobre una superficie de silicio. La Fig. 6 muestra una representación esquemática de los electrodos empleados y de las partículas de proteína atrapadas dielectroforéticamente (Holzel *y col.*, 2005). Uno de los aspectos más importantes de este trabajo es que los investigadores aseguran haber atrapado moléculas individuales, es decir, no aglomeradas. Esta aseveración es de gran importancia, ya que de acuerdo a la Ec. (1) se requiere una gran magnitud de campo eléctrico para poder atrapar partículas pequeñas con diámetros en el orden de nanómetros, como las proteínas. Considerando que las partículas pequeñas son afectadas por el movimiento Browniano, esto significa que la fuerza dielectroforética debe dominar al movimiento Browniano para lograr la inmovilización de partículas de proteína. Además del trabajo experimental, los investigadores realizaron modelación matemática con el fin de predecir la magnitud de la fuerza generada por el movimiento Browniano y el gradiente de campo eléctrico logrado en su sistema de microelectrodos de otro. Los resultados mostraron atrapamiento de las partículas de R-ficoeritrina aplicando un potencial de 10 V con una frecuencia de 1 MHz. La Fig. 6 muestra una representación de la señal de fluorescencia obtenida a los 10 segundos de aplicado el campo eléctrico, donde se observan dos puntos fluorescentes dentro del sistema de electrodos. Ambas regiones presentaban la misma intensidad de fluorescencia, la cual era muy alta, lo que generó la incertidumbre sobre si se estaban

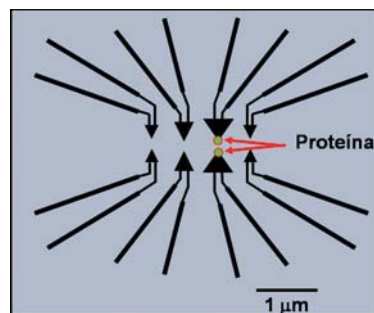


Fig. 6: Representación del sistema de electrodos empleado por Holzel *y col.* (2005) mostrando las partículas de proteína (color blanco) atrapadas dielectroforéticamente.

atrapando aglomerados o partículas individuales. La intensidad de fluorescencia obtenida excedía la intensidad esperada para partículas individuales (no aglomeradas). Pruebas posteriores comprobaron que las moléculas de proteína eran atrapadas como partículas individuales en las puntas de los electrodos. Adicionalmente se realizaron experimentos para analizar como la frecuencia del campo eléctrico influiría sobre la respuesta dielectroforética de las partículas de proteína. Los resultados mostraron que a bajas frecuencias (0.1 a 1 MHz) se obtenía un fuerte atrapamiento, mientras que a una frecuencia de 5 MHz, la fuerza dielectroforética disminuía, pero siempre se observó dielectroforesis positiva. Se determinó también el volumen de la zona de atrapamiento dielectroforético de $20 \mu\text{m}^3$ aproximadamente, que empleando una solución de R-ficoeritrina 0.6 nM dentro este volumen, el número de moléculas atrapadas debería de ser de siete, mientras que en el experimento se observaron únicamente dos moléculas. Los investigadores atribuyeron este resultado a posibles errores en la estimación de la magnitud de la fuerzas y del factor de polarización; así como en la interferencia de efectos electro-hidrodinámicos tales como la electroósmosis y el flujo electro-térmico (flujo por diferencias de temperatura). Un punto interesante es que los autores mencionan, es que tal vez el diámetro “efectivo” de las partículas de proteína haya sido mayor al diámetro real de 5.6 nm, debido a efectos de polarización de la doble capa eléctrica formada alrededor de las partículas. Este aumento de tamaño aumentaría la magnitud de la fuerza dielectroforética ejercida sobre la partícula. Los resultados de esta

investigación demuestran principalmente que la fuerza dielectroforética es capaz de atrapar moléculas individuales de proteína empleando arreglos de microelectrodos con potenciales en el orden de 10 V (Holzel *y col.*, 2005). Estos resultados generaron cierta controversia, ya que se trata del primer atrapamiento dielectroforético de partículas individuales de proteína, tema de investigación aún poco explorado (Holzel *y col.*, 2006; Ying *y col.*, 2006).

6 Manipulación de proteínas con arreglos de estructuras aisladoras y campos eléctricos de corriente directa

En el 2008, el grupo de investigación mexicano de la Dra. Blanca Lapizco, reportó el atrapamiento dielectroforético de partículas de proteína ASB, empleando campos eléctricos de corriente directa aplicados en microcanales con postes cilíndricos aisladores (Lapizco-Encinas *y col.*, 2008). La proteína fue teñida con isotiocianato de fluoresceína para su visualización. En este estudio se logró atrapar y concentrar partículas de proteína a lo largo de un arreglo de postes cilíndricos dentro de un microcanal fabricado en vidrio. La Fig. 7 muestra una representación esquemática del sistema empleado, el cual consistió en un microdispositivo fabricado por dos obleas de vidrio, la oblea inferior contenía los microcanales y la oblea superior contenía los reservorios. Cada microcanal contenía un arreglo de estructuras aisladoras cilíndricas, el largo del canal fue de 10.16 mm, 2 mm de ancho y 10 μm de profundidad. Los postes cilíndricos tenían un diámetro de 440 μm y una altura de 10 μm ; la separación del centro a centro de los postes era de 520 μm (espacio estrecho entre postes era de 80 μm). En la primera fila de postes de cada lado se utilizaron postes con geometría cónica con el fin de prevenir el estrellamiento de las partículas y la obstrucción del canal. Como se aplicaron campos eléctricos de corriente directa, las partículas de proteínas fueron expuestas a tres fuerzas dentro de este sistema: electroforesis, electroosmosis y dielectroforesis. Para lograr atrapamiento, el campo eléctrico aplicado debía ser suficientemente

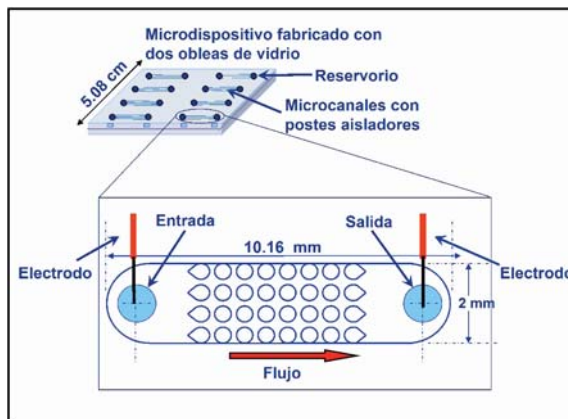


Fig. 7: Representación esquemática del microcanal con postes aisladores cilíndricos utilizados por Lapizco-Encinas *y col.* (2008) para concentrar partículas de ASB.

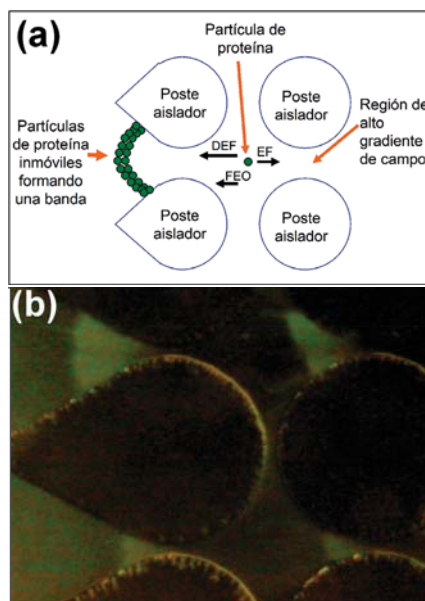


Fig. 8: (a) Representación de las fuerzas actuando sobre las partículas de proteína dentro del microcanal con postes aisladores cilíndricos. (b) Fotografía de las partículas de proteína inmovilizadas dentro del microcanal cuando se utilizó un medio de suspensión con $\text{pH} = 8$, conductividad de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y se aplicó un potencial de 950 V a lo largo del microcanal (Lapizco-Encinas *y col.*, 2008).

alto para producir una fuerza dielectroforética que dominara el sistema. Cuando esto ocurría, las partículas de proteína eran atrapadas en

forma de bandas localizadas antes de la región de mayor gradiente de campo eléctrico. Un punto importante a notar en este trabajo, es que las partículas de proteína exhibieron comportamiento de dielectroforesis negativa, es decir, las partículas fueron repelidas de las zonas de mayor gradiente de campo eléctrico. Este comportamiento se debió a que las partículas de proteínas poseían una menor polarización que el medio de suspensión (Lapizco-Encinas *y col.*, 2008). La Fig. 8a muestra una representación de las tres fuerzas electrocinéticas ejercidas sobre las partículas de ASB dentro del microcanal con postes aisladores; donde DEF es dielectroforesis, EF es electroforesis y FEO es flujo electroosmótico. En los experimentos el campo eléctrico utilizado varió entre 700 y 1600 V/cm, y se utilizaron medios de suspensión con pH de 8 ó 9, y conductividad en el rango de 25-100 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La Fig. 8b muestra una fotografía de las partículas de proteína inmovilizadas dielectroforéticamente dentro del microcanal cuando se utilizó un medio de suspensión con pH = 8, conductividad de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y se aplicó un potencial de 950 V a lo largo del microcanal. Este estudio incluyó un análisis de como las propiedades del medio de suspensión empleado pueden manipularse para favorecer el atrapamiento dielectroforético. Se encontró que las condiciones óptimas son aumentar la conductividad y disminuir el pH del medio de suspensión, ya que estos cambios disminuyen la magnitud de campo eléctrico requerido para atrapar y concentrar las partículas de proteínas. Este es el primer reporte de atrapamiento de proteínas con arreglos de estructuras aisladoras en lugar de electrodos.

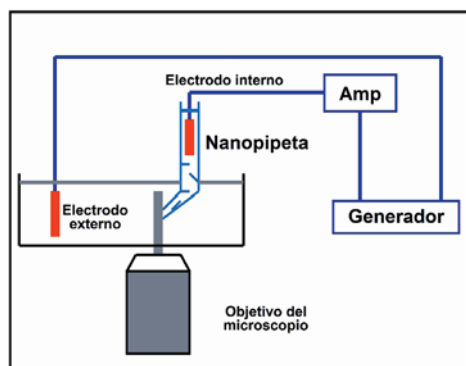


Fig. 9: Representación esquemática del sistema de nanopipeta empleado Clarke *y col.* (2005).

Los resultados de este trabajo demuestran que la dielectroforesis es una técnica con alta flexibilidad para aplicarse exitosamente en diferentes tipos de sistemas para manipular proteínas. En el caso de los sistemas con aisladores, estos son más económicos, lo que aumenta el potencial de los métodos dielectroforéticos para ser empleados en aplicaciones en la industria. Es necesario explotar más este método de separación para conocer todas las ventajas potenciales que es capaz de ofrecer (Lapizco-Encinas *y col.*, 2008).

7 Manipulación de proteínas con nanopipetas y campos de corriente alterna y corriente directa

En el 2005 el grupo del Dr. David Klenerman del Reino Unido (Clarke *y col.*, 2005) presentó una importante innovación al utilizar una nanopipeta de vidrio para manipular proteínas dielectroforéticamente. En esta aplicación, el campo eléctrico no uniforme, necesario para que ocurra la dielectroforesis, fue creado con la nanopipeta en lugar de los tradicionales electrodos. El empleo de microelectrodos trae consigo ciertas ventajas, tales como la flexibilidad en su operación y el requerimiento de voltajes bajos para obtener un gradiente de campo alto. Sin embargo, los sistemas en base a electrodos no son del todo compatibles con muestras biológicas. Las proteínas se concentran en la superficie metálica de los electrodos, lo que ocasiona desnaturalización y pérdida de la actividad biológica. Además, utilizando electrodos, existe una mayor probabilidad de electrolisis debido a reacciones electroquímicas complejas. Es por esto que existe un interés creciente en el diseño de sistemas dielectroforéticos que no utilicen sistemas de microelectrodos. El sistema de nanopipeta utilizado por este grupo de investigación genera un campo eléctrico no-homogéneo al utilizar una estructura nanométrica cónica fabricada en material dieléctrico (vidrio). Este grupo reportó la concentración de las proteínas G e IgG, las cuales fueron teñidas con el tinte fluorescente Alexa-488 para lograr su visualización. El sistema utilizado consistió en una nanopipeta fabricada en vidrio borosilicato, con un ángulo de $3-6^\circ$ y un diámetro interno del orden de 100-150 nm. Los campos

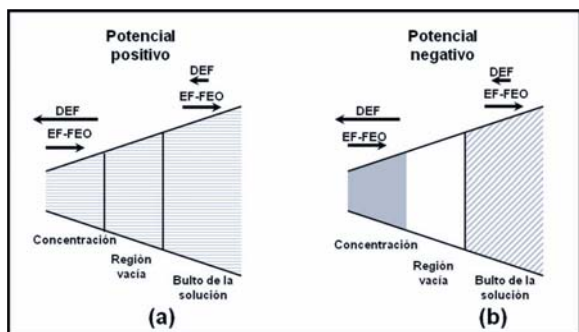


Fig. 10: Resultados obtenidos por Clarke *y col.* (2005) con el sistema de nanopipeta. (a) No se logra concentración de proteína cuando se aplica un potencial positivo. (b) Concentración de partículas de proteína en la punta de la nanopipeta cuando se aplica un potencial negativo.

eléctricos usados fueron tanto de corriente alterna como de corriente directa, y fueron aplicados empleando dos electrodos: un electrodo externo y un electrodo dentro de la pipeta (Fig. 9). El electrodo externo fue en donde se aplicaron los potenciales, mientras que el electrodo interno fue puesto a tierra (0 V). La pipeta fue sumergida en una solución de 100-150 mM de NaCl. Aplicando un voltaje de 1 V entre los dos electrodos, el campo eléctrico resultante en la punta de la pipeta fue de 10^6 V/m. Al realizar experimentos con la proteína G, variando el voltaje aplicado, se demostró que a un voltaje aplicado de -5 V a una frecuencia de 0.1 Hz se obtenía un fuerte atrapamiento y concentración de proteína G en la punta de nanopipeta. Sin embargo, al aplicar un voltaje de $+1$ V a la misma frecuencia, la concentración de proteína G disminuía en forma significativa. Al eliminar el campo eléctrico se liberaban las partículas de proteína de la trampa dielectroforética, demostrando así que la concentración de proteínas si era de carácter dielectroforético, el cual es un fenómeno reversible. Además, se determinaron los factores de concentración de las moléculas de proteínas empleando fluorescencia; los cuales estuvieron en el orden de 300-3000, factores sumamente elevados para este sistema de nanopipeta, lo que demuestra el potencial de este nanodispositivo para concentrar partículas de proteína. Resultados similares fueron obtenidos en los factores de concentración de IgG.

Clarke *y col.* (2005) explicaron como tres diferentes fuerzas eran ejercidas sobre

las partículas de proteína: electroforesis, electroosmosis y dielectroforesis. Bajo las condiciones empleadas, tipo fisiológicas, la proteína G presenta carga negativa, lo que significa que bajo la presencia de un campo eléctrico, las partículas de proteína G serán atraídas por el electrodo positivo. Adicionalmente, la nanopipeta está construida de vidrio, material con carga negativa en su superficie, que al entrar en contacto con la solución de NaCl, genera una carga negativa en su superficie, lo que significa que el flujo electroosmótico (FEO) generado sobre la superficie de la nanopipeta será en dirección del electrodo con carga negativa, pero esta contribución es pequeña a los voltajes aplicados. En cambio, la dielectroforesis atraerá a las partículas de proteína hacia la punta de la pipeta, zona donde se tiene el mayor gradiente de campo eléctrico. Cuando se aplica un voltaje positivo, las fuerza dielectroforéticas y electroforéticas atraen a las partículas de proteína G que están dentro de la pipeta hacia la punta, sacándolas de la pipeta, sin lograr concentración de partículas (Fig. 10a), donde FEO es el flujo electroosmótico, EF es electroforesis y DEF es dielectroforesis. Cuando se aplicaron voltajes positivos entre 1.5 y 3.5 V, se observó que había un poco de acumulación de partículas en la punta de la pipeta, pero se tenía flujo de partículas saliendo de la nanopipeta. El resultado es diferente cuando se aplican voltajes negativos, en este caso las partículas de proteína dentro de la nanopipeta son atraídas en direcciones distintas: por dielectroforesis son atraídas hacia la punta de la pipeta y por electroforesis son atraídas hacia el electrodo interno, formándose una región sin partículas dentro la pipeta, y partículas concentradas en la punta, sin partículas fluyendo fuera de la pipeta (Fig. 10b). La importancia de este trabajo es que se trata del primer reporte científico de atrapamiento de proteínas en nanopipetas logrando factores de concentración muy altos. Esta investigación abre la posibilidad para que este tipo de nanodispositivos sean empleados en pruebas de tipo analítico, que permitirían la rápida detección de la presencia de proteínas en soluciones muy diluidas.

En el 2007 este grupo de investigación utilizó la técnica de nanopipeta para la manipulación de proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés) y lograr medir la conductividad

y conductancia superficial de macromoléculas (Clarke *y col.*, 2007). El conocer propiedades dieléctricas de las biopartículas de interés, como las proteínas, permite diseñar y seleccionar condiciones de operación para llevar a cabo procesos electrocinéticos como electroforesis y dielectroforesis. La YFP tiene las siguientes dimensiones 7.73 nm x 6.29 nm x 11.77 nm, y posee auto fluorescencia, por lo que no se requirió llevar a cabo un proceso de tinción para lograr su visualización. En este segundo estudio se integró el uso de un modelo matemático que permitió predecir la magnitud de las fuerzas ejercidas sobre las partículas de proteína. La parte más importante de este segundo estudio con el uso de nanopipeta es la medición de la conductancia de superficie, la cual fue llevada a cabo para ADN y YFP. La conductividad de la superficie y conductividad de las partículas de proteína se obtuvieron mediante el uso de un modelo matemático y datos experimentales. Se realizaron corridas experimentales variando la conductividad del medio de suspensión, y observando el atrapamiento dielectroforético. Los resultados permitieron realizar las predicciones de las propiedades dieléctricas, determinando la conductividad como 24.6 ± 1.8 S/m y la conductancia superficial como 21.5 ± 1.6 nS. Este resultado es uno de los escasos estudios donde se presenta un método de medición de propiedades dieléctricas de macromoléculas empleando dielectroforesis (Clarke *y col.*, 2007).

Conclusiones

El desarrollo de los laboratorios portátiles está teniendo un crecimiento acelerado, gracias a los avances en áreas como la microelectrónica y microfluídica. Se han reportado exitosas aplicaciones de microdispositivos para la separación, manipulación y concentración de una gran variedad de biopartículas, empleando técnicas como cromatografía, electroforesis y dielectroforesis en microescala.

La separación de proteínas mediante el empleo de dielectroforesis es todavía un nicho en investigación en espera de ser explotado. Sin embargo, ya se han reportado exitosas aplicaciones de esta técnica para concentrar partículas de proteína, empleando sistemas con microelectrodos de diferentes geometrías, técnicas

híbridas como dielectroforesis cromatográfica, microcanales con estructuras aisladoras y nanopipetas en vidrio. Estos avances han permitido medir las propiedades dieléctricas de macromoléculas, información que es fundamental para el diseño de sistemas y procesos con la técnica de dielectroforesis.

En el presente artículo de revisión se resumen algunos de los avances más importantes en la manipulación, purificación y concentración de soluciones de proteínas empleando la técnica de dielectroforesis en microescala. Los avances aquí presentados son una demostración de que esta novedosa y poderosa técnica electrocinética en microescala tiene potencial para ser integrada dentro de los sistemas de análisis y de los bioprocesos empleados para la producción de biofármacos en base a proteínas.

Una de las tendencias más importantes en el avance de la ciencia a nivel internacional es precisamente el desarrollo de los microsistemas para análisis o laboratorios montados en un microdispositivo (*lab-on-a-chip*). Se espera que el presente manuscrito introduzca al lector al mundo de los procesos de separación en microescala, a los conceptos básicos de la técnica de dielectroforesis, e informe de los últimos avances en la manipulación y concentración dielectroforética de proteínas.

Agradecimientos

Las autoras agradecen el apoyo económico proporcionado por CONACYT dentro de la convocatoria de Ciencia Básica 2006, proyecto número CONACYT-CB-2006-53603, y apoyo por CINVESTAV-Monterrey.

Referencias

- Clarke, R.W., Piper, J.D., Ying, L. y Klenerman, D. (2007). Surface conductivity of biological macromolecules measured by nanopipette dielectrophoresis. *Physical Review Letters* 98, 198102.1-198102.4.
- Clarke, R.W., White, S.S., Zhou, D., Ying, L. y Klenerman, D. (2005). Trapping of proteins under physiological conditions in a nanopipette. *Angewandte Chemie* 44, 3747-3750.

- Cummings, E.B. y Singh, A.K. (2003). Dielectrophoresis in microchips containing arrays of insulating posts: Theoretical and experimental results. *Analytical Chemistry* 75(18), 4724-4731.
- Gallo-Villanueva, R.C., Rodríguez-López, C.E., Díaz-de-la-Garza, R.L., Reyes-Betanzo, C. y Lapizco-Encinas, B.H. (2009). DNA manipulation by means of insulator-based dielectrophoresis employing direct current electric fields. *Electrophoresis* 30(24), 4195-4205.
- Holzel, R., Calander, N., Chiragwandi, Z., Willander, M. y Bier, F.F. (2005). Trapping single molecules by dielectrophoresis. *Physical Review Letters* 95(12), 128102.1-128102.4.
- Holzel, R., Calander, N., Chiragwandi, Z., Willander, M. y Bier, F.F. (2006). Reply comment "trapping single molecules by dielectrophoresis". *Physical Review Letters* 96(19), 199802.1-199802.1.
- Hughes, M.P. (2002). *Nanoelectromechanics in engineering and biology*. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Hughes, M.P. y Morgan, H. (2001). Positive and negative dielectrophoretic manipulation of avidin. *1st European Workshop on Electrokinetics and Electrohydrodynamics*, Glasgow, UK, September 6th-8th.
- Kang, L., Chung, B.G., Langer, R. y Khademhosseini, A. (2008a). Microfluidics for drug discovery and development: From target selection to product lifecycle management. *Drug Discovery Today* 13(1-2), 1-13.
- Kang, Y., Li, D., Kalams, S. y Eid, J. (2008b). DC-dielectrophoretic separation of biological cells by size. *Biomedical Microdevices* 10(2), 243-249.
- Kawabata, T. y Washizu, M. (2001). Dielectrophoretic detection of molecular bindings. *IEEE Transactions on Industry Applications* 37(6), 1625-1633.
- Lapizco-Encinas, B.H. (2008). Aplicaciones de microfluídica en bioseparaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7(3), 205-214.
- Lapizco-Encinas, B.H., Ozuna-Chacón, S. y Rito-Palomares, M. (2008). Protein manipulation with insulator-based dielectrophoresis and dc electric fields. *Journal of Chromatography A* 1206(1), 45-51.
- Lapizco-Encinas, B.H. y Rito-Palomares, M. (2007). Dielectrophoresis for the manipulation of nanobioparticles. *Electrophoresis* 28(24), 4521-4538.
- Moncada-Hernández, H. y Lapizco-Encinas, B.H. (2010). Simultaneous concentration and separation of microorganisms: Insulator-based dielectrophoretic approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(5), 1805-1816.
- Ozuna-Chacón, S., Lapizco-Encinas, B.H., Rito-Palomares, M., Collado-Arredondo, E. y Martínez Chapa, S.O. (2007). Dielectroforesis con estructuras aisladoras. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6(3), 329-335.
- Pohl, H.A. y Hawk, I. (1966). Separation of living and dead cells by dielectrophoresis. *Science* 152(3722), 647-649.
- Quinn, C.M., Archer, G.P., Betts, W.B. y O'Neill, J.G. (1996). Dose-dependent dielectrophoretic response of cryptosporidium oocysts treated with ozone. *Letters in Applied Microbiology* 22(3), 224-228.
- Regtmeier, J., Duong, T.T., Eichhorn, R., Anselmetti, D. y Ros, A. (2007). Dielectrophoretic manipulation of DNA: Separation and polarizability. *Analytical Chemistry* 79(10), 3925-3932.
- Simmons, B.A., McGraw, G.J., Davalos, R.V., Fiechtner, G.J., Fintschenko, Y. y Cummings, E.B. (2006). The development of polymeric devices as dielectrophoretic separators and concentrators. *MRS Bulletin* 31, 120-124.
- Voldman, J. (2006). Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annual*

- Review of Biomedical Engineering* 8, 425-454.
- Washizu, M. (2005). Biological applications of electrostatic surface field effects. *Journal of Electrostatics* 63(6-10), 795-802.
- Washizu, M., Suzuki, S., Kurosawa, O., Nishizaka, T. y Shinohara, T. (1994). Molecular dielectrophoresis of biopolymers. *IEEE Transactions on Industry Applications* 30(4), 835-843.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442(7101), 368-373.
- Ying, L., Zhou, D. y Bruckbauer, A. (2006). Comment on “trapping single molecules by dielectrophoresis”. *Physical Review Letters* 96(19), 199801.1-199801-1.
- Zheng, L., Burke, P.J. y Brody, J.P. (2004a). Electronic manipulation of DNA and proteins for potential nanobio circuit assembly. *Proceedings of SPIE: Nanobiophotonics and Biomedical Applications*, Bellingham, WA, January 24-26, 5331, 126-135.
- Zheng, L.F., Brody, J.P. y Burke, P.J. (2004b). Electronic manipulation of DNA, proteins, and nanoparticles for potential circuit assembly. *Biosensors & Bioelectronics* 20(3), 606-619.