

---

# MicroHerramientas para el Estudio de Células Vivas

---

Memoria presentada por Elisabet Fernández Rosas para optar al grado de  
Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona  
dentro del programa de doctorado de Biología Celular.

**Elisabet Fernández Rosas**

---

Bellaterra, Abril de 2011



La **Dra. Carme Nogués Sanmiquel**, profesora titular del Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

la **Dra. Elena Ibáñez de Sans**, profesora agregada del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i el **Dr. Jose Antonio Plaza Plaza**, investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), con destino al Instituto de Microelectrónica de Barcelona, Centro Nacional de Microelectrónica (IMB-CNM),

CERTIFICAN

Que **Elisabet Fernández Rosas** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de investigación que lleva por título *"MicroHerramientas para el Estudio de Células Vivas"* para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que este trabajo se ha llevado a cabo en la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I para que así conste, firman el presente certificado.

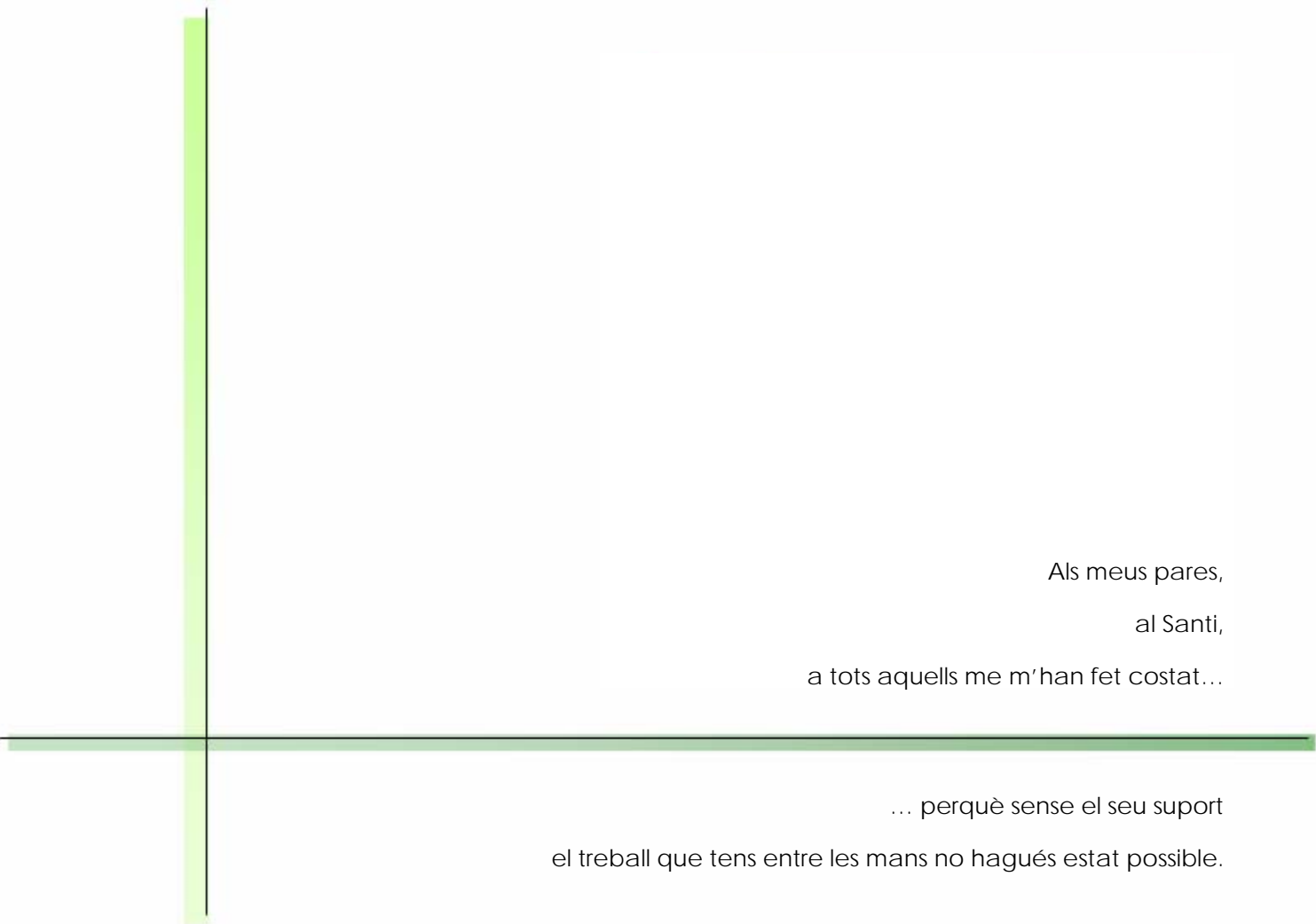
Dra. Carme Nogués Sanmiquel

Dra. M<sup>o</sup>Elena Ibáñez De Sans

Dr. Jose Antonio Plaza Plaza

Bellaterra, Abril de 2011





Als meus pares,  
al Santi,  
a tots aquells me m'han fet costat...

... perquè sense el seu suport  
el treball que tens entre les mans no hagués estat possible.



---

*Biology is imperfect, the sole reason why it survives.*

---

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, a través de los proyectos MINAHE II (TEC2005-07996-C02) y MINAHE III (TEC2008-06883-C03).



<i>Síglas y Acrónimos</i> .....	v
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1.1. El Estudio de Célula Única</b> .....	3
1.1.1. Análisis de Célula Única.....	3
1.1.2. Análisis de Célula Única Viva.....	5
1.1.3. Localización, Seguimiento de Células y Codificación Celular.....	8
<b>1.2. Dispositivos Microelectrónicos y Micro-Nanopartículas</b> .....	11
1.2.1. Microsistemas.....	11
1.2.2. Fabricación de MEMS.....	13
1.2.3. BioMEMS.....	14
1.2.3.1 <i>Métodos de Detección con BioMEMS</i> .....	15
1.2.3.2 <i>Aplicaciones de los BioMEMS en Estudios Celulares</i> .....	16
1.2.3.3 <i>Modificación de Superficies</i> .....	18
1.2.4. Micro y Nanopartículas en Biología Celular.....	20
1.2.4.1 <i>Interiorización de Micro y Nanopartículas en Células Vivas</i> .....	21
1.2.4.2 <i>Citotoxicidad de Micro y Nanopartículas</i> .....	26
1.2.4.3 <i>Aplicaciones de Micro y Nanopartículas</i> .....	28
1.2.5. Miniaturización de los BioMEMS para el Estudio desde el Interior Celular.....	29
<b>2. Objetivos</b> .....	31

<b>3. Material y Métodos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1. Micropartículas</b> .....	<b>37</b>
3.1.1. Características de las Micropartículas.....	37
3.1.2. Fabricación de las Micropartículas.....	38
3.1.3. Funcionalización de la Superficie de las Micropartículas de Polisilicio.....	39
3.1.3.1 <i>Adsorción</i> .....	39
3.1.3.2 <i>Unión Covalente</i> .....	41
Selección del Silano.....	42
Evaluación del Proceso de Silanización.....	43
3.1.3.3 <i>Valoración de la Eficiencia y la Estabilidad de la Funcionalización</i> .....	44
<b>3.2. Tipos celulares y Análisis realizados</b> .....	<b>45</b>
3.2.1. Monocitos / Macrófagos THP-1.....	46
3.2.1.1 <i>Análisis de la Interiorización Celular de las Micropartículas</i> .....	47
3.2.1.2 <i>Estudio de la Localización Intracelular de las Micropartículas</i> .....	48
3.2.1.3 <i>Estudio de la Citotoxicidad de las Micropartículas</i> .....	49
3.2.1.4 <i>Etiquetaje y Seguimiento Individualizado de Células Vivas con Códigos</i> .....	50
3.2.2. Embriones de Ratón.....	50
3.2.3. Células Vero.....	52
3.2.3.1 <i>Estudio de Citotoxicidad de los Códigos Modificados con WGA</i> .....	52
3.2.3.2 <i>Seguimiento Individualizado de Células con Códigos Modificados con WGA</i> .....	53
<b>4. Resultados</b> .....	<b>55</b>
ARTÍCULO 1: "Internalization and cytotoxicity analysis of silicon-based microparticles in macrophages and embryos".....	57
ARTÍCULO 2: "Intracellular polysilicon barcodes for cell tracking".....	69
ARTÍCULO 3: "Chemical functionalization of polysilicon microbarcodes for single cell studies".....	79

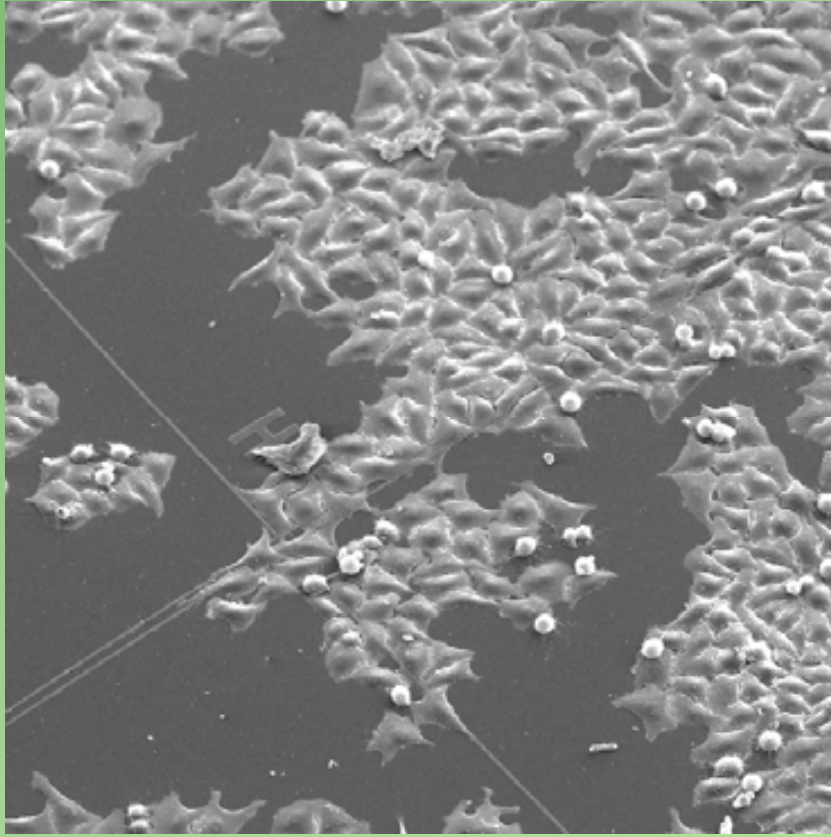
5. <b>Discusión</b> .....	93
5.1. Selección de Materiales y Diseño de las Micropartículas.....	95
5.2. Interiorización y Destino Intracelular de las Micropartículas en Macrófagos.....	96
5.3. Citotoxicidad de las Micropartículas en Macrófagos y Embriones de Ratón.....	99
5.4. Etiquetaje y Seguimiento Individualizado de Células con Capacidad Fagocítica mediante Códigos de Polisilicio.....	101
5.5. Modificación de la Superficie de Micropartículas de Polisilicio y validación de la Técnica.....	102
5.6. Etiquetaje y Seguimiento Individualizado de Células sin Capacidad Fagocítica mediante Códigos de Polisilicio.....	106
6. <b>Conclusiones</b> .....	109
7. <b>Bibliografía</b> .....	113



## SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AFM	microscopio de fuerza atómica ( <i>Atomic Force Microscope</i> )
APTMOS	(3-aminopropil) trimetoxisilano ( <i>3-AminoPropyl TriMethOxy Silane</i> )
BioMEMS	sistemas microelectromecánicos para aplicaciones biológicas ( <i>Biological MicroElectroMechanical Systems</i> )
BSA	albúmina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CLSM	microscopio láser confocal ( <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> )
CVD	deposición química en fase vapor ( <i>Chemical Vapor Deposition</i> )
DRIE	grabado profundo por iones reactivos ( <i>Deep Reactive Ion Etching</i> )
FBS	suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FIB	haz de iones focalizado ( <i>Focused Ion Beam</i> )
GFP	proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GPTMOS	(3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano ( <i>3- GlycidoxyPropylTriMethOxySilane</i> )
HRP	peroxidasa de rábano ( <i>HorseRadish Peroxidase</i> )
IgG	inmunoglobulina G ( <i>Immunoglobulin G</i> )
IgG <sup>488</sup>	IgG conjugado con Alexa Fluor 488 ( <i>Alexa Fluor 488-conjugated IgG</i> )
MEMS	sistemas microelectromecánicos ( <i>MicroElectroMechanical Systems</i> )
MGT	tiempo medio de generación ( <i>Mean Generation Time</i> )
MTT	bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol ( <i>3-(4,5-DiMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenylTetrazolium bromide</i> )
PBS	tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PDMS	polidimetilsiloxano ( <i>PolyDiMethylSiloxane</i> )
PEG	polietilenglicol ( <i>PolyEthyleneGlycol</i> )
PGA	ácido poli-L-glutámico ( <i>Poly(L-Glutamic Acid)</i> )
pSi-MP	micropartículas cilíndricas de polisilicio ( <i>polySilicon MicroParticles</i> )
PS-MP	micropartículas de poliestireno ( <i>polyStyrene MicroParticles</i> )
PVD	deposición física en fase vapor ( <i>Physical Vapor Deposition</i> )
RIE	grabado por iones reactivos ( <i>Reactive Ion Etching</i> )
ROS	especies reactivas del oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )

SEM	microscopio electrónico de barrido ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )
Si-MP	micropartículas de silicio ( <i>Silicon MicroParticles</i> )
TA	Temperatura <b>A</b> mbiente
TEM	microscopio electrónico de transmisión ( <i>Transmission Electron Microscope</i> )
TESUD	trietoxisilil undecanal ( <i>TriEthoxySilylUnDecanal</i> )
UV	luz ultravioleta ( <i>UltraViolet light</i> )
WGA	aglutinina de germen de trigo ( <i>Wheat Germ Agglutinin</i> )
WGA <sup>561</sup>	<b>WGA</b> conjugada con Texas Red <sup>®</sup> -X, de máximo de emisión a <b>561</b> nm
XPS	espectrómetro de rayos-X de energía dispersiva ( <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> )



## 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1 EL ESTUDIO DE CÉLULA ÚNICA

La mayoría de las técnicas actuales para el estudio celular se basan en el análisis de poblaciones celulares y proporcionan, por tanto, resultados que corresponden a valores promedio de toda la población. Sin embargo, las células de una misma población no son entidades homogéneas. Estudios de actividad enzimática, expresión génica o señalización celular entre otros, indican la existencia de una variabilidad substancial entre células fenotípicamente similares (Levsky y Singer 2003; Bengtsson *et al.* 2005; Warren *et al.* 2006; Peixoto *et al.* 2007; Wang y Bodovitz 2010). Esta diversidad es especialmente destacable en tipos celulares como las células madre o progenitoras, pero también en células primarias de mamíferos, procariontes, e incluso en levaduras (de Souza 2010). Por otro lado, procesos complejos como la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario temprano o la transformación celular durante los primeros estadios de la carcinogénesis implican cambios en el comportamiento celular que inicialmente se generan en unas pocas células de la población.

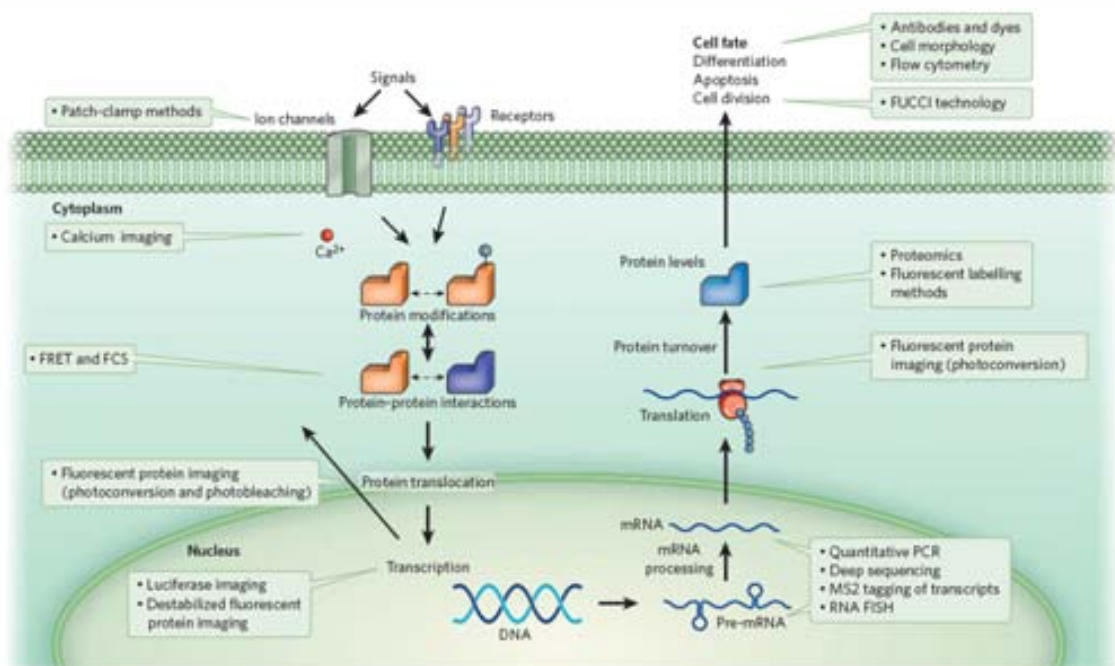
Ante esta variabilidad, es evidente la limitación de los estudios celulares poblacionales y la necesidad de disponer de sistemas adecuados para el estudio de células individuales (análisis de célula única) (revisado por Spiller *et al.* 2010; revisado por Kalisky *et al.* 2011). Con ello se podría lograr una mayor comprensión del funcionamiento celular y tisular, y se podrían detectar aquellos comportamientos o respuestas poco frecuentes, pero importantes, por ejemplo, en los estadios iniciales de desarrollo de una patología. Por otro lado, el análisis de célula única también sería útil para el estudio de tipos celulares poco abundantes, como los ovocitos y embriones, las células madre, o las células neoplásicas (Cossman 2001; Klein *et al.* 2002).

### 1.1.1 ANÁLISIS DE CÉLULA ÚNICA

Los sistemas de análisis de célula única pueden agruparse principalmente en técnicas moleculares y de microscopía (Figura 1), aunque en muchos casos se utilizan ambas simultáneamente. En el primer caso las células deben ser procesadas utilizando sistemas de extracción y purificación del material que se va a analizar, generalmente ácidos nucleicos (DNA y RNA) y proteínas. Por otro lado, las técnicas de microscopía permiten analizar tanto células fijadas como vivas. Son técnicas generalmente cualitativas que

pueden dar información acerca de la organización celular y su dinámica durante un tiempo limitado.

La mayor parte de las técnicas moleculares existentes para célula única están diseñadas para analizar ácidos nucleicos, y muy pocas permiten estudiar proteínas. Una de las técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) en célula única, que permite detectar, por ejemplo, anomalías genéticas causantes de enfermedades hereditarias utilizando una sola célula de un embrión en estadio de 4 ó 8 células (Goossens *et al.* 2008). Otras técnicas como la hibridación fluorescente *in situ* (*Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH) ó la hibridación genómica comparada (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) permiten detectar anomalías cromosómicas en células individuales de una población (Fiegler *et al.* 2007), o en los blastómeros aislados de un embrión (Egozcue *et al.* 2000; Rius *et al.* 2010).



**Figura 1. Procesos dinámicos en las células y metodologías de análisis de los mismos en células únicas (Spiller *et al.* 2010).**

FCS = espectroscopia de correlación de fluorescencia; FISH = hibridación *in situ* fluorescente; FRET = transferencia de energía de resonancia de Förster; FUCCI = indicador fluorescente del ciclo celular basado en la ubiquitinación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

Los estudios moleculares relacionados con el contenido proteico en célula única todavía son un hito bastante lejano (de Souza 2010) y, en muchos casos, es necesario el uso simultáneo de un microscopio. La tomografía crío-electrónica, por ejemplo, ha logrado la reconstrucción tridimensional de células individuales seccionadas para

estudiar la organización del citoesqueleto (Sartori *et al.* 2007) pero, a pesar de las mejoras en resolución y precisión, no se observa la célula viva (revisado por Anselmetti 2009).

En 2006, Fitzpatrick y colaboradores lograron detectar la presencia de proteínas marcadas por inmunocitoquímica en células individuales utilizando detectores de fluorescencia en microcanales, pero ninguna técnica actual es lo suficientemente sensible como para cuantificar estas proteínas. De todos modos, aunque las células individuales no disponen de suficientes copias de la mayor parte de proteínas como para llevar a cabo estudios de expresión génica, una buena parte del RNA de las células de mamíferos pertenece a los genes constitutivos y efectores, con >100 copias por célula (10-40 pg), que se traducen en proteínas. En poco tiempo, la optimización de las técnicas moleculares actuales permitirá detectar en una sola célula esta cantidad de RNA (Warren 2008).

Las técnicas de microscopía ofrecen las herramientas necesarias para observar células manteniendo su integridad estructural. La mayoría de técnicas clásicas como la inmunocitoquímica (detección de proteínas específicas en las células mediante anticuerpos) se basan en la observación de células que generalmente se encuentran fijadas. Ello se debe a que para que un colorante, un anticuerpo o una sonda de DNA penetren en la célula, ésta debe estar fijada y permeabilizada previamente, ya que la membrana plasmática es impermeable a la mayoría de marcadores. Actualmente, los microscopios ópticos, de fluorescencia y electrónicos siguen siendo los más utilizados. De todos modos, cada vez se tiende más a la utilización de técnicas que permiten obtener imágenes o grabaciones dinámicas de células vivas. La aparición del microscopio confocal (*Confocal Laser Scanning Microscope*, CLSM) permitió hacer ambas cosas utilizando marcadores fluorescentes vitales que pueden cruzar la membrana plasmática sin alterar sus características. La aplicación de esta u otras técnicas para el estudio de células individuales dentro de una población celular permite analizar el comportamiento individual de diferentes células frente a un mismo cambio ambiental o estímulo.

### 1.1.2 ANÁLISIS DE CÉLULA ÚNICA VIVA

En la mayoría de las técnicas de análisis de célula única revisadas en el apartado anterior, es necesario procesar la muestra a analizar, tanto si se va a trabajar con células íntegras (habitualmente fijadas) como lisadas (extractos proteicos, de DNA ó

RNA). Sin embargo, para comprender las funciones celulares lo idóneo sería poder estudiar las células vivas.

Todos los procesos celulares son dinámicos y pueden durar desde milisegundos a varias horas. Por ello, las propiedades celulares no siempre son constantes a lo largo del tiempo o durante el desarrollo de un organismo, y el patrón de expresión de los genes varía a causa de factores endógenos o en respuesta a estímulos procedentes del medio. Para analizar estos cambios en células individuales es necesario utilizar métodos de análisis que no interfieran en el funcionamiento celular. La escasez de marcadores vitales eficientes ha imposibilitado el estudio de procesos como la interacción entre proteínas, activación de cascadas de señalización, transmisión de señales al núcleo ó expresión de múltiples genes en células vivas durante mucho tiempo (Gerlich *et al.* 2003) y, hasta el momento actual, la mayor parte de los estudios publicados en células individuales se han realizado con muestras fijadas.

La mayoría de técnicas que permiten el estudio de células vivas individuales son técnicas moleculares combinadas con microscopía. Éstas se basan en la utilización de marcadores vitales específicos asociados a fluorocromos para obtener información acerca de la morfología, la genética, la bioquímica y la fisiología de las células, orgánulos o biomoléculas. A mediados de los años 90, con la clonación del gen de la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP), se logró un gran avance en este aspecto. Una vez clonado, se fusionó con multitud de proteínas diferentes, y los plásmidos obtenidos (DNA circular con el gen de la GFP y el de la proteína de interés incorporado) pudieron ser introducidos en las células por transfección. Esta técnica logra que la maquinaria celular transcriba y sintetice la proteína híbrida (con la GFP incorporada) de interés, que será funcional. La GFP marcó un punto clave para visualizar estructuras celulares y mecanismos moleculares en células vivas. Desde su implantación, la microscopia de fluorescencia ha evolucionado mejorando el rendimiento, y su automatización ha facilitado la obtención y el análisis de gran cantidad de datos (revisado por Muzzey y van Oudenaarden 2009). En 2005, por ejemplo, Rosenfeld y colaboradores incorporaron en las células genes reguladores y proteínas de fusión fluorescentes para poder cuantificar la expresión génica. Las nuevas generaciones de proteínas fluorescentes, fotoconvertibles (Figura 1), permiten su visualización a diferentes longitudes de onda, y han sido utilizadas para la determinación de linajes celulares (Wacker *et al.* 2007) o la visualización de la dinámica de fusión y fisión de las mitocondrias (revisado por Wiedenmann *et al.* 2009). Otra técnica basada también en la detección por fluorescencia, concretamente de proteínas del ciclo celular ubiquitinizadas (*Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator*, FUCCI), ha facilitado la visualización de la dinámica del ciclo celular en

células vivas aisladas y también la coordinación entre grupos de células vivas (Sakaue-Sawano *et al.* 2008) (Figura 1).

Aunque la microscopía puede no ser el método definitivo para estudios complejos en célula única, la mejora de la captura de imágenes y del análisis de datos, ya permite estudiar eventos dinámicos a nivel de célula única, determinar linajes celulares en organismos en desarrollo y extraer datos cuantificables a partir de imágenes en células vivas (revisado por Spiller *et al.* 2010). La oferta de marcadores vitales específicos asociados a moléculas fluorescentes cada vez es mayor: indicadores para iones específicos (como el  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 1), reactivos acidotrópicos con afinidad por pHs ácidos (como el de los lisosomas), o moléculas como el Hoechst (sonda que se intercala específicamente en el DNA) capaces de unirse a estructuras concretas. Otros indicadores permiten detectar células viables y no viables en cultivo (ioduro de propidio), o visualizar membranas, compartimentos celulares y orgánulos como las mitocondrias (MitoTracker™), el retículo endoplasmático (ER-Tracker™) y los lisosomas (LysoTracker™). La resolución de las técnicas actuales de microscopía han permitido incluso observar el transporte de citoplasma a núcleo de moléculas aisladas marcadas con anticuerpos fluorescentes en células permeabilizadas (Kubitscheck *et al.* 2005) (Figura 1).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un buen ejemplo de regulación de transporte y homeostasis. Los sistemas de señalización de este ión controlan buena parte de las reacciones celulares (Verkhatsky 2007) e incluso las señales de muerte celular (Orrenius *et al.* 2003) a través de enzimas, canales iónicos y transportadores. El desarrollo de indicadores fluorescentes para una determinada molécula con carga ha permitido estudiar el  $\text{Ca}^{2+}$  y otros iones a nivel celular (revisado por Paredes *et al.* 2008), y recientemente ha sido posible observar *in vivo* la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$ . Sería muy interesante poder valorar simultáneamente señales complejas de regulación celular como el  $\text{Ca}^{2+}$ , el pH o las especies reactivas del oxígeno. Ello aportaría información valiosa acerca de las relaciones entre estos parámetros celulares, pero muchos de los marcadores utilizados para visualizar estos parámetros, aunque se consideran vitales, siguen causando efectos tóxicos en cuestión de minutos o horas (Hoshino *et al.* 2007) y comprometen la viabilidad celular a medio plazo. Esta toxicidad es debida en parte al propio marcador, pero también se debe a la luz ultravioleta (UV) del microscopio de fluorescencia. La luz UV es ionizante, e induce reacciones químicas en las células que pueden alterarlas, como por ejemplo la formación de enlaces entre bases de pirimidina adyacentes. Para prevenir estas alteraciones las células puede inducir apoptosis, pero también activar la respuesta inmune liberando citoquinas y quimiocinas (revisado por Maverakis *et al.* 2010).

Para analizar a nivel molecular parámetros como los cambios de concentración de iones bajo diferentes condiciones, es imprescindible ir un paso más allá y estudiar las células de forma individual y a lo largo del tiempo. La técnica de *patch-clamp* (Figura 1), desarrollada a principios de los años 80, representó un paso fundamental en el estudio del mecanismo de acción de canales iónicos. Esta técnica permite medir las corrientes iónicas de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>... a través de un solo canal de la membrana celular. Se puede aplicar en muchos tipos celulares, pero ha sido especialmente utilizada en células excitables como neuronas (Takeda *et al.* 2010), cardiomiocitos y fibras musculares (Song *et al.* 2005), o en células secretoras como las células β pancreáticas, productoras de insulina (Kanno *et al.* 2002).

Existen otras técnicas no invasivas que podrían ser útiles para los estudios en célula única viva, pero están todavía al principio de su desarrollo y por el momento son poco sensibles (revisado por Spiller *et al.* 2010). La microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM), por ejemplo, permite analizar la topografía de la membrana celular (Muller 2008) sin necesidad de tratar las células. Otras técnicas como la estimulación de cromóforos naturales como la hemoglobina con una longitud de onda específica (Min *et al.* 2009), o la espectroscopia Raman también permiten el análisis de células sin tratar. Esta última técnica se basa en la alteración de los niveles de energía específicos de cada molécula (revisado por Evans y Xie 2008). En 2008, utilizando la espectrometría de masas, Mizuno y colaboradores lograron identificar proteínas específicas del tipo celular estudiado analizando extractos de citoplasma procedentes de una célula viva.

### 1.1.3 LOCALIZACIÓN, SEGUIMIENTO DE CÉLULAS Y CODIFICACIÓN CELULAR

Para poder estudiar una misma célula viva a lo largo del tiempo es necesaria la monitorización continuada de la misma o bien etiquetarla individualmente. La posibilidad de localizar y trazar el desplazamiento de células individuales es de gran interés en biología celular para evaluar la conducta celular (supervivencia y movilidad celular, interrelación con otras células, etc.) bajo diferentes condiciones como por ejemplo, exposición a gases, compuestos tóxicos, productos químicos (quimiotaxis), estímulos lumínicos (fototaxis), o rayos-X y gamma. El interés en el desarrollo de técnicas de seguimiento celular ha incrementado también debido a las posibilidades que ofrecen en el estudio de procesos tan importantes como la migración y el destino celular durante la embriogénesis, la maduración de las células del sistema inmune y

hematopoyético (Dooner *et al.* 2004; Schroeder 2005), o la evaluación del crecimiento y regeneración neuronal (Kofron *et al.* 2009).

Generalmente, los ensayos de movilidad y migración celular se han realizado utilizando cámaras de quimiotaxis (Barlow *et al.* 2005), que proporcionan información sobre grupos numerosos de células. Sin embargo, para detectar el desplazamiento de células individuales es necesario el uso de otro tipo de técnicas como el aislamiento de células en microcompartimentos (Kuchimaru *et al.* 2008), el marcaje con isótopos radioactivos (Laval-Gilly *et al.* 2000), o la monitorización continuada o en *time-lapse* mediante sistemas de captura informatizados acoplados a microscopios (Chen *et al.* 2006; Li *et al.* 2008; Schmidt 2008; Hamilton 2009).

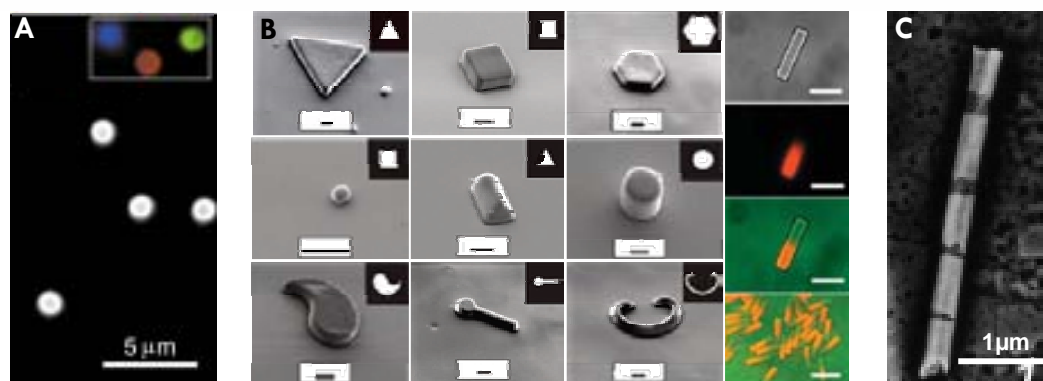
Sin embargo, estos sistemas de seguimiento de células individuales no están optimizados del todo. Las células se dividen y se mueven, y pueden salir del campo de observación. En muchos casos, es necesario aislar unas células de las otras, lo cual puede provocar cambios en la señalización y la respuesta celular. En otros casos el seguimiento se realiza utilizando marcadores fluorescentes o radiactivos, letales a corto o medio plazo. Las células son fotosensibles sobretodo a las longitudes de onda más energéticas como la radiación UV (McCarthy *et al.* 2006), pero también a las longitudes de onda del espectro visible si la exposición es prolongada (Wood *et al.* 2008). Además, debido a los diferentes índices de refracción del aire, los medios de cultivo, el citoplasma y los orgánulos celulares, la luz emitida por el microscopio se refracta y dispersa alrededor de la región iluminada, hasta una distancia de 90  $\mu\text{m}$ . Esta luz dispersada supone una iluminación más intensa que exponer las células directamente a la luz solar (Dobrucki *et al.* 2007), lo que acaba provocando daños en el DNA de las células analizadas y circundantes.

Finalmente, los sistemas más sofisticados de análisis continuo son caros, por sí mismos no pueden darnos más información de las células que su localización durante unas pocas horas, y analizan períodos de tiempo relativamente cortos debido a la dificultad de mantener permanentemente las condiciones óptimas de cultivo.

Para evitar la monitorización continuada en el seguimiento de células, es necesario marcar selectivamente las células de interés en el cultivo para poder observarlas puntualmente sin posibilidad de confusión. Aunque en la mayoría de casos no se han probado en cultivos celulares, se han propuesto modelos de etiquetaje de diversos materiales y diseños (revisado por Finkel *et al.* 2004), por ejemplo *quantum dots* de materiales semiconductores y emisión a diferentes longitudes de onda aislados (Mattheakis *et al.* 2004) ó acoplados a microesferas (Han *et al.* 2001, Figura 2A; Oh *et al.* 2006), partículas de polidimetilsiloxano (PDMS) de diferentes formas y colores (Dendukuri *et al.* 2006, Figura 2B), cristales fotosensibles de silicio poroso que emiten en



diferente longitud de onda dependiendo de las condiciones de grabado del silicio cristalino original (Cunin *et al.* 2002) o nanopartículas de diamante fotoluminescentes (Faklaris *et al.* 2008). Pero como se ha comentado en el apartado anterior, el uso de fluorocromos es un paso extra que puede producir citotoxicidad, encarece y dificulta la manufactura, requiere un microscopio de epifluorescencia o confocal para visualizar el marcaje, y la luz ultravioleta daña las células vivas (McCarthy *et al.* 2006).



**Figura 2. Sistemas de etiquetaje.**

(A) microesferas etiquetadas con *quantum dots* (Han *et al.* 2001), (B) partículas polimerizadas en PDMS solamente o con rodamina (barra = 10 µm; Dendukuri *et al.* 2006), (C) o partículas fabricadas con metales como oro y plata (Nicewarner-Peña *et al.* 2001).

Algunas nanopartículas modificadas con biomoléculas, principalmente anticuerpos, pueden reconocer estructuras específicas como proteínas de la membrana plasmática (Medintz *et al.* 2005) y permiten identificar tipos celulares concretos (Delehanty *et al.* 2009). Se han utilizado también nanopartículas con isótopos metálicos estables localizables por resonancia magnética (Vaccaro *et al.* 2008). Éste ha sido el diseño más eficaz para determinar el destino celular *in vivo*, pues permiten detectar por resonancia magnética las células marcadas una vez inyectadas en un organismo (revisado por Rogers *et al.* 2006; Hsiao *et al.* 2008), e incluso recuperarlas de los tejidos para ponerlas de nuevo en cultivo (Colvin *et al.* 2007).

Todos los modelos de etiquetaje expuestos son eficientes para analizar poblaciones celulares, pero no son de utilidad para etiquetar de forma individual diferentes células dentro de una misma población. Para ello se han propuesto varios diseños como códigos en forma de nanodiscos (Qin *et al.* 2007) o hechos con diversos metales en los cuales la disposición de estos materiales define un patrón de bandas que ejerce de código (Nicewarner-Peña *et al.* 2001, Figura 2C; Bulbarello *et al.* 2008). Sin embargo, ninguno de estos diseños ha sido probado todavía en células.



Por lo tanto, en la última década, la exploración de nuevos métodos de seguimiento a escala cada vez menor ha dado lugar a diferentes modelos de codificación para marcar y trazar poblaciones celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. La posibilidad de codificar células vivas de forma individualizada sin alterar su metabolismo supondría un gran avance en el campo de la biología celular, pero para que esto sea posible es necesario el desarrollo de sistemas de codificación y de técnicas de identificación celular más adecuados.

## 1.2. DISPOSITIVOS MICROELECTRÓNICOS Y MICRO-NANOPARTÍCULAS

El interés en el desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de células vivas de forma individualizada es cada vez mayor. Esta necesidad ha motivado la aparición de trabajos interdisciplinarios entre el campo de la biología y otras áreas de conocimiento muy distintas como la analítica, ingeniería o electrónica, y el trabajo conjunto ha hecho posible que en los últimos años se hayan empezado a desarrollar sistemas que permiten manipular y analizar células vivas aisladas en condiciones fisiológicas.

Una de estas áreas de conocimiento es la microelectrónica, la aplicación de la electrónica a componentes y circuitos de dimensiones microscópicas para producir dispositivos y equipos electrónicos de dimensiones reducidas pero altamente funcionales. Permite desarrollar estructuras y dispositivos tridimensionales con formas complejas a micro y nanoescala, y mediante su aplicación actual en el campo de la biología es posible analizar parámetros celulares a tiempo real *in vivo* e *in vitro*. Una de sus ramas que toma cada vez más fuerza es la tecnología de microsistemas.

### 1.2.1 MICROSISTEMAS

La tecnología de microsistemas puede definirse como el desarrollo e integración de sensores, actuadores y otras estructuras tridimensionales en la escala micrométrica y que utiliza principalmente técnicas de fabricación de la industria microelectrónica. Sus estructuras están en el rango de la micra (Collard *et al.* 2008) y en muchos casos incluyen circuitos electrónicos. Estos microcomponentes

combinados y optimizados proporcionan una o varias funciones específicas al dispositivo, y se los conoce también como Sistemas MicroElectroMecánicos (*MicroElectroMechanical Systems*, MEMS).

Los MEMS son de pequeño tamaño, volumen y peso, y pueden fabricarse por lotes en grandes cantidades, a bajo coste y en diferentes materiales y técnicas dependiendo del tipo de dispositivo. El silicio y el polisilicio (silicio en su forma policristalina) son los materiales más utilizados para crear la mayoría de éstos dispositivos debido a sus propiedades físicas, químicas y térmicas (Petersen 1982).

Las aplicaciones de los MEMS son muy variadas: desde la electrónica de consumo (cabezales de disco duro, inyectores de impresoras de tinta) a automoción (sensores de navegación, acelerómetros para airbags), comunicaciones (interruptores, sistemas de proyección) o medicina.

En esta última área los microimplantes de MEMS facilitan el tratamiento de disfunciones musculares y nerviosas estimulando eléctrica y químicamente sólo los músculos denervados (Cockerham *et al.* 2008), mimetizan el sistema electromecánico de la cadena osicular timpánica enviando pulsos eléctricos al oído interno y mejorando la audición (Urquiza *et al.* 2009), actúan como marcapasos o sensores de presión a tiempo real en anillos adheridos a la pared externa de los vasos sanguíneos (Cong *et al.* 2006), o suministran medicamentos dispuestos en miles de reservorios cuya activación puede ser programada independientemente por comunicación inalámbrica (Sbiaa 2006).

A nivel molecular, los MEMS han aportado mecanismos de detección y selección de biomoléculas. A través de voladizos con anticuerpos, capaces de deformarse y cambiar su frecuencia de resonancia, es posible detectar ciertas proteínas, por ejemplo marcadores tumorales. El desarrollo de pinzas moleculares funcionalizadas ha permitido atrapar biomoléculas de forma selectiva (revisado por Ferrari 2005). En el campo celular, se han desarrollado microcámaras de cultivo capaces de mantener un flujo de nutrientes y medio fresco para células o microorganismos (revisado por Ingham *et al.* 2008). A pesar del potencial de estas tecnologías, la utilización de los sistemas existentes de detección de parámetros celulares en células aisladas a tiempo real generalmente es compleja (Kasili *et al.* 2004), con lo cual su optimización sigue suponiendo un reto (Elman *et al.* 2008).

### 1.2.2 FABRICACIÓN DE MEMS

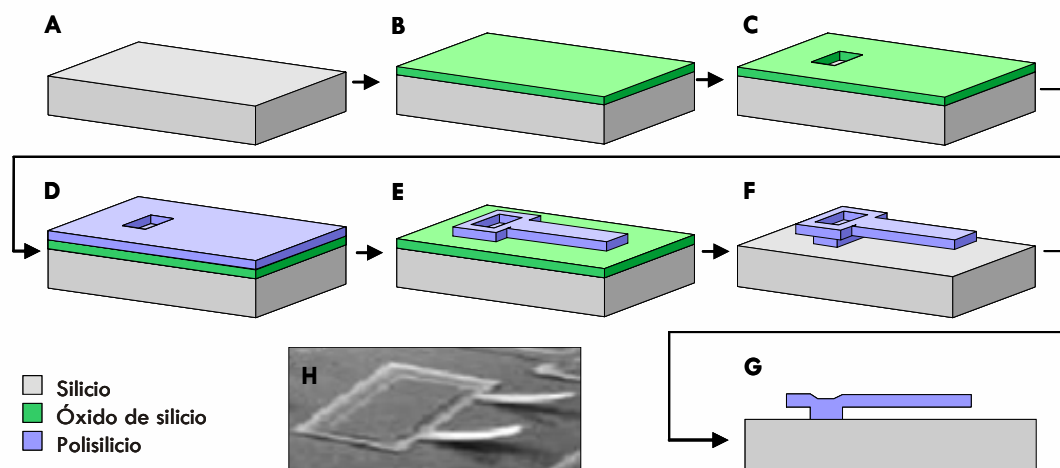
La fabricación de MEMS se basa en las técnicas habituales de fabricación de circuitos microelectrónicos en combinación con técnicas específicas para la estructuración tridimensional. Se suele partir de una fina lámina de material semiconductor llamada oblea, habitualmente de silicio, sobre la cual se depositan materiales como polisilicio, compuestos de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiC}$ ), metales o compuestos metálicos (Au, Ti, Ni, Al, ZnO), cerámicas y/o materiales orgánicos (polímeros, enzimas, DNA, anticuerpos).

Para la fabricación de MEMS basados en silicio se utilizan tecnologías como la deposición física (*Physical Vapor Deposition*, PVD) o química (*Chemical Vapor Deposition*, CVD) de materiales, la fotolitografía para crear un patrón en estas capas, y el grabado para producir las formas necesarias (revisado por Madou 2002).

La estructuración de las capas mediante procesos fotolitográficos es la gran ventaja de esta tecnología. La fotolitografía se basa en la transferencia de un patrón a un material fotosensible por exposición selectiva a una fuente de radiación, como por ejemplo la luz UV. El patrón de la radiación es transferido al material expuesto, lo cual modifica las propiedades entre las regiones expuestas y no expuestas. La eliminación de la resina que ha sido iluminada (resina positiva) o bien de la que no lo ha sido (resina negativa) proporciona una máscara para el material que está debajo.

La eliminación de las capas se puede realizar mediante grabado húmedo o seco. El grabado húmedo consiste en la disolución del material cuando es sumergido en una solución química, mientras que en el grabado en seco el material se pulveriza o disuelve mediante vapores de iones reactivos. Debido a su mejor rendimiento, se utilizan más las técnicas de grabado en seco: RIE (*Reactive Ion Etching*, grabado por iones reactivos) o DRIE (*Deep RIE*, grabado profundo por iones reactivos).

Para mostrar la complejidad de estos procesos y a modo de ejemplo, la figura 3 detalla la fabricación de una viga en voladizo (Benítez et al. 1996). Esta estructura tiene multitud de aplicaciones en nanomecánica, como por ejemplo el reconocimiento biomolecular (Fritz et al. 2000; Lechuga et al. 2006).



**Figura 3. Fabricación de un microsistema mediante depósitos y procesos de grabado.**

En una oblea de silicio (A), se deposita una capa sacrificial (que al final del proceso será eliminada) de óxido de silicio (B) y se estructura mediante un proceso fotolitográfico y un grabado en seco (RIE) en la cara superior (C). A continuación, se deposita una capa estructural de polisilicio (D) y se define el dispositivo por un segundo grabado en seco RIE (E). Finalmente se elimina la capa sacrificial de óxido de silicio mediante un grabado húmedo (F) para liberar la estructura (G) y obtener el dispositivo funcional (H). Benítez *et al.* 1996.

### 1.2.3 BioMEMS

Los BioMEMS se definen como sistemas o dispositivos construidos mediante técnicas de fabricación a micro o nanoescala, ya sea para procesar, liberar, manipular, analizar o construir entidades biológicas o (bio)químicas (Nuxoll y Siegel 2009). Sus principales aplicaciones son en el campo de la bioquímica y de las tecnologías relacionadas con la salud (análisis biológicos y biomédicos) (Demirci 2007; Jeon 2007), desde los  $\mu$ TAS (*Micro Total Analysis Systems*, MicroSistemas de Análisis Total), a los *Lab-on-a-chip* (laboratorios en un chip) que, tal y como indica su nombre, generalmente son biosensores o quimiosensores que integran múltiples procesos en un chip (Ferrari 2007). Para su fabricación se utilizan materiales relacionados con la microelectrónica (silicio, borosilicatos), plásticos y polímeros (PDMS, SU-8), y materiales biológicos (proteínas, células y tejidos). En muchos casos, los BioMEMS hacen uso de las técnicas de modificación de superficies para mejorar sus funciones o hacerlos biocompatibles.

### 1.2.3.1 Métodos de Detección con BioMEMS

Los BioMEMS permiten estudiar moléculas biológicas o células. En el segundo caso, prácticamente siempre lo hacen desde el exterior celular. Los métodos de detección más utilizados con tecnologías de BioMEMS son los mecánicos, eléctricos y ópticos (revisado por Bashir 2004) (Figura 4).

La detección mecánica se hace mediante sensores tipo voladizo (*cantilevers*), ya sea por detección de esfuerzos mecánicos o por masa (Figura 4A). Permiten detectar, por ejemplo, reacciones bioquímicas que tienen lugar selectivamente en una cara del voladizo, como la hibridación de dos tipos de oligonucleótidos complementarios entre sí cuando uno de ellos está unido al voladizo: la reacción provoca un estrés que dobla el voladizo, y el cambio puede ser medido óptica o eléctricamente. Mediante este mecanismo ha sido posible detectar proteínas y oligonucleótidos capaces de reaccionar con biomoléculas ancladas sobre voladizos de silicio (Fritz *et al.* 2000).

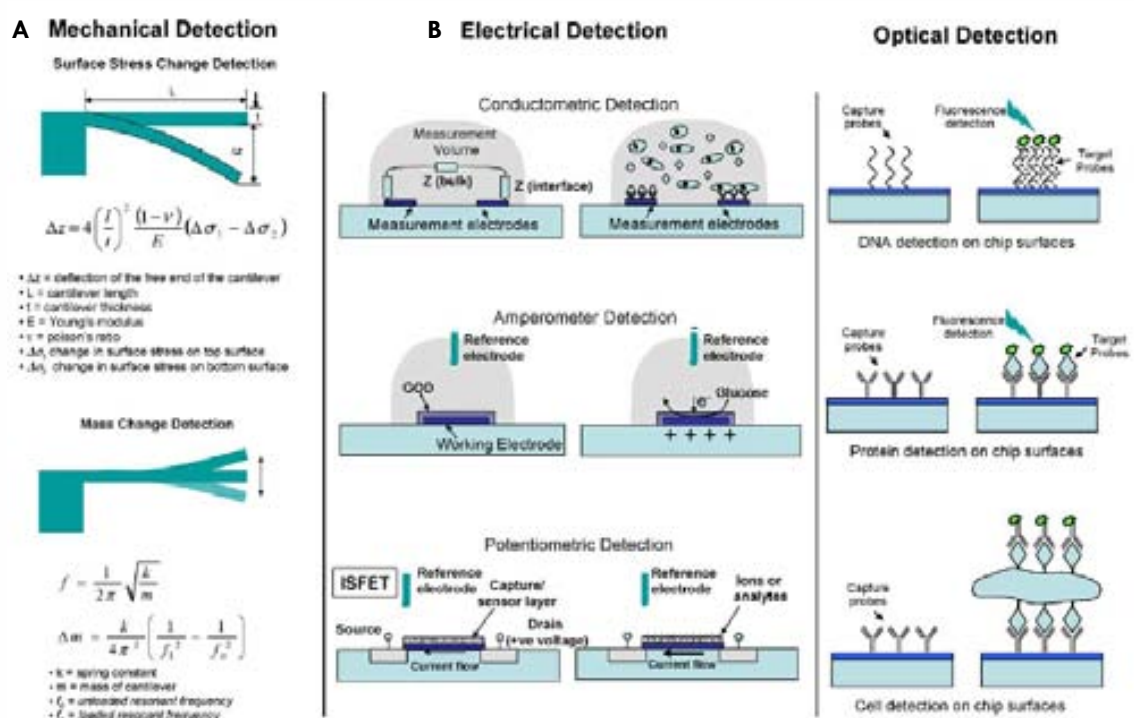


Figura 4. Métodos de detección más comunes en la tecnología de los BioMEMS.

(A) sensor mecánico, (B) eléctrico y (C) óptico (Bashir 2004).

La detección eléctrica (Figura 4B) permite medir reacciones redox, un cambio de potencial, o un cambio en la conductividad del medio (Li y Harrison 1997). Son muy

conocidos, por ejemplo, los sensores de glucosa que catalizan la oxidación de la glucosa a  $\beta$ -D-gluconolactona y generan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual reacciona con la Peroxidasa de Rábano (*HorseRadish Peroxidase*, HRP) formando un producto que precipita y se oxida de nuevo, liberando un electrón por cada molécula procesada; el flujo de electrones es utilizado como medida de la concentración de glucosa. En la industria de la alimentación, este proceso ha sido utilizado para detectar la concentración de glucosa en el vino (Gonzalo-Ruiz *et al.* 2007).

En muestras de sangre y orina, la detección de la concentración de glucosa suele hacerse siguiendo este mismo proceso, pero mediante un sensor óptico que detecta el pigmento producido por la HRP (Sanz *et al.* 2007). Los detectores ópticos suelen utilizar fluorocromos para valorar fluorescencia o quimiluminiscencia mediante marcadores que emiten a una determinada longitud de onda (revisado por Vo-Dinh y Kasili 2005) (Figura 4C). Se han usado en células por ejemplo para detectar apoptosis, introduciendo en el citoplasma nanofibras ópticas con un reactivo específico inmovilizado capaz de emitir luz al reaccionar con la caspasa-9 (Kasili *et al.* 2004).

### 1.2.3.2 Aplicaciones de los BioMEMS en estudios celulares

El campo de los BioMEMS se originó para explorar tejidos, células, microorganismos, DNA u otras biomoléculas mediante herramientas de tamaño microscópico, utilizando las técnicas de detección descritas. Estos BioMEMS deberían permitir analizar procesos biológicos básicos tales como la diferenciación y el ciclo celular, la producción de  $CO_2$  y especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), el almacenamiento de energía en forma de ATP, o la acumulación y liberación de  $Ca^{2+}$ . Aunque todavía no ha sido posible llevar a cabo estudios tan complejos, en el futuro los BioMEMS pueden suponer una mejora sustancial en la investigación biomédica y la práctica clínica.

En la actualidad, una de las aplicaciones más interesantes de los BioMEMS son los biosensores, que pueden ser MEMS modificados con moléculas orgánicas, como por ejemplo proteínas, o MEMS usados para analizar material biológico (revisado por Jonkheijm *et al.* 2008). Son capaces de registrar, procesar e interpretar datos biológicos muy rápidamente. Se componen de un sensor biológico (enzimas, anticuerpos, oligonucleótidos), un transductor que traduce la señal emitida por el sensor, y un detector (óptico, piezoeléctrico, térmico, magnético). El ejemplo más común de biosensor es el que mide la glucosa en la sangre (Gonzalo-Ruiz *et al.* 2007) mediante el proceso descrito en el apartado anterior.

En el área de la biología celular, los BioMEMS de silicio se han utilizado para diversas aplicaciones: estudios con AFM, por ejemplo, han permitido detectar que la membrana plasmática de las células sanas presenta una rigidez hasta un 70% mayor que la de las células cancerosas (Cross *et al.* 2007); también se ha podido calcular el peso de moléculas y bacterias utilizando resonadores, que al unirse selectivamente a un canal microfluídico suspendido en un voladizo, le alteran la frecuencia de resonancia (Fritz *et al.* 2000; Burg *et al.* 2007); del mismo modo ha sido posible reconocer proteínas que, al anclarse específicamente a la superficie de un voladizo, le provocan estrés y lo curvan (Shekhawat *et al.* 2006). El interés en la sofisticación de este tipo de estudios es creciente, pues se piensa que en el futuro, el estudio de la deformación mecánica de proteínas y ácidos nucleicos puede proporcionar algunas de las claves para comprender los cambios en la estructura, función y respuesta celular bajo presión, lo cual sería de gran ayuda en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Bao y Suresh 2003).

Otra aplicación de los BioMEMS es el posicionamiento de células de forma controlada sobre zonas específicas con microelectrodos aplicando voltajes suaves en una superficie (Gray *et al.* 2004), o manipular y posicionar células marcadas con partículas magnéticas variando los campos magnéticos en un sistema de microcanales (Lee *et al.* 2007). Asimismo, aplicando la microfluídica a BioMEMS con sensores ópticos ha sido posible detectar y medir en microcanales parámetros como la concentración de O<sub>2</sub> en un medio líquido, por la emisión de fluorescencia de un reactivo específico (Nock *et al.* 2008).

Los BioMEMS son los sistemas con un futuro más prometedor para la fabricación de biosensores. Son capaces de analizar cantidades muy pequeñas de solución o de biomoléculas, e integrar rápidamente los datos obtenidos electrónicamente para detectar *in vitro* toxinas, bacterias y virus (Veisheh y Zhang 2006). Parece pues que biología celular y molecular, genómica, bioquímica y medicina pueden complementarse con la microelectrónica para evolucionar conjuntamente y proporcionar herramientas que permitan conocer más a fondo el funcionamiento celular, detectar biomoléculas, manipular las células y ofrecer nuevas oportunidades en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades. Al mismo tiempo, la reducción progresiva del tamaño de los BioMEMS ha sido y será un punto clave para el desarrollo de nuevas técnicas de estudio en célula única viva (Figura 5).

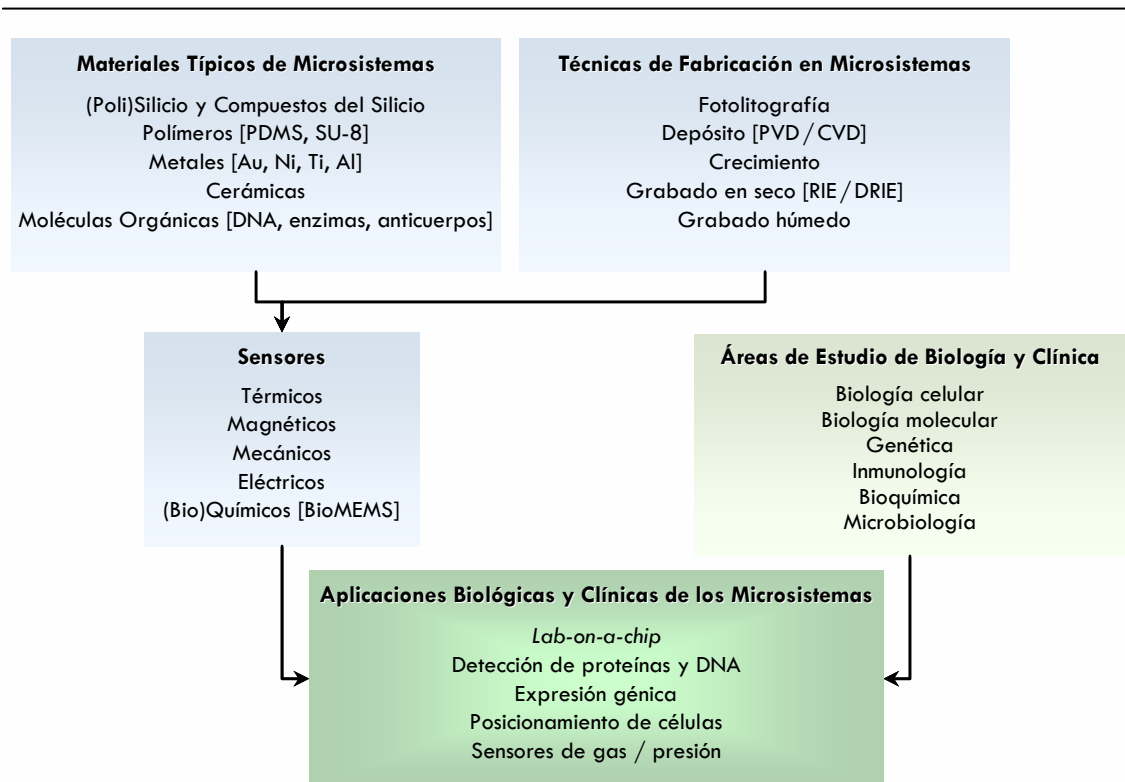


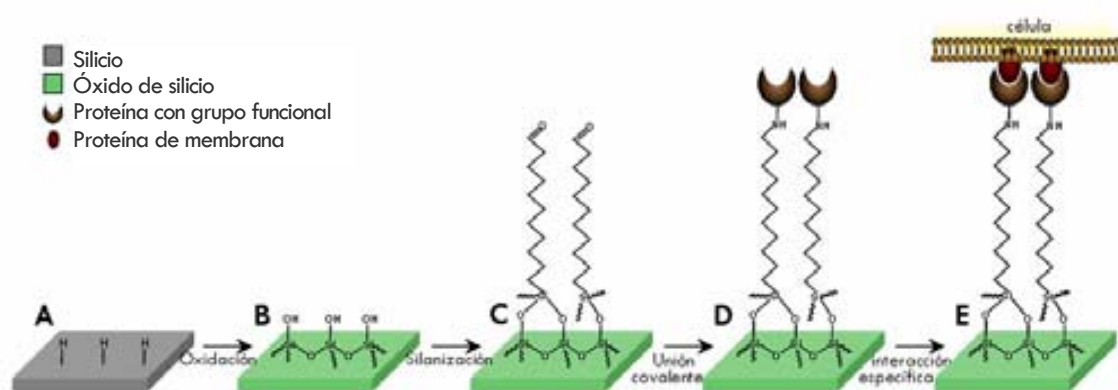
Figura 5. Confluencia de las áreas de estudio de la Biología con las tecnologías de Microsistemas.

### 1.2.3.3 Modificación de Superficies

Una de las grandes ventajas de los MEMS es que su superficie puede ser modificada químicamente para hacerla adecuada para el estudio de células u organismos vivos mediante sensores mecánicos, térmicos, ópticos, magnéticos, químicos o bioquímicos. Los BioMEMS no habrían conseguido muchos de los logros si no fuera posible la inmovilización de moléculas en su superficie. El amplio espectro de polímeros, proteínas (en especial los anticuerpos, que son capaces de reconocer específicamente epítopos concretos) y otras moléculas orgánicas, ha abierto una puerta para construir sensores y actuadores para el estudio de células y organismos vivos. Estas biomoléculas suelen asociarse a marcadores fluorescentes para facilitar la detección de procesos biológicos, la presencia o actividad de compuestos, o la expresión génica en *microarrays* (Eastman *et al.* 2006). En muchos casos, debido a la naturaleza de las moléculas y sus propiedades fisicoquímicas, todavía es un reto el enlace funcional a soportes sólidos (You *et al.* 2009), y estos procesos son todavía más complejos cuando la inmovilización se hace sobre superficies de dimensiones muy reducidas o en suspensión, como por ejemplo sobre micro y nanopartículas.



Para modificar las superficies de silicio, sin duda el material más utilizado en microelectrónica, la estrategia más común es la adhesión de moléculas mediante enlaces covalentes por funcionalización. La funcionalización es la utilización de grupos funcionales (reactivos) presentes en la superficie de un material, para unir covalentemente cualquier tipo de compuesto a esa superficie por métodos de síntesis química. Para la unión de la superficie y el compuesto de interés se utiliza una molécula puente que generalmente es un silano. Estos compuestos están formados por cadenas de átomos de silicio unidos covalentemente a átomos de hidrógeno (revisado por Shirahata *et al.* 2005). Como resultado, se obtienen MEMS funcionales bioquímicamente. Se muestra un ejemplo en la Figura 6.



**Figura 6. Modificación por funcionalización de una superficie de silicio con un silano.**

La superficie (A) se oxida en medio ácido para crear grupos silanol (-Si-OH) (B), que se hidrolizarán y reaccionarán con los grupos silanol del silano (C) dando un enlace covalente estable. El grupo aldehído (-CHO) del otro extremo del silano formará también un enlace covalente con una proteína que contenga un grupo funcional (D). Este grupo funcional será capaz de reconocer específicamente otra molécula, por ejemplo una proteína localizada en la membrana de una célula (E).

Una de las aplicaciones de la funcionalización es, como ya se ha comentado, la fabricación de *microarrays*. Hay muchos tipos distintos de *microarrays*. En los fabricados sobre superficies de silicio, por ejemplo, se pueden anclar oligonucleótidos de forma ordenada. Estas secuencias cortas de DNA de cadena sencilla pueden hibridar con sus secuencias complementarias de DNA ó RNA para detectar la presencia ó ausencia de un gen (genotipado), ó la expresión génica (revisado por Mockler *et al.* 2005). También es posible anclar carbohidratos en regiones determinadas de su superficie para detectar diferentes tipos de lectinas (Park *et al.* 2004) o viceversa (Shirahata *et al.* 2006).

La funcionalización puede usarse también para permitir la adhesión de células únicamente en regiones modificadas (Veisoh y Zhang 2006). Algunas proteínas como el colágeno permiten biocompatibilizar superficies para definir patrones sobre los cuales pueden adherirse células (Hsiung *et al.* 2008). En ensayos tipo *sandwich*, la funcionalización de la superficie de nanopartículas con oligonucleótidos y anticuerpos simultáneamente permite la detección de concentraciones muy bajas (por debajo de nM) de proteínas en solución (Oh *et al.* 2006).

Otra estrategia bastante común en el recubrimiento de superficies, aunque menos estable y específica, es la adsorción, un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material por la formación de enlaces químicos débiles (quimisorción) o a consecuencia de las fuerzas de Van de Waals (fisorción). El resultado es la formación de una película en la superficie de un cuerpo que puede, por ejemplo, facilitar la adhesión celular sobre la superficie de un detector (Teixidor *et al.* 2008).

En las nuevas generaciones de sensores se está empezando a utilizar los microorganismos para modificar superficies. Su adaptabilidad al medio en el que viven ha permitido que se estén integrando con éxito en la fabricación de BioMEMS (revisado por Inham y van Hylckama Vlieg 2008). Su capacidad de secretar compuestos orgánicos como polisacáridos extracelulares o biominerales para formar biofilms, por ejemplo, se ha utilizado como base para crecer materiales en la superficie de los MEMS. Estos materiales de estructura compleja a micro y nanoescala pueden ser usados en procesos de litografía (Chan *et al.* 2004), o bien para modificar superficies y mejorar alguna de sus características (Nguyen *et al.* 2007).

#### 1.2.4 MICRO Y NANOPARTÍCULAS EN BIOLOGÍA CELULAR

Actualmente, el uso de BioMEMS se ha limitado a aplicaciones extracelulares. Tan sólo existen algunas aproximaciones cercanas al diseño de BioMEMS intracelulares, pero se trata de dispositivos que se encuentran sólo parcialmente en el interior celular. En uno de los trabajos publicados, el dispositivo utilizaba nanofibras ópticas con un extremo introducido en el citoplasma celular para detectar la actividad enzimática de una caspasa (Kasili *et al.* 2004). En otro caso se ha logrado integrar un transistor de dimensiones nanométricas en el extremo de un filamento de silicio. Al introducir en la célula el extremo de este filamento recubierto por una bicapa lipídica, fue posible determinar de forma reproducible el potencial eléctrico intracelular de una única célula (Tian *et al.* 2010). La publicación más reciente presenta un endoscopio

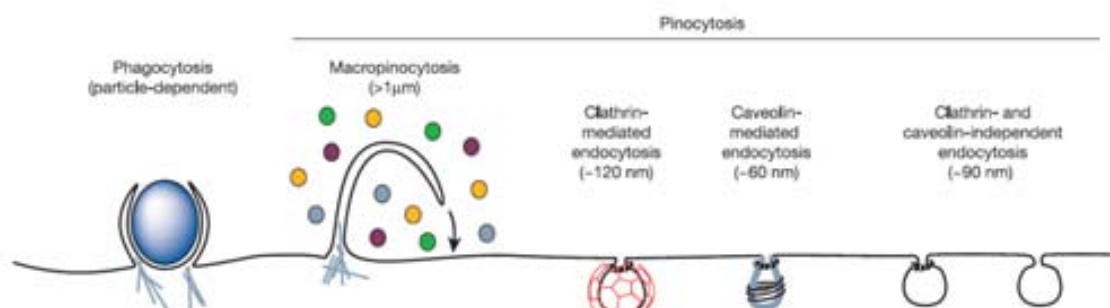
consistente en un nanotubo de carbono en el extremo de una micropipeta de vidrio convencional. Este nanotubo puede ser introducido en una célula viva para transportar pequeñas cantidades de fluidos (Singhal *et al.* 2011).

Paralelamente al desarrollo de BioMEMS que puedan actuar dentro de células vivas, se han realizado estudios con micro y nanopartículas. Ello permite analizar tanto la facilidad de interiorización como la posible toxicidad de los materiales que puedan ser de interés para la fabricación de BioMEMS (por ejemplo el silicio, uno de los más comúnmente utilizados en microelectrónica).

#### 1.2.4.1 Interiorización de Micro y Nanopartículas en Células Vivas

La endocitosis es un proceso celular por el que las células interiorizan moléculas grandes o partículas, englobándolas mediante la invaginación o evaginación de la membrana plasmática y formando una vesícula que se incorpora al citoplasma. Dependiendo del material a interiorizar (carga) existen diferentes vías de endocitosis (Figura 7).

Las células interiorizan moléculas y partículas pequeñas por un mecanismo llamado pinocitosis. Prácticamente todas las células eucariotas invaginan continuamente zonas de su membrana plasmática en forma de pequeñas vesículas pinocíticas llenas de fluido extracelular. Este proceso puede estar mediado por clatrina, por caveolina o por mecanismos de endocitosis que no dependen de estas proteínas. Independientemente del mecanismo de entrada la mayoría de los procesos liberan el material transportado al endosoma temprano que se fusionará con una vesícula rica en enzimas hidrolíticos dando lugar a un lisosoma (revisado por Pelkmans y Helenius 2002).



**Figura 7. Vías de endocitosis en las células de mamíferos.**

La vía de endocitosis depende del tamaño, la naturaleza del material a interiorizar (moléculas, partículas, células enteras, fragmentos celulares,...) y el mecanismo de formación de la vesícula (revisado por Conner y Schmidt 2003).

La macropinocitosis es un proceso mediante la cuál se incorporan grandes cantidades de fluido extracelular. En la superficie celular se crean evaginaciones a modo de ola formando una gran vesícula interna o macropinosoma. El mecanismo de formación de los macropinosomas involucra a los mismos componentes que actúan durante la fagocitosis: los filamentos de actina y la proteína motora miosina. Se utiliza para captar alimento y renovar la membrana plasmática, y se activa durante el movimiento celular para transportar grandes porciones de membrana hacia el frente de avance. Algunas bacterias son capaces de inducirla para introducirse en los macropinosomas y evitar la fagocitosis.

A parte de los procesos mencionados, algunos organismos unicelulares como las amebas o tipos celulares especializados como los macrófagos o las células dendríticas también tienen la capacidad de detectar partículas de gran tamaño y patógenos del medio externo, fagocitarlos e incorporarlos en vesículas llamadas fagosomas. Estos compartimentos celulares se fusionan con vesículas acídicas para formar un lisosoma y digerir su contenido. En estos casos, la adhesión y la posterior interiorización de las partículas depende de su carga (Thiele *et al.* 2001; Muñoz-Javier *et al.* 2006), que determina dos mecanismos distintos de fagocitosis (Swanson y Baer 1995). La superficie de la membrana plasmática tiene típicamente carga negativa (atribuible principalmente al ácido siálico presente en glicolípidos y glicoproteínas) con algunos dominios cargados positivamente. Cuando la partícula es hidrofóbica o está cargada positivamente, tiene una gran afinidad por las cargas negativas de la membrana y la célula forma pseudópodos a su alrededor rápidamente, interiorizándola mediante un proceso análogo al denominado "mecanismo de cremallera". En este caso, la membrana del fagosoma se ciñe alrededor de la partícula, formando un fagosoma compacto que inhibe o retarda la maduración de la vesícula (Thiele *et al.* 2003b). Este proceso también ocurre cuando la partícula crea interacciones ligando-receptor con la célula (Thiele *et al.* 2003a), mecanismo que utilizan algunas bacterias invasivas como *Listeria* o *Yersinia* para entrar en el citoplasma celular (Cossart y Lecuit 1998). Si la partícula tiene carga negativa, la membrana plasmática se evagina creando fagosomas mucho más laxos alrededor de la partícula; en este proceso, llamado "mecanismo de gatillo", el citoesqueleto de actina se remodela más extensamente (Male 2006).

Ciertos tipos celulares sin capacidad fagocítica inherente, como HeLa o fibroblastos, también son capaces de interiorizar partículas de tamaño micro y nanométrico (Slowing *et al.* 2006; Pan *et al.* 2007; Butoescu *et al.* 2009) mediante mecanismos de pinocitosis.

Hay varios factores que influyen en la respuesta de endocitosis de micro y nanopartículas. Hasta el momento se han publicado diversos trabajos que analizan este proceso en varios tipos celulares (Tabla 1). Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad de las partículas estudiadas en cuanto a tamaños, materiales y recubrimientos, se hace difícil extraer conclusiones.

Se ha detectado que, en células dendríticas, la respuesta fagocítica depende de la disposición estructural de las moléculas en la superficie de las partículas (en este caso nanopartículas), ya que moléculas con grupos con carga aniónica y grupos hidrofóbicos alternados penetran la membrana por difusión, mientras que cuando estos grupos tienen disposición aleatoria, las partículas tienden a quedar atrapadas en endosomas (Verma *et al.* 2008).

La fagocitosis también depende de las características físicas del material con el cual están fabricadas o recubiertas las partículas. En macrófagos y células dendríticas, por ejemplo, la tasa de interiorización se reduce considerablemente cuando las partículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (*poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA) se recubren con polímeros con carga positiva (Faraasen *et al.* 2003). Se conoce también que las partículas hidrofóbicas adsorben proteínas séricas más fácilmente que otras recubiertas con polímeros como polietilenglicol (*polyethyleneglycol*, PEG), lo cual hace que sean fagocitadas más rápidamente (Pan *et al.* 2007). Además, las partículas recubiertas con un antígeno reconocible por el tipo celular de estudio son fagocitadas con más facilidad (Thiele *et al.* 2003a), y las moléculas o partículas nanométricas con carga catiónica pueden difundir a través de la membrana celular para pasar al citoplasma (Lovrić *et al.* 2005).

Como se ha comentado previamente, la tasa de interiorización de las partículas también depende de su tamaño, puesto que éste determinará su vía de entrada en la célula (revisado por Maysinger *et al.* 2007). Geiser y colaboradores (2005) por ejemplo, detectaron que las partículas de poliestireno de tamaños inferiores a 100 nm penetran por difusión o mediante interacciones adhesivas tanto en células con capacidad fagocítica (macrófagos) como sin ella (eritrocitos), quedando libres en el citoplasma, sin ningún recubrimiento de membrana. Por el contrario, las partículas de mayor tamaño tan solo eran interiorizadas por las células con capacidad fagocítica. Foged y colaboradores (2005) sugieren que las células dendríticas interiorizan por macropinocitosis partículas de poliestireno de entre 40 y 100 nm, mientras que las de mayor tamaño (hasta 15  $\mu\text{m}$ ) son fagocitadas; la interiorización es máxima cuando su tamaño es de 0,5  $\mu\text{m}$  y, en partículas de tamaños superiores, la fagocitosis aumenta de forma considerable al modificar su superficie para darles carga positiva.

**Tabla 1. Comparativa de estudios realizados sobre interiorización de micro y nanopartículas en diversos tipos celulares.**

material	tamaño	recubrimiento	carga superficial potencial $\zeta$ (mV)	tipo celular	tiempo	resultados estudio	autor estudio
oro	{ 0,8 nm 1,2 nm 1,4 nm 15 nm }	- (sup. hidrofóbica) PEG	(+) (+)	{ fibroblastos macrófagos cél. epiteliales (HeLa) cél. de melanoma }	{ 1h 12 h 18 h 24 h }	Citotoxicidad (dosis y tamaño dependiente). (0,8nm > 15nm)	Pan <i>et al.</i> 2007
oro	2 nm	11-MUA	(+) (-)	fibroblastos	{ 1h 2,5 h 6 h 24 h }	NP <sup>+</sup> prácticamente no tóxicas. Incremento de lisis celular con NP <sup>+</sup> .	Goodman <i>et al.</i> 2004
oro	4,3 nm 4,3 nm 4,5 nm 4,9 nm	MUS MUS 66%:brOT 34% MUS 66%:OT 34% MUS 34%:OT 66%	-38,0 -31,1 -33,1 -35,2	células dendríticas	{ 3h 6 h }	Las NP <sup>+</sup> crean agujeros transitorios de membrana asociados a citotoxicidad. Las NP <sup>-</sup> no. La ordenación de las moléculas superficiales en la NP reduce la disrupción.	Verma <i>et al.</i> 2008
oro poroso	150 nm (2,4 nm poro)	HTC AP GP GEGP FAP	-34,73 -4,68 -3,25 +0,57 +12,81	células epiteliales (HeLa)	{ 6 h 10 h }	Las NP sin modificar no citotóxicas a las 96 h. El recubrimiento altera la endocitosis (FAP facilita la endocitosis mediada por receptor; AP y GP por caveolas), y las cargas + facilitan la retención en endosomas.	Slowing <i>et al.</i> 2006
PS	0,1 $\mu$ m 0,1 $\mu$ m 0,5 $\mu$ m 1 $\mu$ m 1 $\mu$ m 1 $\mu$ m 4,5 $\mu$ m	— PLL / PA / TT — — PLL / PA / TT PrS / WGA —	-60,6 +20,1 / -44,4 / -26,9 -54,1 -60,1 +12,4 / -57,4 / -42,9 +41,4 / -53,0 -66,9	células dendríticas	24 h	MP <sup>+</sup> se endocitan más fácilmente que MP <sup>-</sup> . Tamaño óptimo <0,5 $\mu$ m. Citotoxicidad dependiente de tiempo y concentración.	Foged <i>et al.</i> 2005
PS	{ 78 nm 0,2 $\mu$ m 1 $\mu$ m }	—	(-)	{ macrófagos eritrocitos }	4 h	Interiorización por difusión e interacciones adhesivas: partículas no rodeadas de membranas (<1 $\mu$ m). En NP <100nm la endocitosis no depende de carga.	Geiser <i>et al.</i> 2005
PS	1 $\mu$ m	— PLL 29 PLL 99 PEI IgG humana BSA	-0,8 +38,2 +42,0 +45,7 -21,1 -16,9	{ macrófagos células dendríticas }	4 h	IgG favorece endocitosis, BSA la dificulta. Ambas en fagosomas ácidos (pH $\leq$ 5). Las MP <sup>+</sup> favorecen la endocitosis. Acidificación endosomal menor (pH $\geq$ 6). Membrana fagosomal más laxa en MP <sup>-</sup> que en MP <sup>+</sup> .	Thiele <i>et al.</i> 2003b
PS	1 $\mu$ m	{ — BSA -COOH PLL }	(-), (+) con PLL (-) (-) (-) (-)	células dendríticas	4 h	En MP, la carga + favorece la interiorización. $\alpha$ 2GP y IgG promueven fagocitosis durante las 2 h posteriores a la adsorción en MP. HSA inhibe la fagocitosis.	Thiele <i>et al.</i> 2003a
PS	1,5 $\mu$ m	—	(-)	{ macrófagos células dendríticas }	24 h	Capacidad fagocítica: macrófagos > monocitos > células dendríticas > APC.	Kiama <i>et al.</i> 2001
PS	{ 1 $\mu$ m 4,5 $\mu$ m }	— BSA PLL	-58,3 / -56,4 -19,5 / -19,5 +49,7 / +39,6	{ macrófagos células dendríticas }	4 h	La PLL (MP <sup>+</sup> ) favorece la interiorización y maduración de células dendríticas A + tamaño, - endocitosis.	Thiele <i>et al.</i> 2001
PS	{ 1 $\mu$ m 6 $\mu$ m 20 $\mu$ m }	— lipoglicanos	s.d. s.d.	macrófagos	{ 1 h 2 h }	La activación del receptor de manosa en fagosomas reduce su fusión con los lisosomas.	Kang <i>et al.</i> 2005
PS PS:APOH	3 $\mu$ m	— albúmina sérica IgG osteopontina	(-) / neutro / (+) s.d. s.d. s.d.	macrófagos	30min	IgG, osteopontina e hidroxiapatita aumentan la tasa de fagocitosis.	Pedraza <i>et al.</i> 2008

material	tamaño	recubrimiento	carga superficial potencial $\zeta$ (mV)	tipo celular	tiempo	resultados estudio	autor estudio
PS PLGA	{ 4,5 $\mu\text{m}$ 1-10 $\mu\text{m}$ }	— PLL-g-PEG PLL-g-PEG-RGD RDG	(-) (+) (+) (+)	{ macrófagos células dendríticas }	{ 1 h 4 h 24 h 48 h }	PLL-g-PEG (no tóxica) reduce la fagocitosis. La secuencia RGD la activa específicamente, y la RDG no aunque se mantiene la carga.	Faraasen <i>et al.</i> 2003
PLGA	1,4 $\mu\text{m}$	— psoralen A	-3,2 +10,6	macrófagos	{ 15min 30min 2 h }	El psoralen A se libera e intercala en el DNA al degradarse la MP, absorbe luz UV y daña el DNA	Gomes <i>et al.</i> 2006
PLGA	{ 3,3 $\mu\text{m}$ 3,5 $\mu\text{m}$ }	— DPPC	(-) (-)	macrófagos	1 h	Reducción fagocitosis en presencia de DPPC	Evora <i>et al.</i> 1998
PLGA	1 - 10 $\mu\text{m}$	—	s.d.	macrófagos	{ 24 h 5 días 8 días 10 días }	No hay MP en endosomas tardíos o lisosomas hasta >10 días. Podrían liberarse de estas vesículas.	Trombone <i>et al.</i> 2007
CdTe	2 nm	ácido mercaptopropiónico	(-)	células epiteliales (MCF-7)	{ 2 h 4 h 8 h 24 h }	Las NP inducen formación de ROS: muerte celular por daños en la membrana, mitocondrias y núcleo. La funcionalización con antioxidantes lo previene.	Lovrić <i>et al.</i> 2005
silicio	{ 3 nm 0,1 $\mu\text{m}$ 3 $\mu\text{m}$ }	—	s.d.	macrófagos	{ 24 h 48 h }	Tanto NP (>20 $\mu\text{g/ml}$ ) como MP (>200 $\mu\text{g/ml}$ ) inducen citotoxicidad. Las MP aumentan TNF- $\alpha$ y IL-6.	Choi <i>et al.</i> 2009
silicio poroso	{ 270 nm 2,5 $\mu\text{m}$ }	—	s.d.	células dendríticas	{ 24 h 48 h }	Citotoxicidad NP < MP y dosis dependiente.	Vallhov <i>et al.</i> 2007
silicio poroso	265 nm / 1 $\mu\text{m}$ (5,4 nm poro)	— citocromo C	-25,5 (-)	HeLa	18 h 24 h	En NP, a mayor tamaño menor interiorización.	Slowing <i>et al.</i> 2007
—	1 $\mu\text{m}$ (huecas)	PSS:PAH PSS:PAH + PLL PSS:PAH + PGA PSS:PAH + DNA PSS:PAH + PMASH	s.d. s.d. s.d. s.d. s.d.	macrófagos células dendríticas	1 h	Buena respuesta fagocítica en todos los casos analizados.	de Rose <i>et al.</i> 2008
—	4 - 6 $\mu\text{m}$ (huecas)	PSS:PAH + sonda pH	s.d.	células epiteliales fibroblastos mieloblastos	{ 5min 24 h }	Mediante fluorescencia es posible distinguir entre MP interiorizadas y localizadas fuera de la célula.	Semmling <i>et al.</i> 2008
—	5 $\mu\text{m}$ (huecas)	PSS:PAH PSS:PAH:PSS	(+) (-)	células epiteliales (MCF-10A / MDA-MB-435S)	{ 1 h 48 h }	MP* mayor interiorización: mejor adhesión a la membrana plasmática.	Muñoz-Javier <i>et al.</i> 2006

11-MUA = ácido 11-mercaptoundecanoico;  $\alpha$ 2GP = glicoproteína sérica humana  $\alpha$ 2; AP = 3-aminopropil; APC = células presentadoras de antígenos; APOH = hidroxipatita; br-OT = 3,7 dimetiloctano-1-tiol; DPPC = 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina; FAP = (3-aminopropil)-N-folato; FITC = isotiocianato de fluoresceína; GEGP = 3-[N-(2-guanidinoetil)guanidino]propil; GP = guanidinopropil; IL-6 = interleucina 6; LPS = lipopolisacárido; MP / MP\* = micropartículas con carga aniónica / catiónica; MUS = 11-mercapto-1-undecansulfonato; NP / NP\* = nanopartículas con carga aniónica / catiónica; OT = octanetiol; PA = poli-D-l-alanina; PAH = poli(hidrocloruro de allamaina); PEI = polietilenoimina; PGA = ácido poli-L-glutámico; PLGA = ácido poli (D,L láctico co-glicólico); PLL = poli-L-lisina; PLL-g-PEG = poli(L-lysina)-g-poli(etilenglicol); PMASH = ácido polimetacrílico; PrS = protaminsulfato; PS = poliestireno; PSS = polistirensulfonato de sodio; RGD = péptido con la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp); ROS = especies reactivas del oxígeno; s.d. sin datos; TNF- $\alpha$  = factor alfa de necrosis tumoral; TT = toxina tetánica; WGA = aglutinina de germen de trigo.

Se ha sugerido que la vía y la tasa de interiorización de las partículas dependen del tipo celular de estudio. Los macrófagos, por ejemplo, presentan una tasa de fagocitosis tres veces mayor que las células dendríticas con partículas de poliestireno de 1  $\mu\text{m}$  (Thiele *et al.* 2003b). Estas diferencias se deben probablemente a que mientras que los macrófagos eliminan cuerpos extraños y sustancias de deshecho para mantener limpio el organismo, las células dendríticas se ocupan de acumular antígenos para que sea posible iniciar la respuesta inmunitaria (Kiama *et al.* 2001).



#### 1.2.4.2 Citotoxicidad de Micro y Nanopartículas

Dependiendo del material, el tamaño, la carga y la composición de la superficie, la interiorización de las partículas en células es más o menos eficaz, de manera que el efecto tóxico que causan en los cultivos también varía dependiendo de estos parámetros.

En términos generales, las nanopartículas se consideran potencialmente más tóxicas que partículas de mayor tamaño del mismo material. Su relación superficie/tamaño es muy alta de forma que, para una cantidad de material determinado, la superficie total expuesta que puede interactuar con las células es mucho mayor. Las partículas pueden interactuar con las células y causar toxicidad mediante mecanismos que dependen de la forma y porosidad de las partículas, la composición química del material y su estructura electrónica, el recubrimiento de su superficie (reactivo ó no) y la solubilidad de las partículas en el medio. Las especies químicas de su superficie son un parámetro determinante y contribuyen claramente en la citotoxicidad, pues interactúan con el ambiente celular y pueden variar dependiendo de los cambios en factores ambientales como el pH ó la incidencia de luz UV (revisado por Nel *et al.* 2006) (Figura 8).

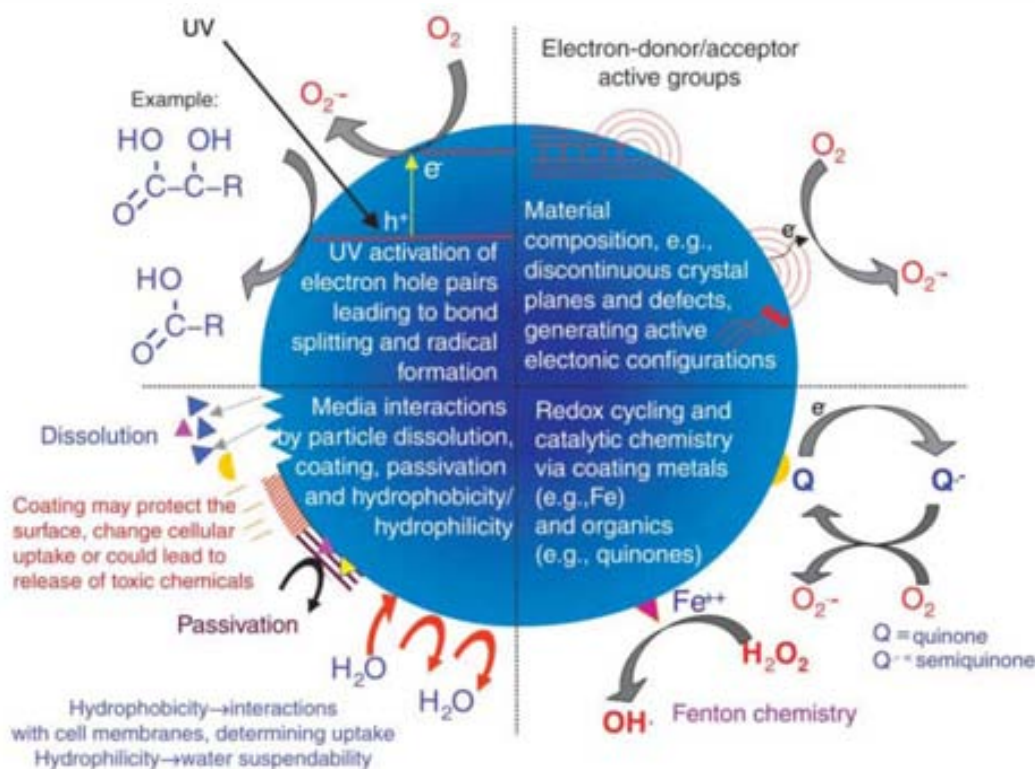


Figura 8. Mecanismos de interacción de micro y nanopartículas con moléculas y células.

La interacción de las partículas depende de la composición del material, la estructura electrónica, los recubrimientos de su superficie (activos ó pasivos) y su solubilidad (Nel *et al.* 2006).



En macrófagos, las nanopartículas tienen un efecto tóxico mayor que las micropartículas fabricadas en el mismo material, aunque estas últimas incrementan la producción de citocinas que activan la respuesta inflamatoria (Choi *et al.* 2009). Sin embargo, Vallhov y colaboradores (2007) detectaron que, en células dendríticas, partículas de silicio poroso de tamaño micrométrico presentaban mayor citotoxicidad que las mismas partículas de tamaño nanométrico. La intensidad de la respuesta inmunitaria y la tasa de interiorización de micropartículas en las células dendríticas también eran más intensas que en macrófagos, en los cuales la viabilidad se veía menos afectada en presencia de micropartículas.

Estos resultados tan diversos podrían deberse a que los estudios se han realizado con partículas de materiales distintos, pero también a las enormes diferencias en la respuesta celular dependiendo de pequeñas variaciones en el tamaño de las nanopartículas. Por ejemplo, Pan y colaboradores (2007) observaron que en fibroblastos, macrófagos, células epiteliales y de melanoma, mientras que partículas de oro de 1,2 nm de diámetro provocan la muerte celular por apoptosis, las de 1,4 nm lo hacen por necrosis y al cabo de aproximadamente 12 h. Además, la citotoxicidad de estas nanopartículas es entre 60-100 veces mayor que la provocada por partículas de 15 nm del mismo material, y su toxicidad aumenta cuando su superficie está cargada positivamente (Goodman *et al.* 2004). Así pues, lo más probable es que la señalización y las vías de interiorización de micro y nanopartículas sean distintas. Se ha propuesto que las diferencias de citotoxicidad podrían deberse a que las micropartículas al ser endocitadas quedan aisladas en vesículas, mientras que las nanopartículas quedan libres en el citoplasma y pueden interaccionar directamente con las moléculas que se encuentran en él (Pan *et al.* 2007).

Otro parámetro que puede afectar a la viabilidad celular es la estructura electrónica de las moléculas que se encuentran en la superficie de las partículas, que afecta directamente a su reactividad. Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la carga de las partículas en su superficie (el potencial  $\zeta$ ) influye en su vía de interiorización en las células. Se conoce, por ejemplo, que las moléculas o partículas nanométricas con carga catiónica pueden difundir a través de la membrana celular para pasar al citoplasma. Esto parece estar relacionado con su capacidad de formar ROS y su mayor efecto citotóxico (Verma *et al.* 2008).

Para que estos resultados fueran concluyentes sería necesario poder comparar cada tipo celular analizado con los diferentes materiales y tamaños de partículas, pero tan solo existen algunos estudios al respecto. En macrófagos, se ha descrito que las partículas de poliestireno de 1, 6 y 20  $\mu\text{m}$  no son citotóxicas después de 2 h en contacto con las células (Kang *et al.* 2005a), ni después de 4 h cuando están

carboxiladas (por lo menos las partículas de 1  $\mu\text{m}$ ) (Thiele *et al.* 2003a). Tampoco se ha detectado toxicidad después de 6 h con partículas de PLGA de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  en el mismo tipo celular (Faraasen *et al.* 2003). No obstante, como se ha comentado en el párrafo anterior, después de 24 h con partículas de oro de entre 0,8 y 15 nm, el efecto citotóxico es visible y la toxicidad se relaciona con el tamaño y no con el material (Pan *et al.* 2007), aunque no se conoce el efecto causado por partículas de oro micrométricas.

En células dendríticas no se ha detectado ningún efecto citotóxico después de incubarlo durante 6 h con partículas de PLGA de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  (Faraasen *et al.* 2003), o 24 h con partículas de poliestireno de entre 40 nm y 15  $\mu\text{m}$  (Foged *et al.* 2005). Después de 48 h con partículas de silicio poroso de entre 270 nm y 2,5  $\mu\text{m}$  también se detectan niveles muy bajos de citotoxicidad, aunque los autores intuyen que ésta depende directamente del tamaño y la concentración de partículas (Vallhov *et al.* 2007).

La concentración de partículas analizado en cada estudio es tan diverso como los tamaños testados, lo cual dificulta aún más un análisis global. De todas formas, a partir de estos estudios queda claro que algunos materiales son biocompatibles en tamaños adecuados para la fabricación de microdispositivos intracelulares. Para que en el futuro sea posible utilizar algunos de ellos con este fin, deben ser a la vez compatibles con las tecnologías de fabricación de microelectrónica.

#### 1.2.4.3 Aplicaciones de Micro y Nanopartículas

A pesar de que no se tiene un conocimiento profundo sobre el efecto a la exposición de partículas en células u organismos y su metabolización, micro y nanopartículas se están empezando a utilizar en estudios clínicos y celulares. Todavía no se conoce bien su toxicidad, son poco funcionales y sus aplicaciones son limitadas (Murthy 2007), pero su presencia en estas áreas de estudio es cada vez mayor. Uno de los materiales más estudiados es el óxido de titanio,  $\text{TiO}_2$ , que se comercializa en forma de micropartículas (como pigmento blanco en pinturas) y de nanopartículas (en cremas solares, actúa a modo de pantalla y refleja la luz visible y UV). Con este material se han realizado multitud de estudios de citotoxicidad (revisado por Johnston *et al.* 2009), pero todavía hoy en día no queda claro qué riesgo comporta para la salud su utilización en la industria.

En el ámbito clínico, la nanomedicina pretende mejorar el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, así como preservar y mejorar la salud y calidad de vida.

En estos momentos se focaliza en mejorar el diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, desarrollar nuevos sistemas más efectivos de suministro y dosificación de fármacos y desarrollar tecnologías para la ingeniería tisular y la medicina regenerativa (Samitier 2009). En diagnóstico clínico, por ejemplo, se está trabajando en el desarrollo de nanopartículas magnéticas como contrastantes para la resonancia magnética nuclear (Wagner *et al.* 2004; Silva 2006). También se están desarrollando sistemas con partículas para modular la liberación de fármacos *in vitro* e *in vivo* (revisado por Ferrari 2005), por ejemplo nanopartículas adheridas a bacterias, que se liberan cuando estas últimas entran en contacto con células en cultivo (Akin *et al.* 2007).

En cultivos, prácticamente todos los trabajos con micro y nanopartículas están dirigidos a analizar su citotoxicidad. Se han utilizado nanopartículas magnéticas con el fin de orientar la división celular al aplicarles un campo magnético (Wilhelm y Gazeau 2008). No obstante, es obvio que este campo está aún en desarrollo.

#### 1.2.5 MINIATURIZACIÓN DE LOS BIOMEMS PARA EL ESTUDIO DESDE EL INTERIOR CELULAR

Micropartículas y nanopartículas se fabrican mayoritariamente mediante síntesis química. Modificando parámetros como la temperatura o la concentración de solvente y surfactante es posible tener cierto control en lo relativo al tamaño y la morfología de las partículas. Este método permite obtener una gran cantidad de partículas pero, sin embargo, conlleva de forma inherente una serie de limitaciones como la dificultad de obtener partículas con formas complejas o compuestas por varios materiales cada uno con una forma específica. En este punto es donde la fabricación de micro y nanopartículas mediante procesos fotolitográficos y técnicas de microelectrónica, como las que se aplican para la fabricación de MEMS, presenta una ventaja competitiva. En este caso, las tecnologías de microsistemas permiten definir con exactitud las tres dimensiones de las partículas, darles formas complejas, así como combinarlas con otros materiales con geometrías controladas. Por lo tanto, la fabricación basada en estas tecnologías abre la posibilidad a la futura fabricación de sofisticados sensores intracelulares.

MEMS y BioMEMS ofrecen un método de estudio para los organismos vivos en la misma escala de tamaño que las micro y nanopartículas, con sus mismas ventajas, pero con un potencial mucho mayor como sensores o actuadores a nivel celular. Para poder ser introducidos en células vivas, los BioMEMS deben cumplir dos requisitos: ser suficientemente pequeños para poder introducirse en el interior celular y ser biocompatibles.

El desarrollo de BioMEMS miniaturizados hasta alcanzar tamaños de unas pocas micras significaría un progreso importante en el estudio celular. Pero aunque estas herramientas todavía no están disponibles, la tecnología necesaria para producirlos sí lo está. Tal y como predijo la ley de Moore, las tecnologías de semiconductores como el silicio han evolucionado hasta obtener dispositivos de tamaño por debajo de la micra (Moore 1995), y en la actualidad, con más de 40 años de experiencia, se fabrican componentes de menos de 50 nm. También es posible producir en masa y a bajo coste estructuras complejas de dimensiones micro o submicrométricas con gran adaptabilidad y precisión (Voldman *et al.* 2003).

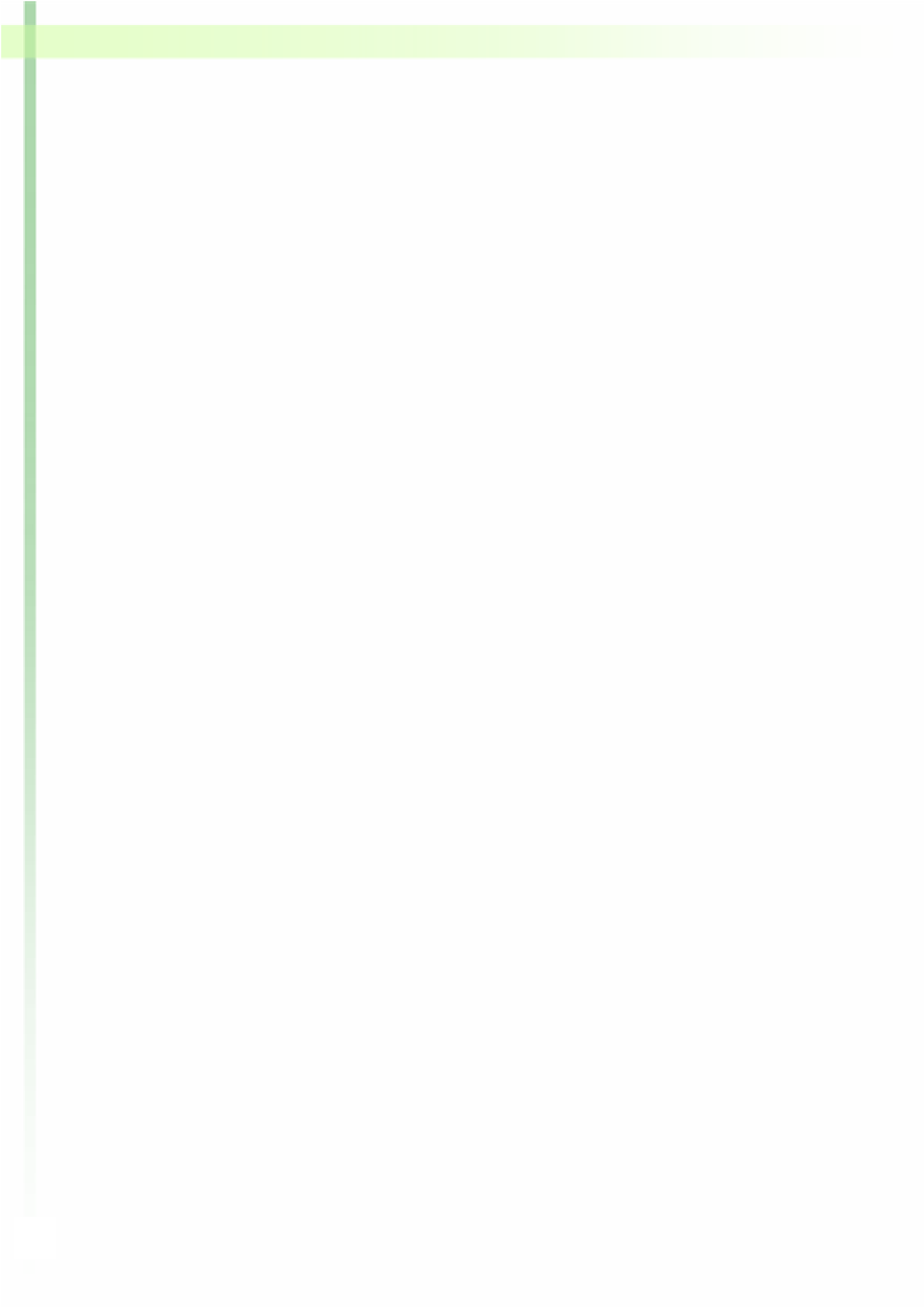
Recientemente, Tasciotti y colaboradores (2008), utilizaron micropartículas de silicio poroso, fabricadas utilizando procesos fotolitográficos, con nanopartículas asociadas a moléculas (*quantum dots* y nanotubos de pared simple unidos a PEG e isotiocianato de fluoresceína) que se liberaban en contacto con la membrana plasmática de células en cultivo. Aún no se ha descrito ningún sistema capaz de analizar y caracterizar células u organismos vivos sin causarles daño alguno, pero estos BioMEMS biocompatibles y biodegradables podrían ser utilizados en el futuro para la liberación controlada de fármacos, y son un claro ejemplo de que las tecnologías de microsistemas pueden ser una herramienta clave para ello.

La convergencia de la microelectrónica con áreas de estudio tan diversas como las ciencias de materiales, óptica, química molecular o biología ofrece un gran potencial para el desarrollo de microherramientas intracelulares para el estudio de células vivas. Estos BioMEMS podrían ser de gran utilidad en diagnóstico clínico, toxicología, inmunología, genética, biología celular y molecular, y estudios en célula única. En este sentido, Ferrari y colaboradores (Ferrati *et al.* 2010; Serda *et al.* 2010) están trabajando en el desarrollo de micropartículas de silicio mesoporoso capaces de alojar y proteger vectores como nanopartículas que puedan ser dirigidas específicamente en el interior celular con finalidades terapéuticas.

El diseño y fabricación de sistemas intracelulares (sensores y/o actuadores) permitiría analizar o modificar *in situ* los parámetros celulares a tiempo real durante el periodo de tiempo deseado, manipular a micro y nanoescala, y realizar estudios multidisciplinarios más complejos en células vivas individuales (Gefen y Balaban 2008). El logro de estos objetivos proporcionaría información más precisa que ayudaría a comprender mejor el funcionamiento celular y su interacción con el medio.



## 2. OBJETIVOS



El estudio que se presenta a continuación se enmarca dentro de los proyectos MINAHE II (TEC2005-07996-C02) y MINAHE III (TEC2008-06883-C03), los cuales tienen como objetivo principal la fabricación y caracterización de micro y nanoherramientas para el estudio de células vivas. Concretamente, el objetivo final de dichos proyectos es diseñar y fabricar dispositivos (BioMEMS) que permitan el estudio individualizado de células vivas desde su interior o su exterior.

Estos dispositivos, en el futuro, deberán ser capaces de llevar a cabo diversas funciones, detectar parámetros celulares y actuar en consecuencia. La modificación de la superficie de estos dispositivos con moléculas específicas haría posible dirigirlos hacia estructuras celulares concretas (membrana plasmática, núcleo, etc) pero también usarlos para la detección de moléculas específicas presentes en las células (por ejemplo la activación de caspasas, el incremento de ROS o las variaciones de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

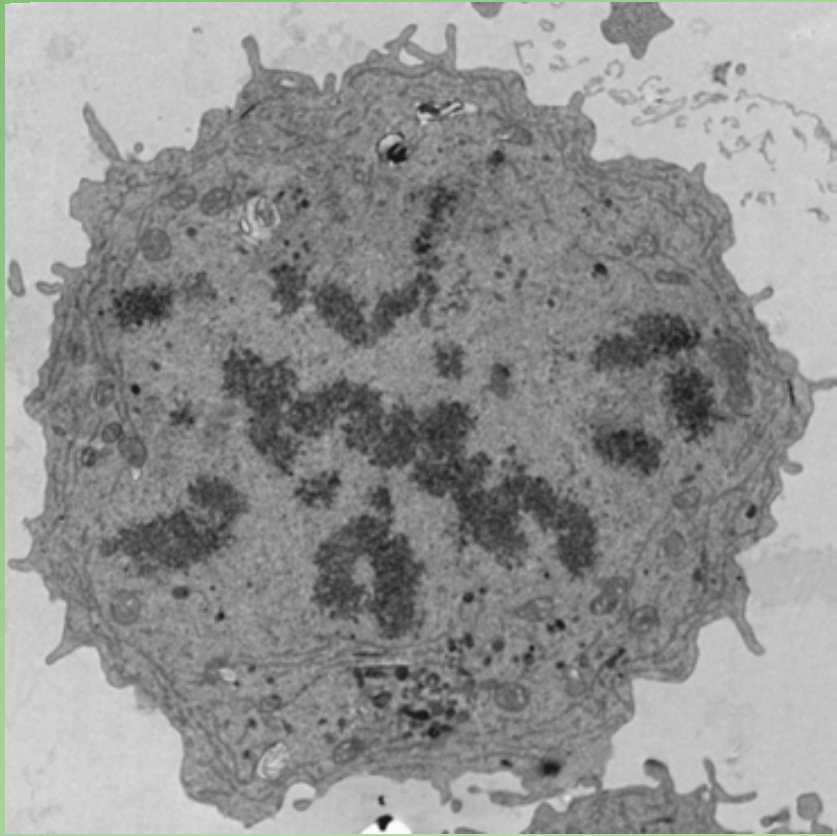
El presente trabajo corresponde a la fase inicial del proyecto, y pretende sentar las bases para el desarrollo de BioMEMS que puedan ser interiorizados en células para aplicaciones en célula única viva. Basándonos en este objetivo principal, era necesario seleccionar un material biocompatible apropiado para la fabricación de los MEMS, optimizar un sistema de modificación química con biomoléculas para su funcionalización, y determinar un sistema de interiorización para que los BioMEMS fabricados puedan ser introducidos en el citoplasma celular.

Además, como primera aproximación para demostrar la utilidad de estos dispositivos en estudios de célula única viva, nos propusimos diseñar un sistema de etiquetaje individual de células en cultivo utilizando las micropartículas fabricadas.

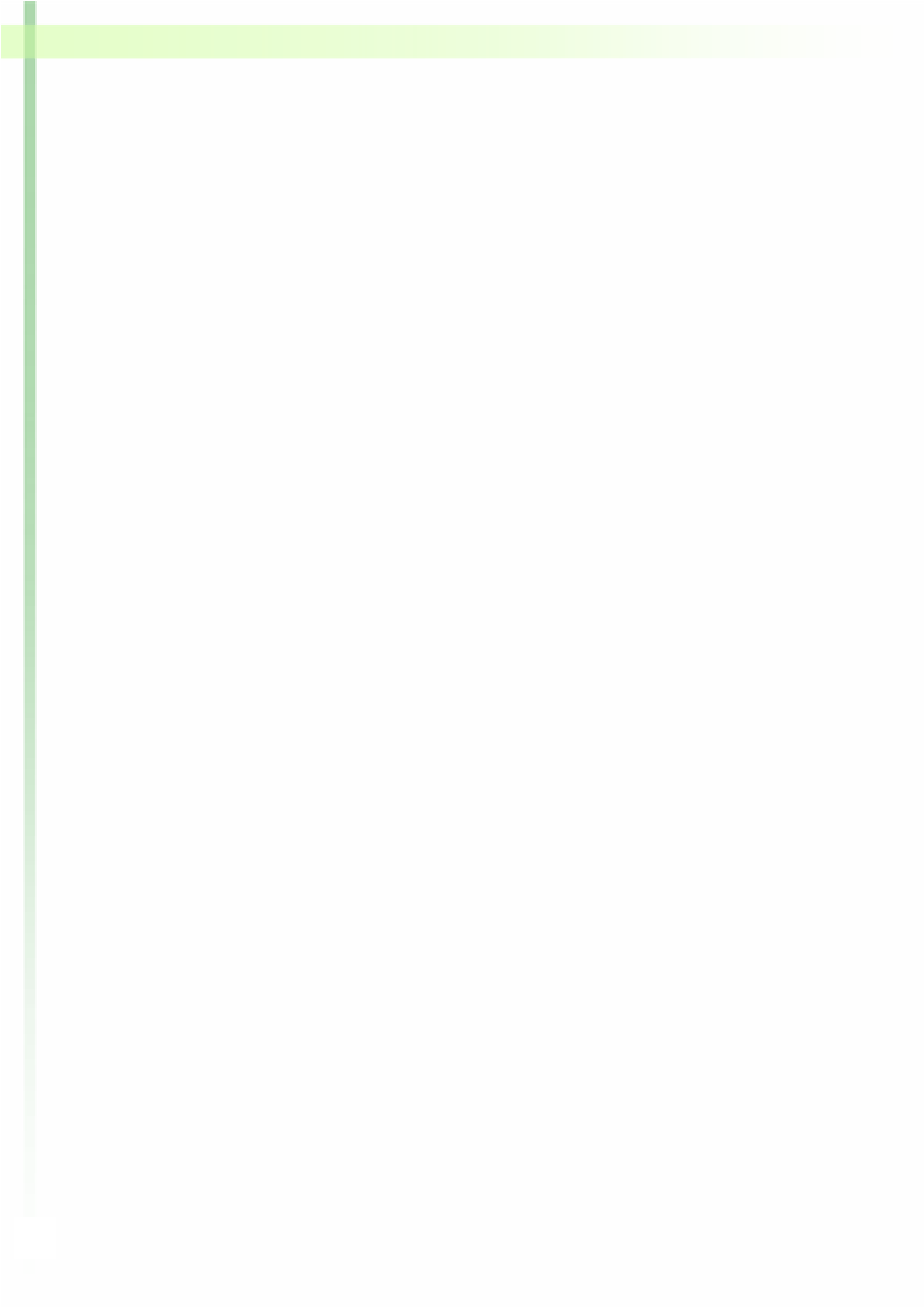
Teniendo en cuenta lo expuesto, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Diseñar micropartículas de silicio y polisilicio fabricados mediante técnicas microelectrónicas basadas en procesos fotolitográficos, adecuadas para aplicaciones en biología celular.
2. Valorar la capacidad de interiorizar micropartículas de silicio y polisilicio en células vivas en cultivo con capacidad fagocítica (macrófagos), y determinar su destino intracelular.
3. Analizar la citotoxicidad que puedan causar las micropartículas al ser fagocitadas por macrófagos o bien microinyectadas en embriones de ratón en estadio de pronúcleos.
4. Desarrollar un sistema de etiquetaje con micropartículas codificadas para el seguimiento individual de células con y sin capacidad fagocítica.
5. Modificar la superficie de micropartículas y códigos utilizando distintas técnicas y grupos funcionales, y seleccionar la técnica más adecuada para dirigir las micropartículas de forma controlada a una estructura celular de interés.





### 3. MATERIAL y MÉTODOS



### 3.1. MICROPARTÍCULAS

#### 3.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MICROPARTÍCULAS

Se diseñaron y fabricaron tres tipos de micropartículas utilizando dos materiales distintos: silicio y polisilicio. Los dos primeros tipos de micropartículas tienen forma cilíndrica, de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro x 1,5  $\mu\text{m}$  (10,60  $\mu\text{m}^3$ ; silicio) o 0,5  $\mu\text{m}$  (3,53  $\mu\text{m}^3$ ; polisilicio) de espesor, con dos caras planas para la futura implementación de un sensor o actuador. De ahora en adelante las llamaremos "Si-MP" ó "pSi-MP" según si se fabricaron en silicio o polisilicio respectivamente. El tercer tipo de micropartículas, diseñado para la codificación de células vivas individuales, se fabricó en polisilicio. Sus dimensiones se fijaron en 10  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$  de lado y 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor, con un volumen máximo de 30  $\mu\text{m}^3$ . Se definieron con 8 regiones pentagonales (bits), de 1  $\mu\text{m}$  de lado como mínimo, que pueden combinarse para definir 256 códigos distintos. De ahora en adelante nos referiremos a ellas como "códigos".

Como control para los estudios de interiorización y citotoxicidad se eligieron esferas comerciales de poliestireno, fluorescentes en el espectro del amarillo-verde, de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro (14,14  $\mu\text{m}^3$ ) (17155-2, Polysciences Inc.). Se seleccionaron porque se ha demostrado que son fagocitadas por macrófagos, y no son citotóxicas (Thiele *et al.* 2003). Se eligió este tamaño por ser lo más similar posible al de las Si-MP y pSi-MP. Las llamaremos "PS-MP".

La figura 9 resume las características de las distintas micropartículas que se han utilizado.

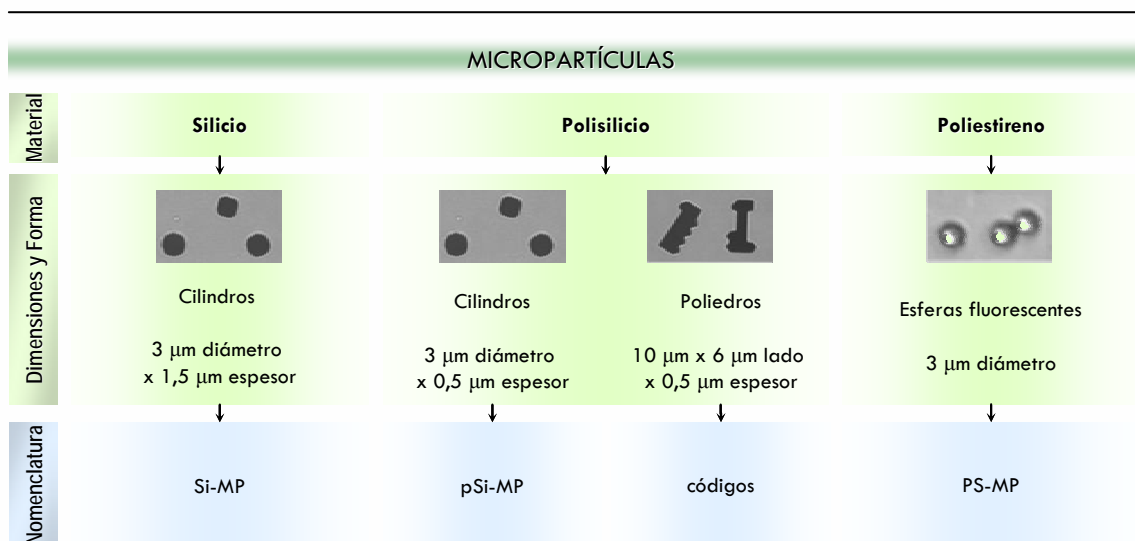


Figura 9. Características de las micropartículas utilizadas en este trabajo.

### 3.1.2 FABRICACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS

Las micropartículas de silicio y polisilicio se fabricaron a partir de obleas de silicio utilizando técnicas de microsistemas (Figura 10A). En el caso de partículas de polisilicio, después de depositar una capa sacrificial de óxido de silicio (Figura 10B), se depositó una capa de polisilicio (Figura 10C); el grosor de esta capa, de precisión nanométrica, definió las dimensiones verticales de la micropartícula (0,5  $\mu\text{m}$ ). Para fabricar las partículas de silicio se partió de una oblea SOI (*Silicon On Insulator*) compuesta por una capa de 1,5  $\mu\text{m}$  de silicio sobre una capa enterrada de óxido de silicio. Las dimensiones laterales se definieron con precisión por debajo de la micra mediante un proceso fotolitográfico. Para ello se depositó una capa de fotoresina (Figura 10D) que fue expuesta a luz UV a través de una máscara en la cual estaban definidas las geometrías de las estructuras (Figura 10E). Tras revelar la resina (Figura 10F), es decir, eliminar las zonas expuestas, el polisilicio se atacó mediante grabado seco (Figura 10G). En este momento del proceso, las partículas estaban definidas pero físicamente unidas a la oblea. Finalmente se eliminó la fotoresina restante (Figura 10H), y se liberaron las estructuras mediante un ataque sacrificial del óxido enterrado. Para su posterior manipulación, se recogieron en etanol absoluto y fueron resuspendidas mediante ultrasonidos.

Ésta metodología permite la obtención de más de  $150 \times 10^6$  micropartículas tipo cilindro y más de  $45 \times 10^6$  tipo código por cada oblea de 4 pulgadas procesada, con forma y dimensiones controladas.

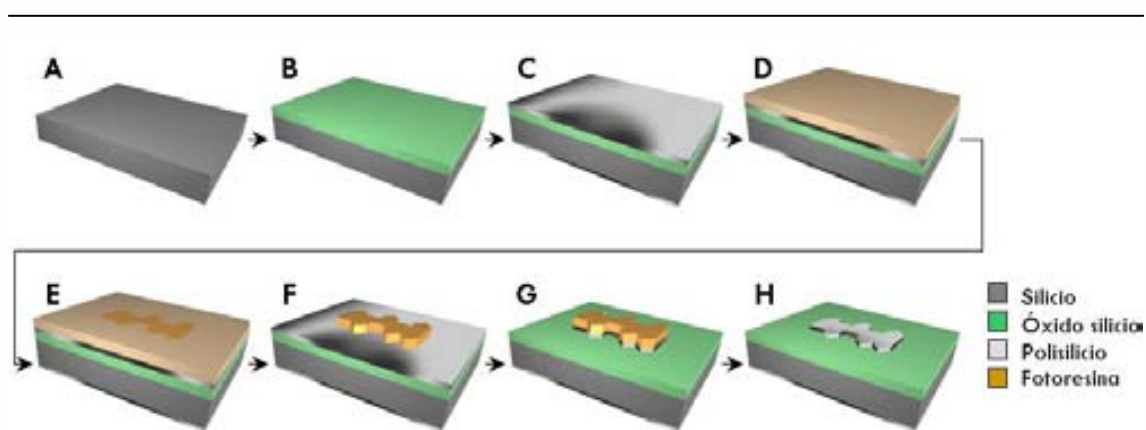


Figura 10. Fabricación de códigos de polisilicio mediante tecnología de microsistemas.

Oblea de silicio como sustrato (A). Deposición de una capa de óxido de silicio como capa sacrificial (B) y una capa de polisilicio como capa estructural (C). Proceso fotolitográfico para definir las dimensiones laterales de los códigos: depósito de fotoresina (D) y exposición a luz UV (E). Revelado de la fotoresina (F). Grabado en seco DRIE del polisilicio (G). Eliminación de la fotoresina restante (H) y ataque de la capa sacrificial con vapores de HF para liberar los códigos (No mostrado en la figura).

### 3.1.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LAS MICROPARTÍCULAS DE POLISILICIO

Para la codificación de células sin capacidad fagocítica fue necesaria la modificación química de la superficie de las micropartículas con grupos funcionales (funcionalización) que permitieran su adhesión selectiva a la membrana plasmática de las células. La funcionalización se realizó tanto en pSi-MP como en códigos para valorar si ésta se veía afectada en función del tamaño y la forma de las micropartículas. Se evaluaron dos metodologías de modificación de superficie distintas: adhesión de la molécula por adsorción, y modificación a través de enlaces covalentes utilizando como molécula puente un silano.

La superficie de las micropartículas de polisilicio fue funcionalizada con dos tipos de proteínas. En primer lugar se seleccionó una inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 488 (IgG<sup>488</sup>; A11017, Molecular Probes), de emisión en espectro del verde al excitarla con luz de una longitud de onda alrededor de los 488 nm. En segundo lugar se eligió una lectina, la aglutinina de germen de trigo (*Wheat Germ Agglutinin*, WGA) conjugada con Texas Red<sup>®</sup>-X (WGA<sup>561</sup>; W21405, Invitrogen), que emite en el espectro del rojo al excitarla con luz alrededor de los 561 nm. Para que ambos protocolos fueran comparables, en todos los casos se utilizaron 200 µg/ml de proteína (IgG<sup>488</sup> ó WGA<sup>561</sup>) para modificar una superficie total de  $45 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$  (525.000 códigos ó 1.750.000 pSi-MP).

En la figura 11 se puede ver un esquema de los dos procesos de funcionalización de superficies realizados, que se describen a continuación.

#### 3.1.3.1 Adsorción

La modificación de las micropartículas por adsorción se hizo en base a la patente de Gustafson y colaboradores (1989).

En primer lugar se eliminó el etanol y se dejó secar las micropartículas 1 h a 65°C para facilitar la creación de una capa de óxido nativo en la superficie de las micropartículas en contacto con el aire. A continuación, las micropartículas se resuspendieron en tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) con un 0,1% de azida sódica y, para evitar agregaciones, se disgregaron mediante ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo, se añadió la proteína de interés (IgG<sup>488</sup> ó WGA<sup>561</sup>), que se incubó durante toda la noche (*overnight*) a TA y en agitación en el mismo tampón. Al día siguiente, las

partículas se lavaron por triplicado centrifugando a 14.000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C en PBS con un 2,5% de sacarosa, 0,25% de albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA), y 0,05% de azida sódica. Finalmente, las micropartículas se resuspendieron en PBS y se guardaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

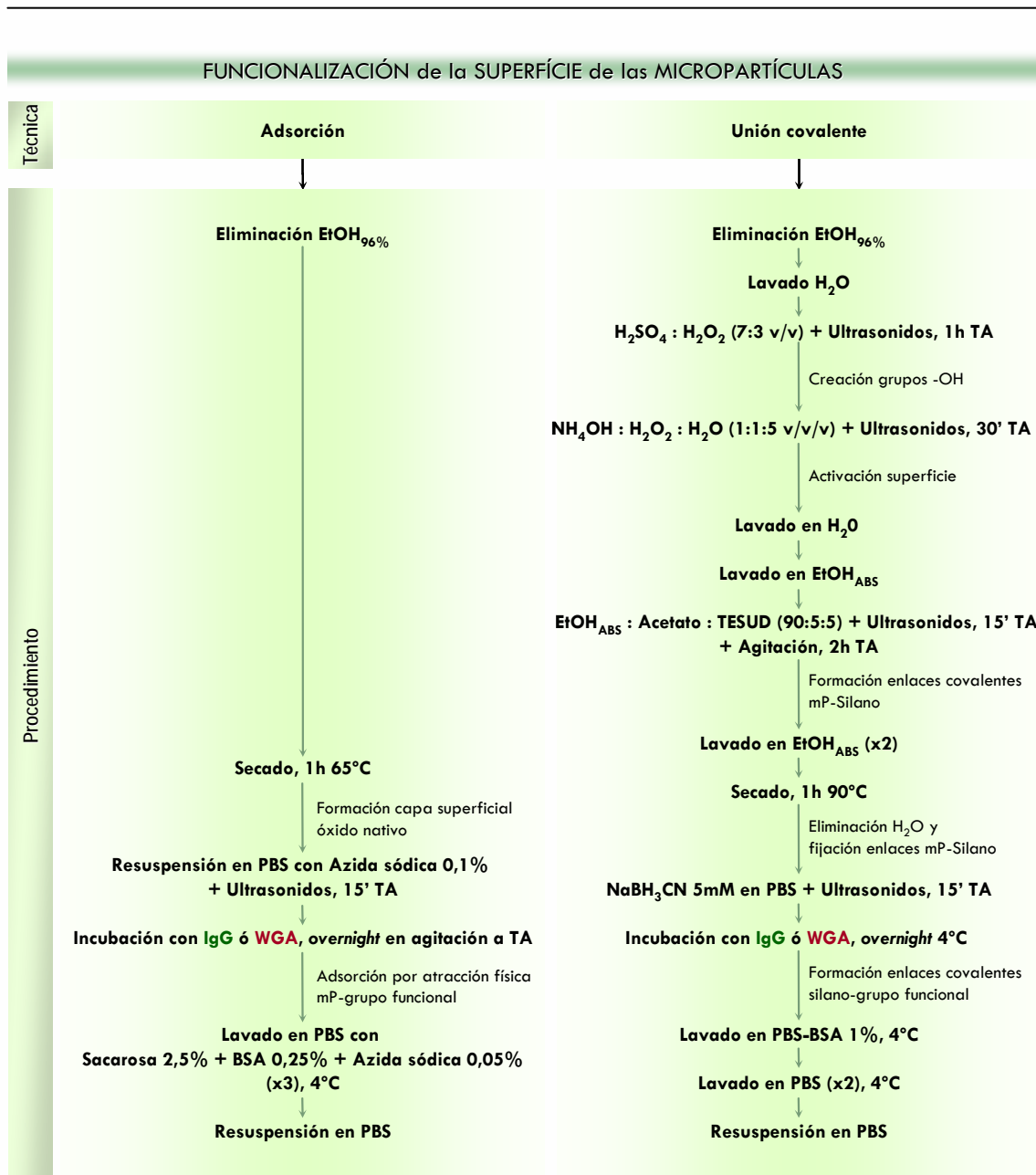


Figura 11. Esquema de los protocolos de adsorción y unión covalente empleados para modificar la superficie de las pSi-MP y los códigos.

### 3.1.3.2 Unión covalente

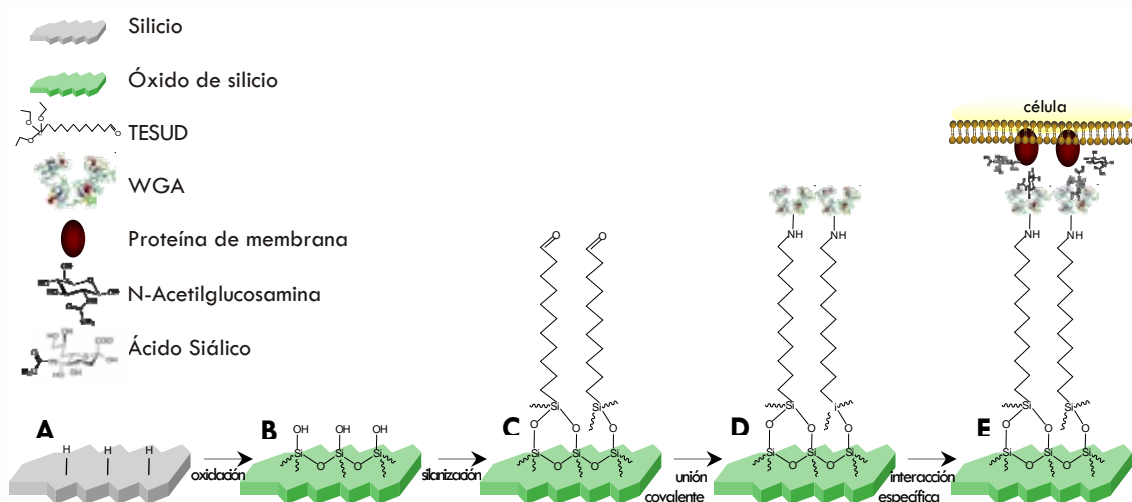
Después de eliminar el etanol, las micropartículas se lavaron en agua desionizada y se incubaron en una solución ácida con un 70% de ácido sulfúrico y un 30% peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en volumen (v/v), para oxidar la superficie y crear grupos hidroxilo (-OH) unidos al silicio (grupos silanol, -Si-OH). Para evitar agregaciones y obtener una oxidación uniforme, la incubación se realizó en sonicación continuada durante 1 h a TA. A continuación, se eliminó la solución de oxidación y los grupos hidroxilo se activaron en una solución básica de agua desionizada con hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ) y peróxido de hidrógeno en proporción 5:1:1 (v/v/v), en sonicación constante durante 30 min.

Después de un lavado con agua desionizada y otro con etanol absoluto, las micropartículas se sumergieron en etanol absoluto con un 5% de tampón acetato ( $CH_3COOH$ ) y 5% del silano trietoxisilil undecanal (TESUD, SIT8194.0, Gelest); se sonicaron de nuevo durante 15 min para disgregarlas totalmente, y se incubaron durante 2 h en agitación a 2.000 rpm para permitir una silanización lo más uniforme posible (Kang *et al.* 2008; Shirahata *et al.* 2008). El proceso de silanización tiene lugar en dos pasos: a) los grupos etoxi (-O- $CH_2$ - $CH_3$ ) del TESUD se hidrolizan para dar grupos silanol y b) los grupos silanol generados reaccionan con los grupos silanol de la superficie oxidada de la partícula en un proceso de condensación donde se forma un enlace covalente siloxano (-Si-O-Si-) y se libera una molécula de agua. Puesto que este enlace es reversible con el agua, tras dos lavados en etanol absoluto, las micropartículas se secaron a 90°C durante 1 h para eliminar completamente el agua de la superficie y fijar los enlaces siloxano.

Para disgregar de nuevo las micropartículas, se resuspendieron en una solución de PBS con cianoborohidruro sódico ( $NaBH_3CN$ ) 5 mM y se sonicaron durante 15 min a TA. A continuación se añadió la proteína (IgG<sup>488</sup> ó WGA<sup>561</sup>) y se dejó incubando *overnight* a TA en esta solución para permitir la unión covalente de la proteína al grupo aldehído (-COH) presente en el otro extremo de la molécula de silano. En estas condiciones, el grupo aldehído del TESUD reacciona con los grupos amino de la proteína para dar un enlace tipo imina (-C=N-) que, al reducirse con el cianoborohidruro sódico, forma una amina secundaria (-C=NH) mucho más estable. Finalmente, las micropartículas se lavaron a 4°C, primero en una solución de PBS con 1% de BSA y luego dos veces más en PBS, para eliminar la proteína sobrante. Se resuspendieron en PBS y se guardaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

Las micropartículas se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min en todos los lavados realizados en medio acuoso. En soluciones alcohólicas las micropartículas precipitan con mayor facilidad, y en estos casos la precipitación se realizó a 14.000 rpm durante 5 min.

El esquema de los procesos que implica la técnica de funcionalización química descrita se pueden observar en la Figura 12.



**Figura 12. Códigos de polisilicio modificados mediante unión covalente con WGA<sup>561</sup>.**

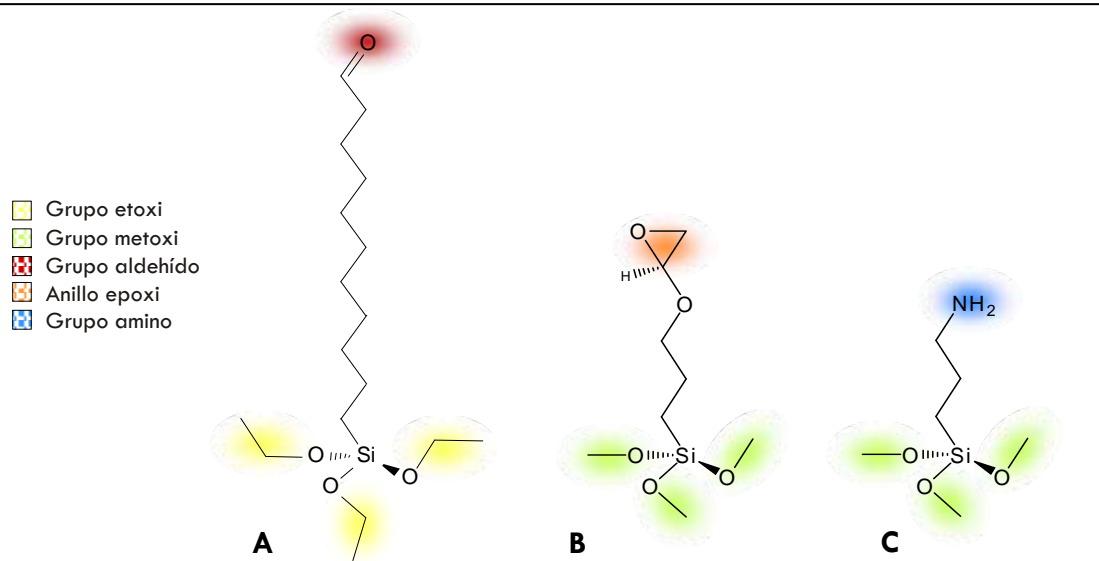
La superficie de polisilicio (**A**) se oxida en medio ácido para crear grupos silanol (-Si-OH) (**B**), que se hidrolizarán y reaccionarán con los grupos silanol del TESUD formando un enlace covalente (**C**). El grupo aldehído (-CHO) del otro extremo del silano forma a su vez enlace covalente con la proteína WGA (**D**), que reconoce específicamente oligosacáridos de proteínas de membrana (**E**).

### Selección del Silano

Aunque finalmente se seleccionó el TESUD como molécula puente para la funcionalización mediante unión covalente, durante la fase previa de selección del silano se probaron dos compuestos más: (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (GPTMOS; 440167, Aldrich) y (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTAMOS; 281778, Aldrich). La estructura química de todos ellos se muestra representada en la Figura 13.

La modificación covalente con GPTMOS se realizó de forma muy similar a la descrita para el TESUD. En este caso, para la incubación de las micropartículas en etanol con el 5% de silano, el etanol debía estar totalmente deshidratado. Fue necesario eliminar el agua con un agente secuestrante, la resina *molecular siever* de 4Å (2707, Mallinckrodt Baker), durante un mínimo de 24 h. El etanol anhidro evitó que el anillo funcional epoxi del GPTMOS, inestable en presencia de agua, se abriera e inactivara. Las partículas se disgregaron por sonicación durante 5 min antes de dejarlas incubando en esta solución en agitación constante *overnight*. Fue necesario añadir un segundo cambio en el procedimiento: la incubación de las micropartículas con la proteína se realizó en tampón carbonato 0,1 M (pH 8), para evitar que el GPTMOS, que reacciona rápidamente con las aminas primarias de los residuos de lisina que se encuentran en las proteínas, diese lugar a hidroxilaminas inestables.





**Figura 13. Estructura química y grupos reactivos de los silanos.**  
(A) TESUD, (B) GPTMOS y (C) APTMOS.

Para la funcionalización covalente con APTMOS se siguió el protocolo descrito para la modificación con TESUD, exceptuando la incubación con la proteína y los lavados previos. Después de la silanización las micropartículas se lavaron dos veces en etanol y se incubaron en una solución de tampón carbonato ( $\text{KHCO}_3$ ) 0,1 M (pH 8) con 2,5% de glutaraldehído ( $\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$ ) durante 1 h; este reactivo es imprescindible para que el silano pueda interactuar con la proteína. A continuación, las micropartículas se lavaron por triplicado en tampón carbonato, se dispersaron en ultrasonidos y se incubaron *overnight* a  $4^\circ\text{C}$  con la proteína en tampón carbonato con cianoborohidruro sódico 50 mM. Estas modificaciones del protocolo permiten que los grupos aldehído de ambos extremos del glutaraldehído reaccionen con las aminas primarias del APTMOS y de los residuos lisina de la proteína, formando dos grupos imino que el cianoborohidruro reduce selectivamente para formar aminas secundarias estables.

### Evaluación del Proceso de Silanización

Para corroborar que tanto el proceso de oxidación como la posterior silanización se hubieran realizado correctamente, se adaptó el protocolo descrito por Kang y colaboradores (2005). Se seleccionó un silano con un grupo amino-terminal (APTMOS), que se incubó con isotiocianato de rodamina B (83692, Fluka), un fluoróforo que emite en el espectro del rojo y reacciona fácilmente con las aminas primarias del silano a través del grupo isotiocianato. De este modo, el isotiocianato de rodamina B puede formar un enlace covalente con el APTMOS. Teniendo en cuenta el peso molecular y

el tamaño de la molécula, ésta no puede quedar unida al polisilicio de forma inespecífica. Este ensayo se realizó sobre superficies de polisilicio de 1 cm<sup>2</sup>.

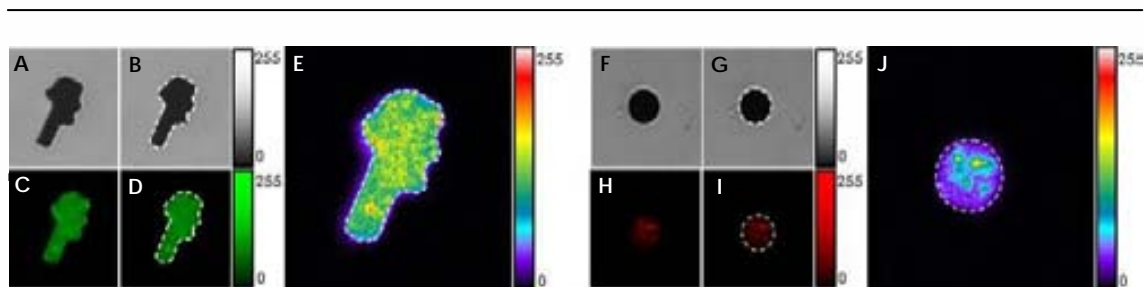
Después del tratamiento de activación de los grupos hidroxilo en una solución básica, las superficies de polisilicio se incubaron a TA en una solución con un 5% (v/v) de APTMOS y un 5% (v/v) de tampón acetato 0,1 M (pH = 5,2) en etanol. Después de 2 horas, las superficies se lavaron dos veces con etanol, se secaron durante 20 minutos a 120°C, y se incubaron *overnight* a TA con una solución 20 mM de isotiocianato de rodamina B en dimetilformamida, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NC(O)H. Esta molécula emite en la longitud de onda del rojo, con un máximo a 573 nm. Los substratos se lavaron con sonicación constante en dimetilformamida, cloroformo y etanol sucesivamente, y se secaron completamente. Las muestras control se prepararon exactamente igual pero sin APTMOS. Las muestras modificadas con silano y los controles negativos se observaron en el microscopio de fluorescencia para determinar la eficiencia de la silanización.

### 3.1.3.3 Valoración de la Eficiencia y la Estabilidad de la Funcionalización

Las micropartículas modificadas con IgG<sup>488</sup> ó WGA<sup>651</sup> se mantuvieron en medio de cultivo MEM (22561, Gibco) suplementado con FBS al 20% a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 5 min (tiempo "0"), 2, 4 y 8 días para valorar la eficiencia y la estabilidad de la funcionalización en condiciones estándar de cultivo celular.

Pasado el tiempo de incubación, la micropartículas se observaron en el CLSM (TCS SP2 AOBs) con un software LASAF Lite 1.8.1 (Leica). Previamente a la captura de las imágenes, las condiciones de los láseres de emisión en 488 nm (para las micropartículas modificadas con IgG<sup>488</sup>) y 561 nm (micropartículas modificadas con WGA<sup>561</sup>) se ajustaron y fijaron para poder observar la máxima gradación de intensidad lumínica sin obtener imágenes de fluorescencia saturadas. Para cada condición a analizar se capturaron al azar entre 27 y 37 imágenes de micropartículas en campo claro y fluorescencia de forma secuencial.

La cuantificación del grado de inmovilización de las proteínas en la superficie de las micropartículas y su estabilidad en función del tiempo se llevó a cabo analizando las imágenes captadas de cada una de las partículas con el programa Metamorph 5.1 (Molecular Devices). Para determinar la intensidad media de fluorescencia de cada micropartícula se tuvieron en cuenta todos los píxeles localizados en la región de la partícula, definida en base a la imagen de campo claro (Figura 14).



**Figura 14. Procedimiento de valoración de la eficiencia de inmovilización de grupos funcionales en la superficie de micropartículas de polisilicio.**

Códigos (A-E) y pSi-MP (F-J) funcionalizados con IgG<sup>488</sup> y WGA<sup>651</sup> respectivamente. A partir de las imágenes de campo claro (A-B, F-G) se definió el área de cada micropartícula (B, G) susceptible de emitir fluorescencia en el espectro del verde (C-D) o del rojo (H-I); se valoró la intensidad media de todos los píxeles contenidos en esta región (E, J).

La eficiencia de la funcionalización se calculó como el porcentaje de micropartículas a tiempo "0" con una intensidad de fluorescencia media superior al 5% (valor de 12,8 en unidades arbitrarias) del valor máximo (255). Tras descartar aquellas partículas con una intensidad de fluorescencia media inferior al 5% del valor máximo, considerando que estas partículas no se habían modificado, las intensidades medias de fluorescencia obtenidas para cada tiempo de cultivo, tipo de micropartícula y protocolo de funcionalización fueron analizadas estadísticamente utilizando el test de Mann-Whitney (dos colas).

### 3.2. TIPOS CELULARES Y ANÁLISIS REALIZADOS

En este trabajo se han utilizado tres tipos celulares distintos.

Para analizar la citotoxicidad de las micropartículas de silicio y polisilicio y determinar su destino intracelular, se utilizó una línea celular de monocitos humanos (THP-1) diferenciados a macrófagos, ya que su capacidad fagocítica innata permitía introducir las micropartículas en las células sin aplicar ningún tratamiento adicional al cultivo. Por el mismo motivo, esta línea celular también se utilizó para realizar el seguimiento de células individuales en cultivo etiquetadas con códigos de polisilicio.

Los estudios de citotoxicidad se ampliaron con el estudio de embriones de una cepa híbrida de ratón (B6CBAF1). Se eligió este tipo celular por su gran sensibilidad, puesto que cualquier alteración impide el desarrollo correcto y provoca el bloqueo de los embriones.

Por último, se escogió una línea celular de fibroblastos (Vero) para valorar el seguimiento en cultivo de células individuales sin capacidad fagocítica mediante códigos de polisilicio modificados químicamente con la lectina WGA, por su capacidad de unirse selectivamente a oligosacáridos de la membrana plasmática de cualquier tipo celular.

### 3.2.1 MONOCITOS / MACRÓFAGOS THP-1

Las células de la línea monocítica humana THP-1 (ECACC No.88081201) se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio de cultivo RPMI 1640 (21875-034, Gibco) suplementado con Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS; 10106-169, Gibco) al 20%.

Estas células se diferenciaron a macrófagos en presencia de 0,16 mM del éster de forbol "forbol 12-acetato 13-miristato" (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA, Sigma) durante 3 días. El PMA activa la enzima proteincinasa C (también conocida como PKC), y a su vez la diferenciación celular.

Los estudios realizados con micropartículas en esta línea celular se muestran resumidos en la figura 15.

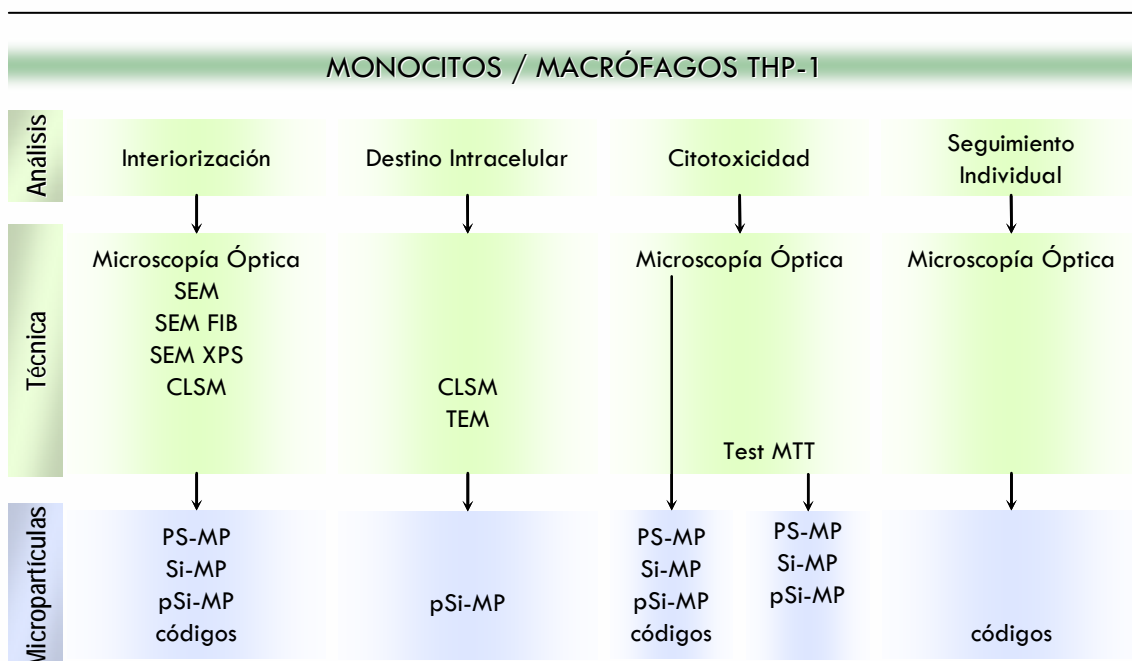


Figura 15. Análisis realizados utilizando la línea celular monocítica THP-1, técnicas y tipos de micropartículas empleadas en cada caso.

SEM = microscopio electrónico de barrido; SEM-FIB = SEM acoplado a un cañón de iones focalizado; SEM-XPS = SEM equipado con un espectrómetro de rayos-X de energía dispersiva; CLSM = microscopio láser confocal; TEM = microscopio electrónico de transmisión; MTT = bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

### 3.2.1.1 Análisis de la Interiorización Celular de las Micropartículas

El análisis de interiorización de las diferentes micropartículas por parte de los macrófagos se realizó utilizando diversas técnicas de microscopía y un cubreobjetos codificado para poder relocalizar las células en los diversos microscopios utilizados. Estos cubreobjetos reticulados de Pyrex® (#7740), codificados alfanuméricamente por un proceso fotolitográfico en áreas (A1 - I8) y subáreas (a01- a16), se fabricaron en el IMB-CNM (Figura 16).

La interiorización de las micropartículas mediante fagocitosis se valoró utilizando Si-MP, pSi-MP y PS-MP. En placas de 24 pocillos se dispuso en cada pocillo un cubreobjetos reticulado que fue esterilizado bajo luz ultravioleta durante 45 min. Se sembraron y pusieron a diferenciar 20.000 monocitos por pocillo. Pasadas 24 h de cultivo con 10.000 micropartículas por pocillo, los macrófagos que aparentemente habían interiorizado una micropartícula se localizaron en un microscopio óptico invertido.

Para confirmar que las micropartículas se encontraban dentro de las células, la membrana plasmática de los macrófagos se marcó con WGA<sup>561</sup> según las especificaciones del fabricante, y las células seleccionadas previamente al microscopio invertido se relocalizaron y observaron vivas en el CLSM. Se tomaron imágenes de estas células en diferentes planos y se realizaron reconstrucciones tridimensionales de las células seleccionadas. La membrana plasmática se visualizó utilizando el láser de emisión a 561 nm, mientras que las Si-MP y pSi-MP se detectaron por reflexión; para las PS-MP, de emisión en el espectro del verde, se utilizó el láser de emisión a 488 nm.

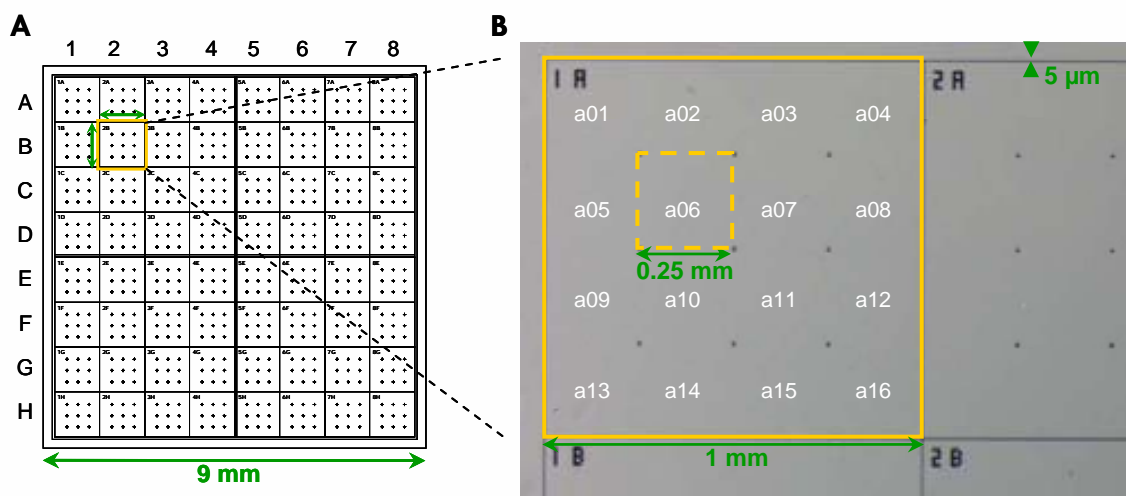


Figura 16. Cubreobjetos reticulado codificado.

A) Esquema. B) Detalle de una de sus áreas (1A) y todas las subáreas que contiene (a01-a16).

Para poder observar las mismas células en el microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM, Hitachi S-570), éstas se fijaron en solución Karnovsky (2% paraformaldehído y 2,5% glutaraldehído en cacodilato sódico 0,1 M ajustado a pH 7,4) a TA, se deshidrataron en una serie creciente de etanol (30, 50, 70, 90 y 100%), y se secaron por punto crítico utilizando CO<sub>2</sub> (K850 critical point drier, Emitech); finalmente se montaron en soportes de aluminio y se recubrieron con oro. El análisis en el SEM permitió distinguir claramente las micropartículas depositadas en la superficie de la célula o que estaban siendo interiorizadas, de aquellas que ya habían sido interiorizadas o se hallaban debajo de la célula, que aparecían como protrusiones.

Para determinar si dichas protrusiones que presentaban los macrófagos eran debidas a la ingestión de una micropartícula de silicio se utilizó un SEM (JSM-6300, JEOL) equipado con un espectrómetro de rayos-X de energía dispersiva (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) (Link ISIS-200, Oxford Instruments), que permitió realizar un estudio cualitativo de los componentes de la muestra. Puesto que la composición de los cubreobjetos reticulados era principalmente óxido de silicio, este análisis se realizó sobre cubreobjetos de plástico Thermanox® (L4350, Agar Scientific).

Para confirmar que las micropartículas estaban dentro y no debajo de los macrófagos, las células observadas en el microscopio óptico y el SEM se relocalizaron y seccionaron mediante el bombardeo focalizado con un haz de iones de galio utilizando una estación de trabajo combinada de FIB-SEM (*Focused Ion Beam-SEM*, Cañón de Iones Focalizado-SEM, Strata 235 Dual Beam FIB-SEM work station, FEI).

### 3.2.1.2 Estudio de la Localización Intracelular de las Micropartículas

Una vez comprobada la interiorización de las micropartículas en los macrófagos, el siguiente paso fue determinar su destino intracelular, es decir, si se encontraban atrapadas dentro de un endosoma o lisosoma o si habían sido liberadas en el citosol. Para ello se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (*Transmission Electron Microscope*, TEM, H7000, Hitachi) y el CLSM.

Para la observación en el TEM los macrófagos se mantuvieron en cultivo en contacto con pSi-MP durante 24 h. Las células se tripsinizaron y se fijaron en solución Karnovsky 0,1 M durante 2 h a 4°C, y se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1%. A continuación se deshidrataron gradualmente en acetona, y se incluyeron en resina Epon, que se dejó polimerizar durante 48 h a 60°C. Los cortes ultrafinos se montaron sobre rejillas de

cobre, se contrastaron en acetato de uranilo al 2% durante 30 min y con citrato de plomo (Reynolds 1963) entre 5 y 10 min más. Finalmente se observaron en el TEM.

Para el análisis en el CLSM se diferenciaron 20.000 macrófagos por pocillo sobre cubreobjetos de vidrio y se mantuvieron en cultivo durante 1, 3 y 6 h con 10.000 pSi-MP. Endosomas y lisosomas se marcaron utilizando dos procedimientos distintos.

El marcaje específico de endosomas tempranos se realizó según el siguiente procedimiento: las células se fijaron en PBS con paraformaldehído al 4% durante 15 min a TA, y se permeabilizaron en PBS con un 0,25% de Tritón X-100. Después de un bloqueo de 40 min en PBS con BSA al 5%, se realizó una inmunocitoquímica incubando cada anticuerpo durante 1 h a 37°C en PBS con BSA al 5%, y a continuación lavando tres veces con PBS. El anticuerpo primario de ratón contra el antígeno endosomal temprano 1 (*Early Endosome Antigen 1*, EEA1; 610456, BD Biosciences) se diluyó 1:1000, y el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (A11017, Molecular Probes) diluido 1:500 se incubó junto con 1,5 U/ml de faloidina conjugada con Texas Red® (T7471, Invitrogen). La faloidina permitió observar la actina del citoesqueleto, que define la morfología celular. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos y se sellaron.

Los compartimentos ácidos se marcaron incubando las células con LysoTracker® red DND-99 (L-7528, Invitrogen) a la concentración de 1  $\mu$ M en condiciones de cultivo durante 1 h. A continuación las células se fijaron en PBS con paraformaldehído al 4% durante 10 min a TA y se montaron sobre portaobjetos.

En ambos casos, las micropartículas se detectaron por reflexión. El procesado y las reconstrucciones de imágenes se realizaron con el software LCS Lite (Leica).

### 3.2.1.3 Estudio de la Citotoxicidad de las Micropartículas

Para determinar si las Si-MP y pSi-MP eran o no citotóxicas se realizó un estudio de viabilidad utilizando como control PS-MP no citotóxicas.

A cultivos de 20.000 macrófagos crecidos sobre cubreobjetos reticulados se añadieron 10.000 Si-MP, pSi-MP ó PS-MP. Al cabo de 24 h, utilizando un microscopio óptico invertido se localizaron un total de 141 células con una sola micropartícula fagocitada (Si-MP n=25; pSi-MP n=25; PS-MP n=25) o sin micropartícula (control n=70). Cada 24 h y durante 10 días, se registró su supervivencia y desplazamiento. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el test de diferencia de proporciones.

La citotoxicidad fue valorada también mediante un ensayo colorimétrico de viabilidad con bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, V13154, Invitrogen). Se basa en la conversión del MTT (amarillo) en formazán (púrpura) por la acción de las reductasas mitocondriales de las células metabólicamente activas. La absorbancia del formazán a 570 nm indica el porcentaje de células viables en cultivo. Para llevar a cabo el test se sembraron 15.000 células y 7.500 micropartículas (Si-MP, pSi-MP ó PS-MP) por pocillo en placas de 24 pocillos con 200 µl de medio; la citotoxicidad se analizó cada 72 h durante 10 días. El análisis estadístico de los resultados se efectuó utilizando el test de diferencia de proporciones.

#### *3.2.1.4 Etiquetaje y Seguimiento Individualizado de Células Vivas con Códigos*

El seguimiento individualizado de células se realizó con códigos fabricados en polisilicio. Sobre cubreobjetos reticulados se diferenciaron 20.000 macrófagos. Se añadieron 10.000 códigos a cada pocillo y, 24 h más tarde, se seleccionaron en el microscopio invertido un total de 38 macrófagos etiquetados con un código interiorizado. Cada 24 h y durante 10 días, se anotó su posición y se tomaron imágenes de todas estas células, para analizar el porcentaje de supervivencia celular y determinar las trayectorias recorridas por cada célula en particular. Las células que sobrevivieron hasta el décimo día se trataron para ser observadas en el SEM. Para verificar que los códigos se encontraban en el interior celular, los macrófagos se seccionaron en el FIB.

### **3.2.2 EMBRIONES DE RATÓN**

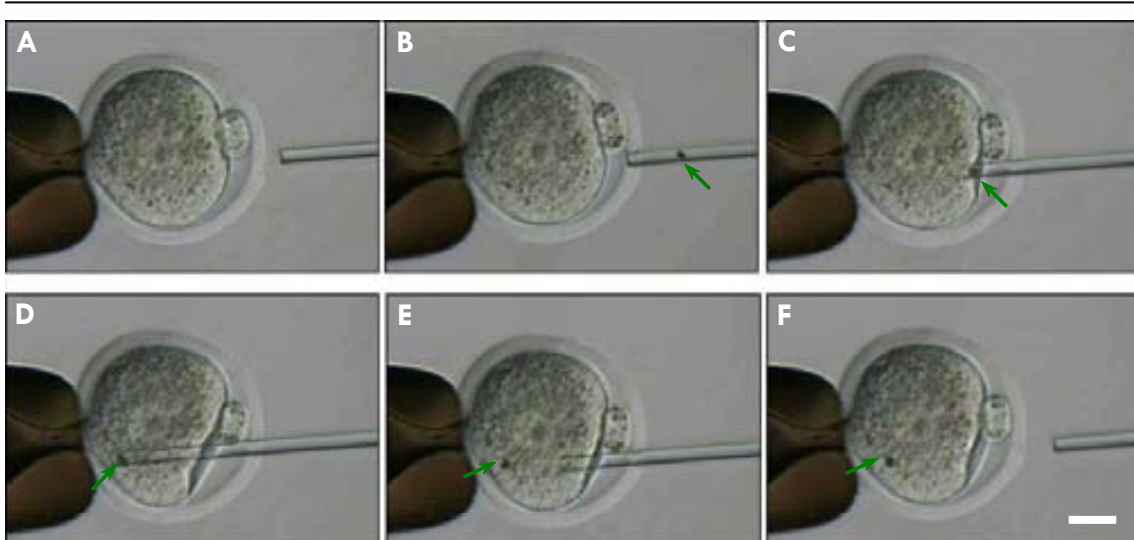
Los embriones se obtuvieron en el estadio de pronúcleos de los oviductos de hembras de la cepa híbrida de ratón B6CBAF1, superovuladas y apareadas con machos de la misma cepa. Las células del *cumulus* se disgregaron con 156 U/ml de hialuronidasa (H3506, Sigma) en medio optimizado de potasio equilibrado en tampón HEPES (H-KSOM) a 37°C. Hasta el momento de su utilización los embriones se mantuvieron en el incubador, a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> en gotas de medio KSOM cubiertas con aceite mineral.

Las Si-MP, pSi-MP y PS-MP se depositaron en gotas de H-KSOM con un 12% de polivinilpirrolidona (PVP, PVP360, Sigma-Aldrich) en una placa de micromanipulación; la PVP evitó la sedimentación de las micropartículas y facilitó su recogida. También se prepararon micropipetas de sujeción y de inyección a partir de capilares de



borosilicato; las micropipetas de inyección se fabricaron con un diámetro externo de entre 6 y 8  $\mu\text{m}$ , dejando un canal interno de entre 4,5 y 6  $\mu\text{m}$  que permitiera el movimiento fluido de las micropartículas en su interior.

Mediante un perforador piezoeléctrico (PiezoDrill, Burleigh Instruments Inc.) y un micromanipulador (TransferMan NK2, Eppendorf), se inyectó una única Si-MP, pSi-MP o PS-MP en el citoplasma de cada embrión ( $n=125$  de cada); también se inyectó un grupo de embriones sin micropartículas como control de inyección ( $n=110$ ), y un último grupo no microinyectado fue utilizado como control de viabilidad ( $n=115$ ). Para evitar cualquier posible daño en el material genético, las micropartículas se inyectaron evitando la zona de los pronúcleos y se depositaron en el extremo más alejado del punto de penetración de la micropipeta (Figura 17).



**Figura 17. Microinyección de una pSi-MP en un embrión de ratón en estado de pronúcleos.**

El embrión se orienta con el segundo corpúsculo polar situado entre las 12 y las 3 (A), se agujerea la zona pelúcida con el perforador piezoeléctrico (B), se coloca la micropartícula en el extremo de la micropipeta de inyección (C), y se introduce en el citoplasma (D). Finalmente, se deposita lo más lejos posible del punto de entrada de la micropipeta de inyección (E), y ésta se retira suavemente (F). Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

Los embriones se mantuvieron en cultivo en medio KSOM hasta el estadio de blastocisto. La valoración del desarrollo embrionario se hizo cada 24 h, utilizando el microscopio invertido. La comparación estadística de los resultados obtenidos se llevó a cabo utilizando el test exacto de Fisher de 2 colas.

### 3.2.3 CÉLULAS VERO

Para demostrar que el sistema de etiquetaje individual de células vivas utilizando códigos de polisilicio se podía aplicar a cualquier tipo celular, se seleccionó la línea celular sin capacidad fagocítica Vero (CCL-81, ATCC, células epiteliales de riñón de mono verde, *Cercopithecus aethiops*). Se utilizaron códigos modificados químicamente y de forma covalente con WGA<sup>561</sup> mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.1.3.2 de esta memoria.

En la figura 18 se resumen los estudios que se realizaron en esta línea celular.

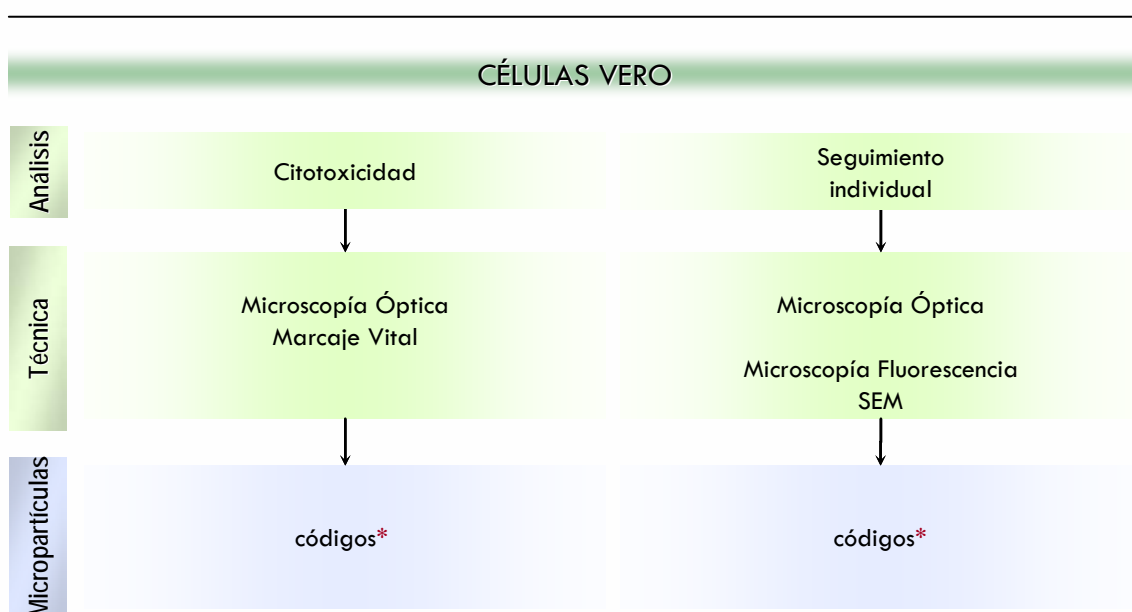


Figura 18. Análisis realizados utilizando la línea celular no fagocítica Vero, técnicas y tipos de micropartículas empleadas en cada caso.

códigos\* = códigos funcionalizados con WGA<sup>561</sup>.

#### 3.2.3.1 Estudio de Citotoxicidad de los Códigos Modificados con WGA

El cultivo y mantenimiento de las células Vero se realizó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio de cultivo MEM (31095-029, Gibco) con un 10% FBS (10106-169, Gibco). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 5.000 células por pocillo con 1 ml de medio de cultivo MEM. Pasadas 24 h se adicionaron 5.000 códigos funcionalizados con WGA en la mitad de los pocillos; la otra mitad se utilizó como grupo control. Las células se mantuvieron en cultivo durante un máximo de 10 días. Cada 24 h se seleccionó un cultivo de cada y se tiñó con azul de tripano para marcar

las células no viables. Con el microscopio óptico invertido y un objetivo de 40X, se capturaron imágenes de un mínimo de 10 áreas (300  $\mu\text{m}^2$ ) de cada uno de los cultivos.

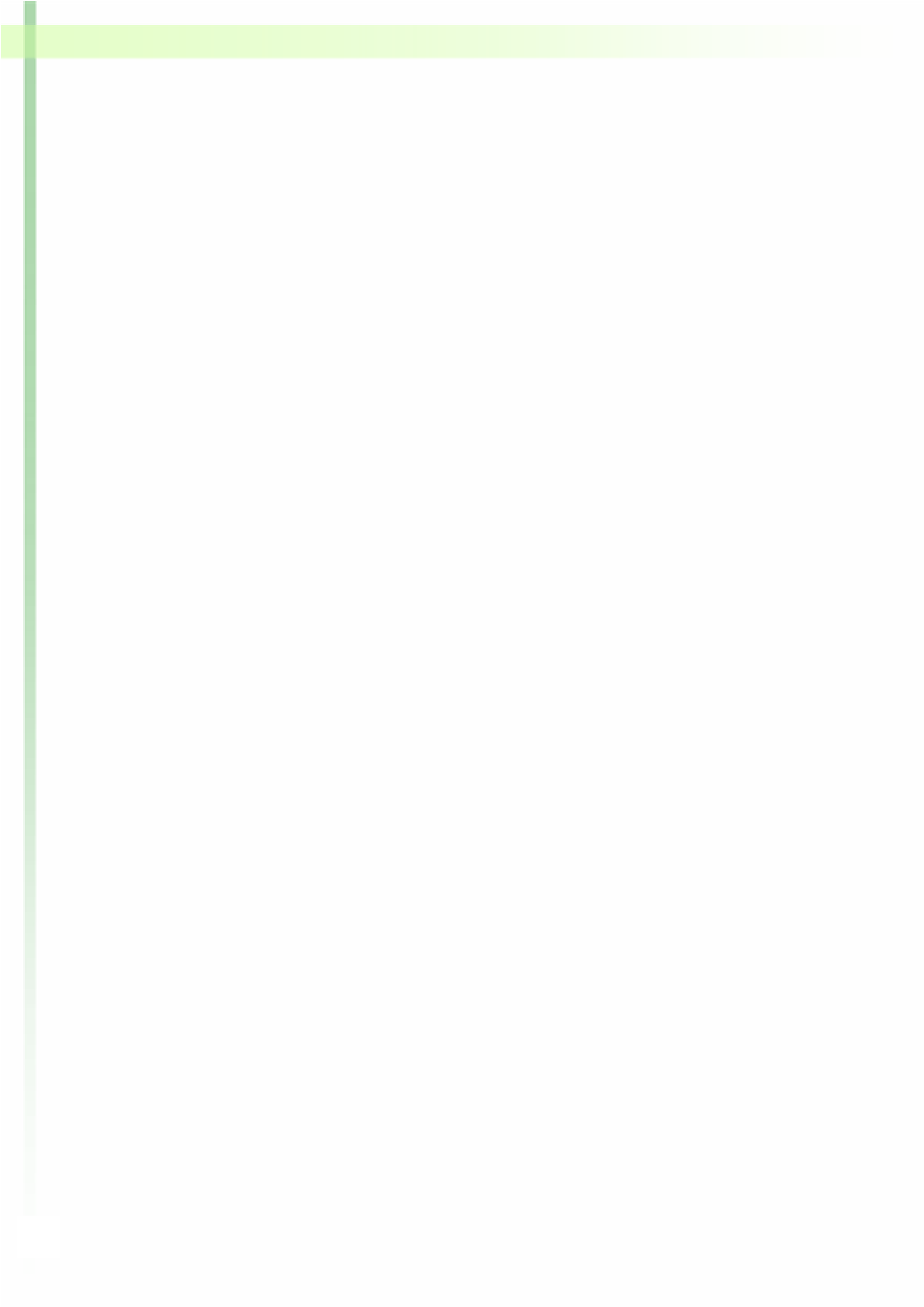
La cuantificación de un posible efecto tóxico causado por los códigos funcionalizados covalentemente con WGA<sup>651</sup> se realizó a partir del número de células vivas por micrómetro cuadrado. El Tiempo Medio de Generación (*Mean Generation Time*, MGT) se calculó a partir de la fórmula  $T/3.32 (\log N - \log N_0)$ , donde "T" es el tiempo total en cultivo en horas, y "N" y "N<sub>0</sub>" la densidad celular final e inicial, respectivamente.

### 3.2.3.2 Seguimiento Individualizado de Células con Códigos Modificados con WGA

Para localizar con mayor facilidad las células, éstas se sembraron sobre cubreobjetos reticulados esterilizados durante 45 min bajo la luz ultravioleta, a una concentración de 5.000 células y 5.000 códigos por pocillo con 1 ml de MEM. Se mantuvieron en cultivo durante un máximo de 7 días. Cada 24 h, con un microscopio óptico invertido se siguieron individualmente y se tomaron imágenes de 44 células etiquetadas con un solo código modificado con WGA<sup>651</sup>. La supervivencia de las células etiquetadas y la densidad y viabilidad del cultivo a lo largo de todo el tiempo se analizó estadísticamente utilizando el test de diferencia de proporciones.

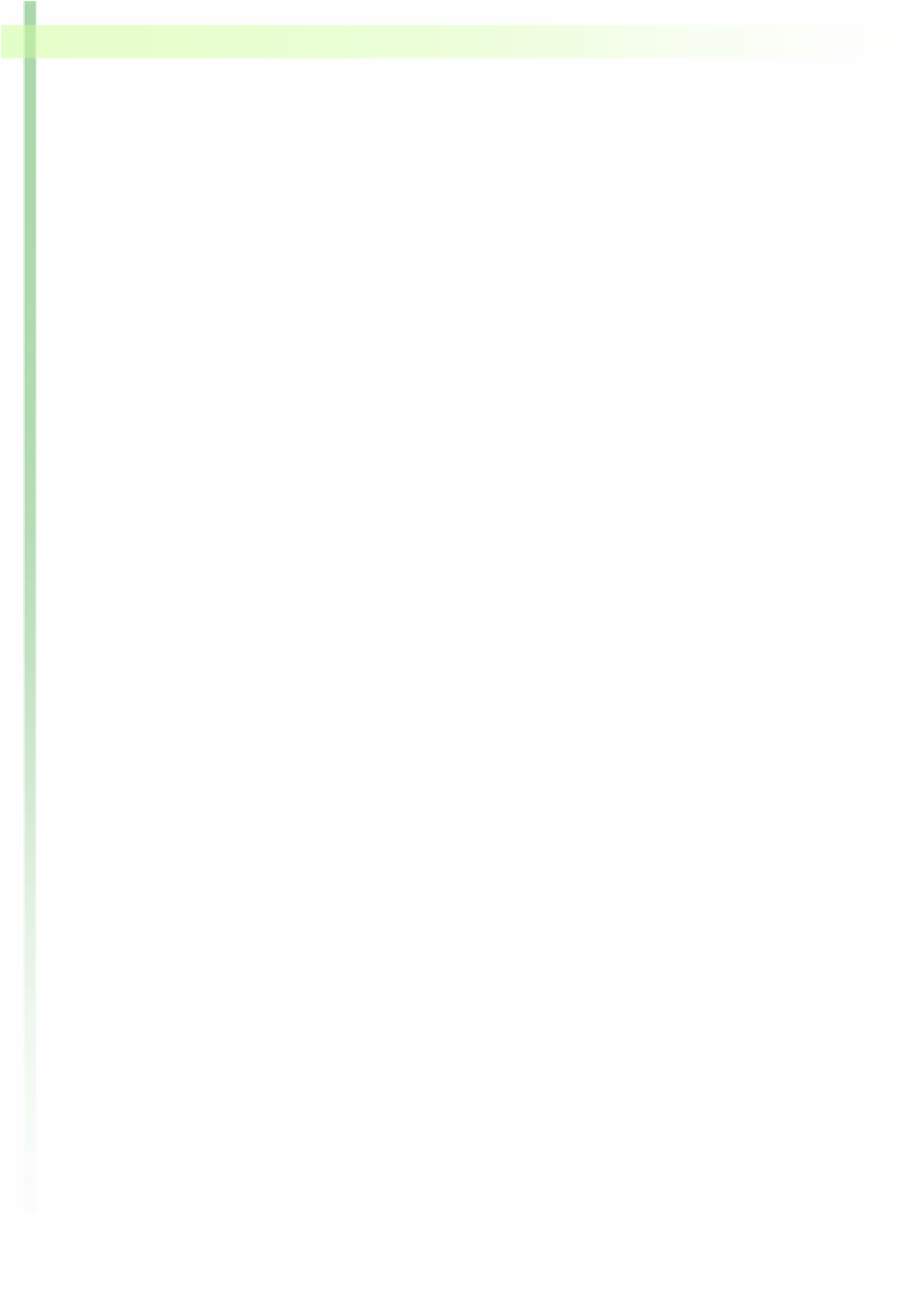
El último día las células etiquetadas se observaron bajo un microscopio de fluorescencia para comprobar la estabilidad de la funcionalización con WGA<sup>651</sup>.

Por último, los cultivos se fijaron y trataron para ser observados en un SEM y confirmar la robustez de la unión del código a la membrana celular. Para poder visualizar la codificación del cubreobjetos y localizar con más facilidad las células codificadas se utilizó un SEM-XPS.





#### 4. RESULTADOS



**Artículo 1:**

**“Internalization and cytotoxicity analysis of silicon-based microparticles in macrophages and embryos”**

**Autores:** Elisabet Fernández-Rosas, Rodrigo Gómez, Elena Ibañez, Leonard Barrios, Marta Duch, Jaume Esteve, José Antonio Plaza, Carme Nogués.

**Revista:** Biomedical Microdevices (2010). 12(3), 371-379.

**Índice de Impacto:** 3,323 (2009)





## Internalization and cytotoxicity analysis of silicon-based microparticles in macrophages and embryos

Elisabet Fernández-Rosas · Rodrigo Gómez ·  
 Elena Ibañez · Leonard Barrios · Marta Duch ·  
 Jaume Esteve · José A. Plaza · Carme Nogués

© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** Microchips can be fabricated, using semiconductor technologies, at microscopic level to be introduced into living cells for monitoring of intracellular parameters at a single cell level. As a first step towards intracellular chips development, silicon and polysilicon microparticles of controlled shape and dimensions were fabricated and introduced into human macrophages and mouse embryos by phagocytosis and microinjection, respectively. Microparticles showed to be non-cytotoxic for macrophages and were found to be localized mainly inside early endosomes, in tight association with endosomal membrane, and more rarely in acidic compartments. Embryos with microinjected microparticles developed normally to the blastocyst stage, confirming the non-cytotoxic effect of the particles. In view of these results silicon and polysilicon microparticles can serve as the frame for future intracellular chips development and this technology opens the possibility of real complex devices to be used as sensors or actuators inside living cells.

**Keywords** Silicon · Polysilicon · Microparticle · MEMS · Cytotoxicity

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10544-009-9393-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Fernández-Rosas · E. Ibañez · L. Barrios · C. Nogués (✉)  
 Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,  
 Universitat Autònoma de Barcelona,  
 08193-Bellaterra,  
 Barcelona, Spain  
 e-mail: carme.nogues@uab.cat

E. Fernández-Rosas · R. Gómez · M. Duch · J. Esteve · J. A. Plaza  
 Instituto de Microelectrónica de Barcelona (CNM-CSIC),  
 Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra,  
 Barcelona, Spain

### Abbreviations

CLSM	confocal laser scanning microscopy
FIB	focus ion beam
ICCs	IntraCellular Chips
MEMS	MicroElectroMechanical Systems
MP	microparticle
NP	nanoparticle
PF-MP	polystyrene fluorescent microspheres
pSi-MP	polysilicon MP
SEM	scanning electron microscope
Si-MP	Silicon MP
TEM	transmission electron microscopy

### 1 Introduction

Using different technologies it is possible to analyze the morphology, biochemistry, genetics and physiology, among others characteristics, of specific cells or tissues. In the immediate future, microtechnology will enable the production of microchips small enough to be introduced inside a cell and to record or modify specific intracellular parameters at a single cell level. Although such microchips are not yet available, the technology necessary to produce them is ready; micron and submicron scale complex structures can be precisely mass-produced by semiconductor technologies. In fact, Silicon MicroElectroMechanical Systems (MEMS) have been applied to the nanomechanical analysis of cells (Bao and Suresh 2003; Cross et al. 2007), weighing of single cells (Burg et al. 2007), cell manipulation and positioning (Gray et al. 2004; Lee et al. 2007) or molecular recognition (Fritz et al. 2000; Shekhawat et al. 2006). Very recently, micrometer-size biocompatible and biodegradable mesoporous silicon devices have been used as multistage delivery

systems for endothelial cells, where the devices laying outside the cell membrane release their cargo (Tasciotti et al. 2008). In view of these precedents, a further step is envisioned: the development of silicon based IntraCellular Chips (ICCs) with the advantages of MEMS (controlled shape and size, versatility and mass-production) but small enough to be internalized inside living cells. In the future, the ICCs could be functionalized to detect, measure or manipulate different intracellular parameters in individual cells, which could be accomplished by modifying the ICCs surface so that it is able to interact with intracellular molecules.

To be used in *in vivo* single cell studies, ICCs have to be able to be effectively internalized into living cells and they should not compromise cell viability. So far, particles on both the nano and micron size range have been successfully introduced into different types of cells. In most studies, cells with an inherent phagocytic capacity such as macrophages and dendritic cells (Vallhov et al. 2007; Verma et al. 2008) have been used but, in others, cells that are not specialized in phagocytosis, such as HeLa cells, have also been shown to internalize nanoparticles (Pan et al. 2007; Slowing et al. 2006). With regards to the effect of the internalized particles on cell viability, gold (Pan et al. 2007), polystyrene (Kang et al. 2005; Thiele et al. 2001; Thiele et al. 2003), PLGA (Faraasen et al. 2003; Gomes et al. 2006) and mesoporous silica (Vallhov et al. 2007) particles have been reported to be non-cytotoxic. But besides from the building material, the size of the particle must also be taken into consideration, as nanoparticles (NPs) seem to be more toxic than microparticles (MPs) (Choi et al. 2009).

In view of these previous studies, several biocompatible materials could potentially be used for the fabrication of ICCs. But in order to allow the design of complex devices of finely controlled shape and dimensions, the ICC building material should also be compatible with MEMS fabrication technology.

In this context, the aim of the present study was 1) to fabricate, using semiconductor technologies, MPs that could serve as frames for future ICCs development; 2) to demonstrate that these MPs can be introduced inside living cells without altering cellular viability; and 3) to determine the intracellular fate of the MPs. Macrophages and preimplantation embryos were selected as cellular models because of their natural capacity to engulf large particles and because of their high sensitivity, respectively.

## 2 Material and methods

### 2.1 Particle fabrication

Silicon (Si-) and polysilicon (pSi-) MPs were fabricated combining photolithographic techniques with silicon mi-

croelectronic and microfabrication technologies. The fabrication process is schematically shown in Fig. S1. Briefly, this technology is based on the combination of a device layer and a sacrificial layer on a silicon wafer. MP vertical dimensions are fixed with nanometer precision by the thickness of the device layer (silicon or polysilicon), while photolithographic techniques define micrometric or even sub-micrometric lateral dimensions. MPs were obtained by vertical dry etching of the device layer and their release from the wafer substrate by etching the sacrificial layer (silicon oxide). Finally, MPs were released by ultrasounds and collected by centrifugation in ethanol. This approach yielded more than 150 million devices of controlled and reproducible shape and dimensions per processed 4-in wafer.

### 2.2 Cell types, culture and manipulation

The human monocytic cell line THP-1 (ECACC No.8808 1201) was maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) with 20% FBS (Gibco) in standard conditions. THP-1 cells were plated in 24-well dishes (20,000 cells/well) on reticulated glass coverslips, in presence of a final concentration of 0.16  $\mu$ M PMA (Sigma) during 3 days for macrophage differentiation. Fabricated Si-MP and pSi-MP or commercial FP-MP (polystyrene Fluoresbrite microspheres, Polysciences) were added at a rate of 0.5 /cell.

Embryos at the one-cell stage were collected from the oviducts of superovulated B6CBAF1 mouse females in HEPES-buffered potassium simplex optimized medium (H-KSOM) (Biggers et al. 2000). Cumulus cells were dispersed by a 5 min incubation in 156 U/ml of hyaluronidase (Sigma) in H-KSOM medium at 37°C. PF-, Si- and pSi-MPs were suspended in a drop of H-KSOM medium containing 12% PVP (Sigma) in the micromanipulation dish and a single MP was injected into the cytoplasm of each embryo using a piezo-assisted (PiezoDrill, Burleigh Instruments Inc.) micromanipulator (TransferMan NK2, Eppendorf). After injection, embryos were transferred and kept in culture until the blastocyst stage at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in KSOM drops covered with mineral oil. Their development was assessed every 24 h. Control groups of non-injected embryos (development controls) and of embryos injected with a small amount of H-KSOM+PVP medium (injection controls) were cultured in parallel to the embryos injected with MPs. Animal care and procedures were conducted according to protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona.

### 2.3 Immunofluorescence

To label early endosomes, macrophages were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (15 min), permeabilized in



0.25% Triton X-100 in PBS (15 min), and blocked with 5% BSA in PBS (40 min) at RT. Permeabilized cells were incubated with primary EEA1 antibody (610456, BD Biosciences) at a 1:100 dilution in PBS with 5% BSA for 1 h at 37°C, followed by three washes with PBS, and then with an Alexa Fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (A11017, Invitrogen) at a 1:500 dilution in PBS with 5% BSA together with 1.5 U/ml Texas-Red phalloidin (T-7471, Molecular Probes) for 1 h at 37°C. To label acidic compartments, macrophages were incubated in LysoTracker® red DND-99 (L-7528, Invitrogen) at 1  $\mu$ M for 1 h at 37°C, and then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at RT.

#### 2.4 Cell imaging

Embryo development and macrophage viability was followed under an IX71 inverted microscope (Olympus) with differential interference contrast.

To localize internalized MPs, macrophages were fixed 24 h after MPs addition in Karnovsky's solution (2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde) at RT, dehydrated in an ethanol series, critical point-dried using CO<sub>2</sub> (K850 critical point drier Emitech), mounted on the specimen holder, coated with gold, and observed in a JEOL JSM-6300 SEM, equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (Link ISIS-200, Oxford). Using a combined Strata 235 Dual Beam FIB-SEM work station (FEI), cells were sectioned by the FIB beam to visualize the MPs.

To identify internalized MPs a TCS SP2 AOBS CLSM with 63X oil immersion optics (Leica) was used. Macrophage plasma membrane was labeled with WGA Texas Red conjugated (Molecular Probes) according to the manufacturer's protocol. Cells processed for the immunofluorescence detection of endosomal and lysosomal compartments were also analyzed under the CLSM. In both cases, processing and 3D reconstructions were performed with LCS Lite software (Leica).

Finally, for TEM examination, macrophages were first grown in 60 mm diameter plates (NUNC) and then trypsinized, fixed in Karnovsky's solution 0.1 M for 2 h at 4°C, post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated in a gradually

increasing concentration of acetone and embedded in Epon resin. Polymerization was achieved at 60°C for 48 h. Ultrathin sections were observed in a Hitachi H7000 electron microscope (Hitachi).

### 3 Results and discussion

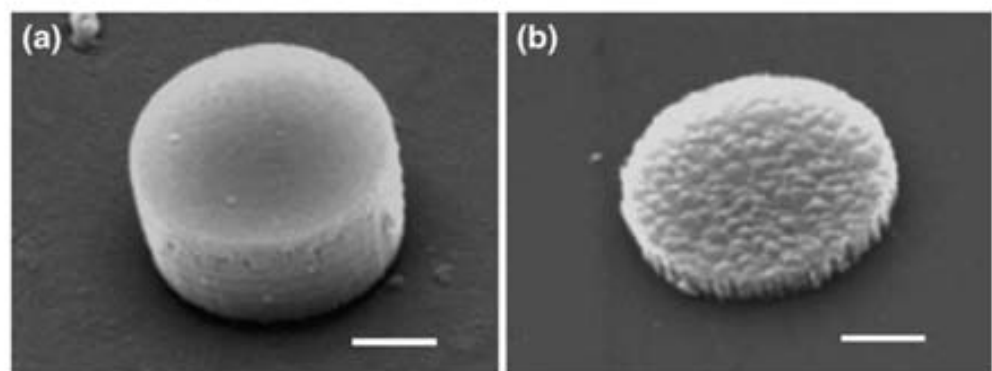
#### 3.1 Fabrication of silicon and polysilicon microparticles

Silicon (Si-) and polysilicon (pSi-) MPs were fabricated combining photolithographic techniques with silicon microelectronic and microfabrication technologies. This approach allows the shape and dimensions of the MPs to be precisely controlled at the micrometer or even submicrometer level. After testing different shapes and dimensions, cylindrical MPs with a 3  $\mu$ m diameter and 0.5  $\mu$ m (polysilicon) or 1.5  $\mu$ m (silicon) thicknesses were selected for further studies (Fig. 1). These dimensions were chosen because the resulting MPs are small enough to be introduced into cells but still big enough to be easily visualized under an optical microscope. The technology used to fabricate the Si-MP and pSi-MP offers high versatility as it is based on standard processes at semiconductor/MEMS industries. Hence, it opens the possibility to more complex devices, composed of different materials, which could be useful in the future for multifunctional purposes.

#### 3.2 Phagocytosis of silicon and polysilicon microparticles by human macrophages

To determine whether Si- and pSi-MPs could be introduced inside the cells by phagocytosis, human macrophages were chosen as a cellular model. Macrophages have an inherent phagocytic capacity and can engulf large pathogens and microparticles up to 20  $\mu$ m (Kang et al. 2005). However, not all types of materials can be phagocytosed by these cells, and coating of the MP surface with specific polymers is needed in these cases to promote phagocytosis (Faraasen et al. 2003; Foged et al. 2005; Thiele et al. 2001; Thiele et al.

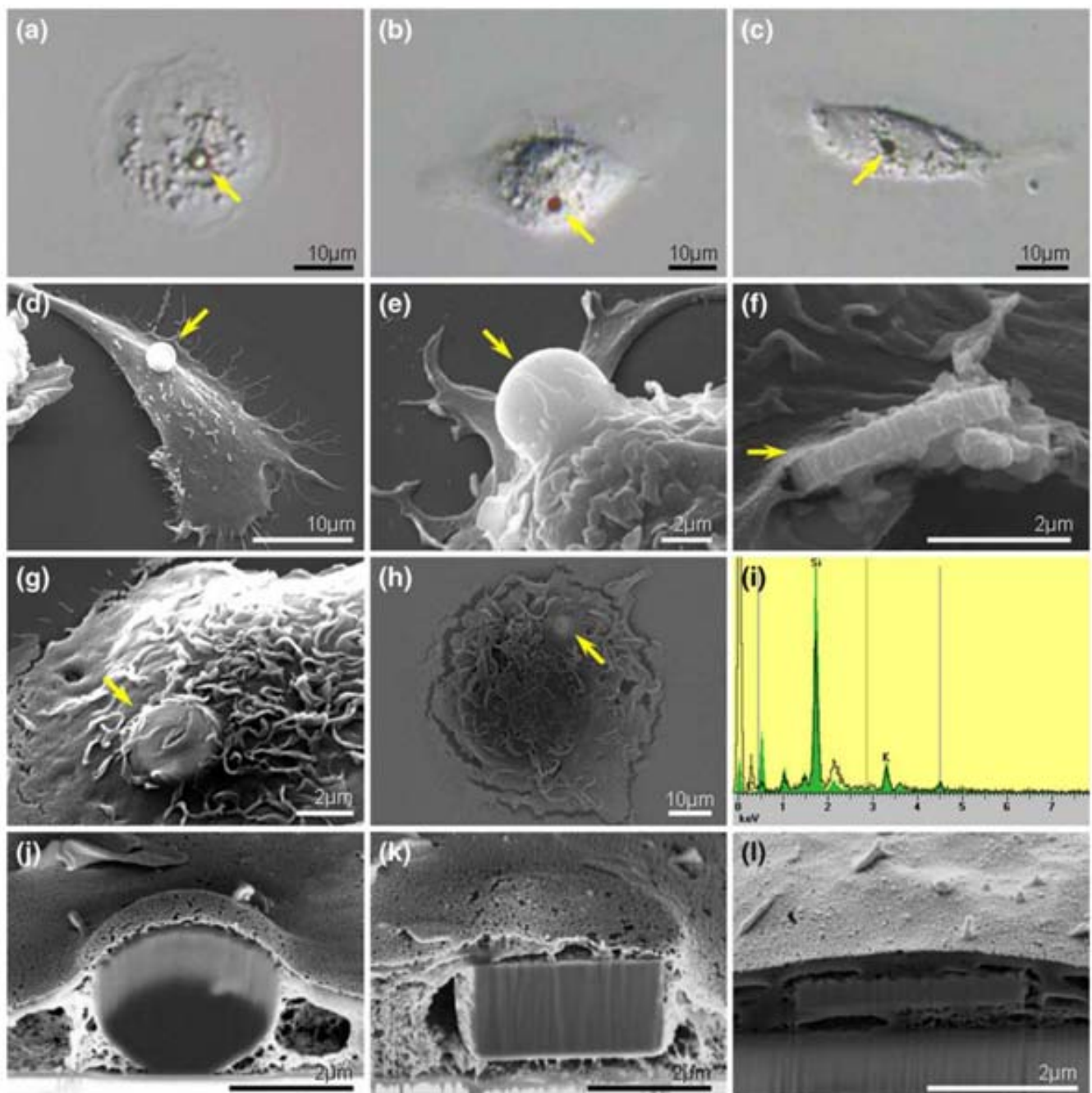
**Fig. 1** Silicon and polysilicon microparticles of 3  $\mu$ m in diameter. SEM images of (a) a silicon microparticle 1.5  $\mu$ m thick and (b) a polysilicon microparticle 0.5  $\mu$ m thick. Bars, 1  $\mu$ m



2003). In the present work, commercial polystyrene fluorescent microspheres (PF-MPs) with a 3  $\mu\text{m}$  diameter were used as controls, because of their proved phagocytosis by macrophages (Thiele et al. 2003). Both PF-, Si- and pSi-MPs were added to the macrophage cultures at a ratio of 0.5 MPs/cell, as in our preliminary work this ratio resulted in a majority of cells with only one phagocytosed MP (data

not shown). In the future, when these MPs are ICCs, the presence of a single ICC per cell may be necessary.

To visualize MP internalization we used different microscopy techniques. Initially, the cultured cells were analyzed under an inverted microscope in order to identify the macrophages carrying an apparently internalized PF-, Si- or pSi-MP (Fig. 2a–c). This analysis was performed 24 h after



**Fig. 2** Phagocytosis of microparticles by macrophages. (a–c) Bright-field microscopy and SEM images (d–l). (d) Microparticles lying on the cell surface, (e,f) being phagocytosed or (g,h) allegedly located inside the cell. (i) Energy dispersive X-ray spectrometer analysis of

the cell in (h). (j–l) FIB-SEM images confirming that microparticles are inside the cells. (a, d, e) and (j) polystyrene fluorescent microspheres, (b, f, g and k) silicon microparticles and (c, f, h, i and l) polysilicon microparticles



the addition of the MPs to the cultures. To confirm the presence of the MPs inside the cells, the selected macrophages were then analyzed under a scanning electron microscope (SEM). SEM images allowed us to clearly distinguish MPs lying on the cell surface (Fig. 2d) or in the process of being phagocytosed (Fig. 2e,f), but MPs present inside the cells appeared as surface protrusions (Fig. 2g,h) that could also be generated by MPs lying under the cell or by intracellular components. In these cases, an energy dispersive X-ray spectrometer was used to determine whether the protrusions observed corresponded to silicon material (Fig. 2i) and, if so, cells were sectioned using a focus ion beam-SEM (FIB-SEM) workstation. The images obtained with this microscopy technique unequivocally proved the presence of the MPs inside the cells (Fig. 2j-l; and Video 1). Alternatively, some of the macrophages allegedly carrying an internalized MP were analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) after labeling of the plasma membrane with wheat germ agglutinin in order to outline the limits of the cell. PF-MPs were easily detected using the 488 laser line of the CLSM, whereas Si- or pSi-MP were detected by reflection light. Images taken at consecutive focal planes and orthogonal projections were used to confirm the localization of the MPs inside the macrophages (Fig. 3 and Video 2).

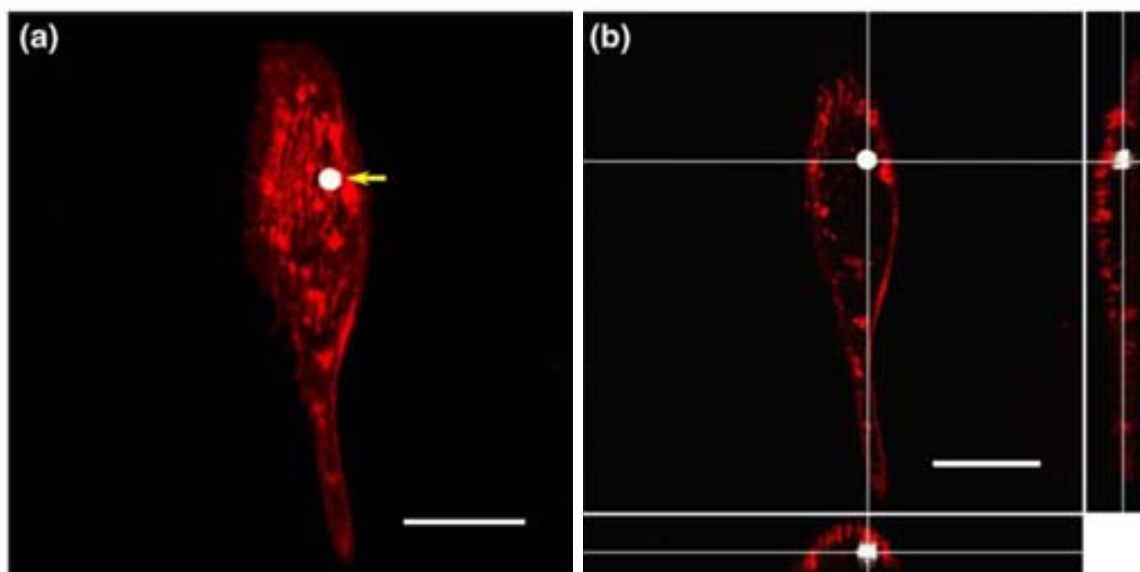
Using this wide range of microscopy techniques we were able to demonstrate that the majority of the cells initially identified by brightfield microscopy as having internalized a Si- or pSi-MP were indeed carrying a MP inside. Only in a very few cases the MPs were found on the cell surface, and these were usually in the process of being phagocytosed (Fig. 2e,f). Therefore, our results clearly indicate that

human macrophages are capable of phagocytosing Si- and pSi-based MPs. These results are in agreement with those of two recent studies using mesoporous silica MPs (2.5  $\mu\text{m}$  diameter) and silicon NPs and MPs (3  $\mu\text{m}$  diameter) demonstrating that both dendritic cells and macrophages can engulf particles of silica nature (Choi et al. 2009; Vallhov et al. 2007) and that these particles can be detected inside the cells using transmission electron microscopy (TEM) (Vallhov et al. 2007).

### 3.3 Intracellular localization of phagocytosed polysilicon microparticles in human macrophages

In a physiological phagocytosis process, pathogens and particles are engulfed by macrophages forming a phagosome, which eventually matures into a lysosome, where the pathogen or particle is degraded. However, some pathogens have the capability to break away from the early endosome and release themselves into the cytoplasm avoiding degradation (van der Wel et al. 2007). If, in the future, ICCs are designed to record or modify intracellular parameters, they must be able to interact directly with the target intracellular environment once introduced into the cells. Retention of the ICC inside the endosomal or lysosomal compartments would limit their range of action and render them useless for the recording or modification of cytosolic parameters. Therefore, it is essential to determine the intracellular fate of phagocytosed MPs, i.e. whether they are trapped inside the endosomal/lysosomal compartment or whether they are at some point released into the cytosol.

TEM analysis of the macrophages 24 h after the addition of pSi-MPs to the culture medium revealed that the most of



**Fig. 3** Polysilicon microparticle phagocytosed by a macrophage. **(a)** CLSM average projection image and **(b)** orthogonal projections of the z-stack reconstructions of consecutive focal planes (0.2  $\mu\text{m}$  each one). The plasma membrane was labelled with WGA (red). Bars, 20  $\mu\text{m}$

the internalized MPs were surrounded by an intracellular membrane (Fig. 4a–d). The absence of a defined membrane surrounding the MPs in some of the TEM sections does not necessarily indicate that the MPs were free in the cytosol, as the orientation of the sections could have precluded the visualization of the membrane. In the vast majority of pSi-MPs that were surrounded by a membrane, a tight association between the membrane and the MP could be observed (Fig. 4a,b), but occasionally the membrane was loose (Fig. 4c,d). This lack of contact between the surrounding membrane and the MP was also observed whenever more than one MP were present inside the same phagosomal compartment. These two different arrangements of the intracellular membranes around phagocytosed MPs have been previously described (Javier et al. 2008; Thiele et al. 2003 and Vallhov et al. 2007). Thus, according to some authors, MPs can be phagocytosed in two ways, depending on the nature and charge of the MP surface described (Javier et al. 2008; Thiele et al. 2003 and Vallhov et al. 2007). In one case, the MP is tightly surrounded by the phagosomal membrane and in this situation phagosome maturation is inhibited, i.e. fusion with a lysosome does not occur (de Chastellier and Thilo 2006; Thiele et al. 2003). In the other case the phagosomal membrane is loosely arranged around the phagocytosed MP and phagosomes are able to mature by fusing with lysosomes (Thiele et al. 2003). According to this model, our results suggest that pSi-MPs would be phagocytosed mainly by the first way and, therefore; tightly fitting phagosomes containing these MPs would not mature into lysosomes.

In order to confirm this hypothesis, we next investigated the nature of the intracellular compartment in which the phagocytosed pSi-MPs were trapped. With this aim, macrophages were fixed at different intervals after the addition of the MPs to the cultures and immunolabelled with EEA1 antibody or lysotracker. EEA1 is a tethering protein used to label early endocytic structures (Richardson et al. 2008) whereas lysotracker is a fluorescent probe for labeling and tracking acidic organelles like late endosomes and lysosomes (Huynh et al. 2007). Our results showed that the number of MPs that colocalized with EEA1 protein (Fig. 4e–i) increased over time (36%, 41% and 71% for 1, 3 or 6 h post MP addition, respectively) whereas the number of MPs that colocalized with an acidic compartment (Fig. 4j–m) did not change (36%, 30% and 36% for 6, 12 or 24 h post MP addition, respectively). Thus, by 6 h after MP addition, about two thirds of the MPs would be located inside an early endocytic compartment and about one third inside a late endosome or lysosome. The fact that the number of MPs inside an acidic compartment is not increased by 24 h post MP addition suggests that phagosomes containing the pSi-MPs might not be able to mature. And, together with our TEM results showing that

**Fig. 4** Intracellular localization of microparticles in macrophages. TEM images of a phagocytosed polysilicon microparticle in close (a) or loose (c) contact with the phagosomal membrane and details (b,d) of the same cells where yellow arrows point to the phagosomal membrane. (e) CLSM cross-section image of a macrophage incubated during 3 h with polysilicon microparticle, showing a microparticle inside an endosome; (f) reflection light (white), (g) plasma membrane (red), (h) endosomes (green) and (i) the whole cell (brightfield). (j) CLSM cross-section image of a macrophage incubated during 24 h with polysilicon microparticles, showing a microparticle inside an acidic compartment; (k) reflection light (white), (l) acidic compartment (red) and (m) the whole cell (brightfield)

by 24 h most pSi-MPs are tightly surrounded by a membrane, this would corroborate the hypothesis that maturation of these tightly fitting phagosomes is inhibited.

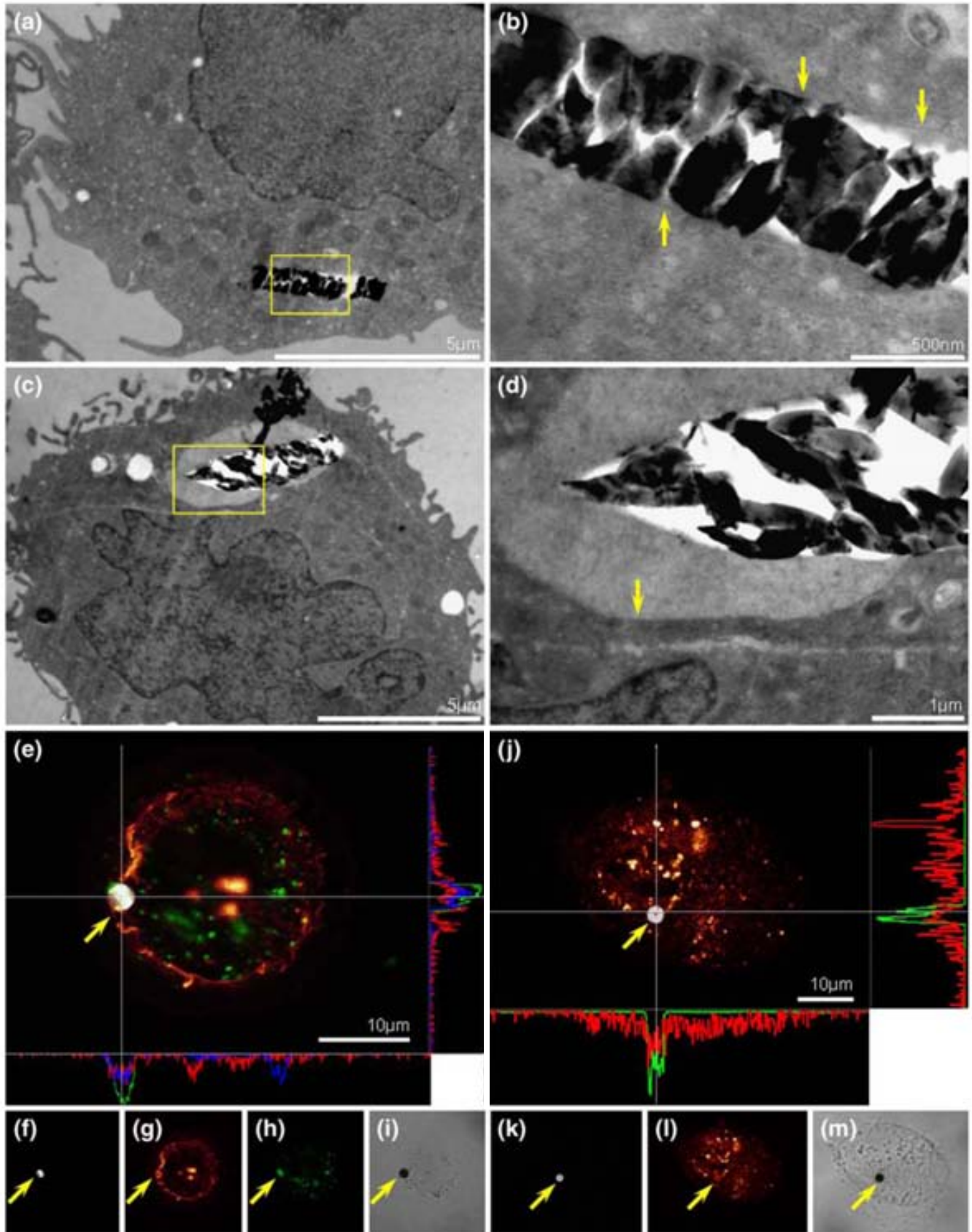
Studies on the intracellular fate of engulfed MPs are scarce and the results obtained so far differ. For instance, no colocalization with late endosomes or lysosomes was detected in macrophages incubated with fluorescent PLGA microspheres (3.6–4.8  $\mu\text{m}$ ; Trombone et al. 2007), or with mesoporous silica MPs (2.5  $\mu\text{m}$ ; Vallhov et al. 2007). In contrast, colocalization was reported in hydroxyapatite-coated microspheres (3  $\mu\text{m}$ ; Pedraza et al. 2008).

As previously mentioned, retention of phagocytosed MPs inside an endosomal/lysosomal compartment would limit the utility of future ICCs. However, different strategies could be applied to release the MPs into the cytosol. For instance, coating MPs with polyamines has been reported to induce rupture of the endosomal membrane (Thiele et al. 2003). Similarly, incubation of cells with chloriquine or a high sucrose concentration promotes endosome destabilization and induces release of endosome trapped material (Abes et al. 2006).

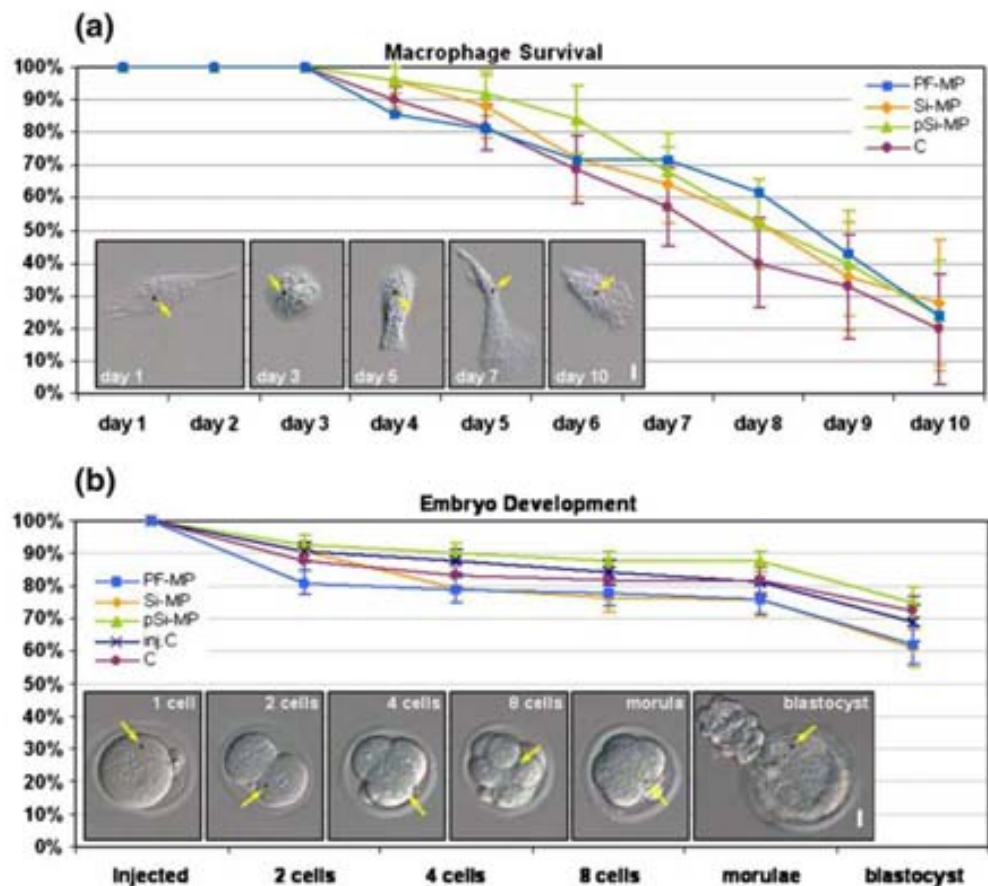
### 3.4 Cytotoxicity of silicon and polisilicon microparticles on human macrophages

To analyze possible cytotoxic effects of the MPs, human macrophages with phagocytosed Si- or pSi-MPs ( $n=25$  each) and control macrophages with phagocytosed PF-MPs ( $n=21$ ) or without phagocytosed MPs ( $n=70$ ) were individually followed under an inverted microscope for 10 days. Cells were cultured over reticulated coverslips to enable tracing of individual cells. The initial macrophage population decreased over time, but this decrease is inherent for these differentiated cells as demonstrated by the progressive reduction in the viability of the control group without MPs. No significant differences (difference between proportions test) in cell survival were observed between macrophages with or without phagocytosed MPs after 10 days in culture (Fig. 5a). Cytotoxicity was also analyzed using the MTT assay and the results confirmed that no significant differences were present among the different groups (difference between proportions test).





**Fig. 5** Cytotoxicity of silicon and polysilicon microparticles. **(a)** Percentage of surviving macrophages with phagocytosed MPs when individually followed for 10 days. Bar, 10  $\mu\text{m}$ . **(b)** Percentage of embryos developed to the blastocyst stage with or without microinjected microparticles. Bar, 10  $\mu\text{m}$ . Error bars represent standard deviation. Yellow arrows show the location of microparticles



Therefore, results from direct cell observation and from MTT assays carried out during 10 days are consistent with a lack of cytotoxic effect of PF-, Si- and pSi-MPs on human macrophages and are in agreement with previous studies by others using particles of similar materials. On one hand, polystyrene MPs have been shown to be biocompatible when introduced in macrophage cultures (Thiele et al. 2001), and for this reason PF-MPs were used as a control in the present study. On the other hand, silica, in its form of mesoporous silica, and either in NP (Hsiao et al. 2008; Lu et al. 2007; Slowing et al. 2006; Slowing et al. 2007) or MP size (Vallhov et al. 2007) has been tested in macrophages and dendritic cells. Even though the cells were monitored for only 24 or 48 h, the cytotoxic effect of this material seems to depend on the size and concentration of the particles. To the best of our knowledge there is only one published study on the cytotoxicity of silicon particles, in which the authors compare the cytotoxic effect of photoluminescent silicon NPs, fabricated using electrochemical etching and ultrasound treatment, with that of commercial silicon MPs (100–3000 nm diameter; Choi et al. 2009). According to the authors, silicon nanoparticles have a cytotoxic effect at 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , whereas MPs are not cytotoxic except at high concentrations (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). We did not observe such cytotoxicity when using Si- or pSi-MPs, but it

is important to note that MP concentration in our study was very low (0.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and to 1.35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for pSi-MPs and for Si-MPs, respectively) and that MPs were homogenous in size and shape.

### 3.5 Cytotoxicity of silicon and polysilicon microparticles on mouse embryo preimplantation development

We have demonstrated that silicon and polysilicon materials are not cytotoxic when introduced into macrophages, but macrophages are differentiated cells that do not proliferate. It has been described that cells are more vulnerable to cytotoxic effects when they are at the proliferative stage (Pan et al. 2007). Thus, we also tested whether the presence of an internalized MP (PF-, Si- or pSi-MP) had any effect on the *in vitro* development of mouse preimplantation embryos. In this case, MP internalization was achieved by microinjection of a single MP into the cytoplasm of embryos at one-cell stage (Fig. 5b and Video 3). A total of 115 control non-injected embryos, 110 microinjection controls (sham injections) and 375 embryos microinjected with a PF-, Si- or pSi-MP (125 embryos each) were monitored, analyzing their *in vitro* development until the blastocyst stage (Fig. 5b). Our results showed that no significant differences (Fisher's exact test, two sided) in



embryo development were present among MP-injected, control and microinjection control embryos (Fig. 5b).

The demonstration that Si- and pSi-MPs do not compromise embryo viability is of great interest because embryos are very sensitive cells and any disturbance could produce embryo arrest and death. In fact, the one-cell mouse embryo assay is widely employed to validate most of the material used in *in vitro* fertilization programs, such as plastic culture dishes, media or serum, before they are commercialized or even used in a particular IVF laboratory (Medowell et al. 1988). In the present study, the assay was taken a step further as MPs were not just added to the culture medium but microinjected into the cytoplasm. In spite of this, a similar percentage of embryos injected with Si- or pSi-MPs (60.9% and 75%, respectively) than of non-injected embryos (72.2%) reached the blastocyst stage, suggesting that these MPs are not cytotoxic.

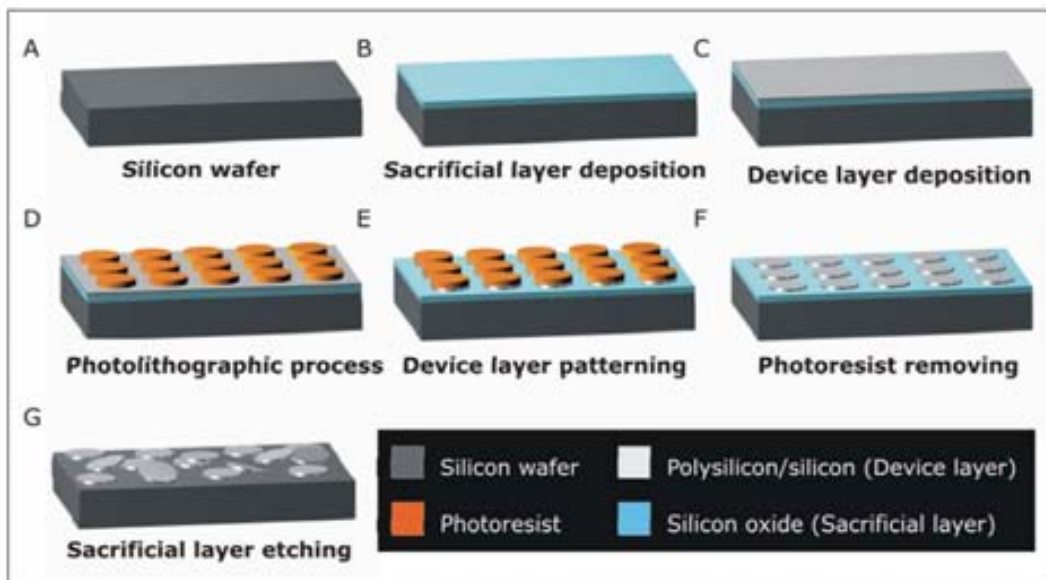
#### 4 Conclusions

In summary, our results show that Si- and pSi-MPs can be internalized into different types of mammalian cells (human macrophages and mouse embryos) and that, at the concentration used in the present work, they are biocompatible and do not interfere with cell viability. Therefore, they could constitute the frame for the future development of ICCs. ICCs herald a promising future in the field of cell biology. They can be 3D-machined and can be fabricated combining different materials, paving the way for the design of complex systems that could act as biosensors for molecular recognition, receiver and emitter systems for device communication, and even reservoirs for drug delivery. Nowadays, all these systems have been demonstrated in MEMS applications and, hence, a miniaturization effort for intracellular applications will be necessary. As a result, silicon-based complex ICCs will provide endless possibilities to the design of innovative devices for intracellular applications. For instance, they will enable characterization and quantification at the level of single cells and single molecules, *in vivo* real-time monitoring of cellular events and specific targeting to the action site or efficient drug delivery inside the target cells, among others. The results presented here constitute the starting point in the development of such devices.

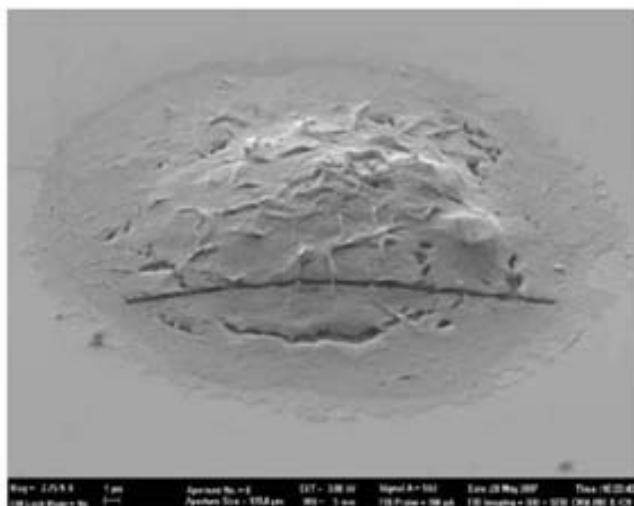
**Acknowledgements** This work was supported by the Spanish government under the MINAHE 2 (TEC2005-07996-C02-01) and the MINAHE 3 (TEC2008-06883-C03-01 and TEC2008-06883-C03-03). We also wish to thank the MEC-GICSERV program, the SGR program from the Catalan government (2005SGR-00437), the IBM-CNM clean room staff, and the staff at the Servei de Microscopia at Universitat Autònoma Barcelona.

#### References

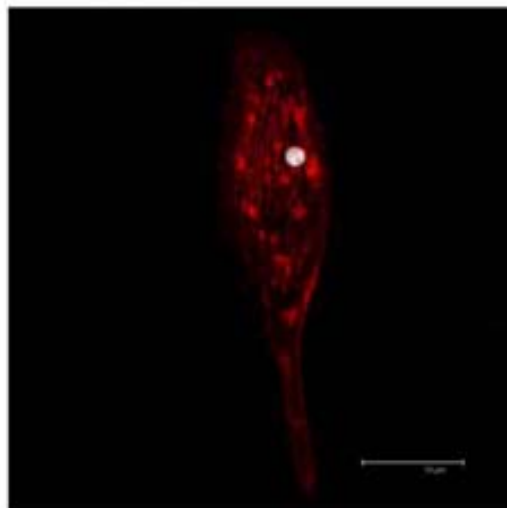
- S. Abes, D. Williams, P. Prevot, A. Thierry, M.J. Gait, B. Lebleu, J. Control. Release **110**(3), 595 (2006)
- G. Bao, S. Suresh, Nat. Mater. **2**(11), 715 (2003)
- J.D. Biggers, L.K. McGinnis, M. Raffin, Biol. Reprod. **63**(1), 281 (2000)
- T.P. Burg, M. Godin, S.M. Knudsen, W. Shen, G. Carlson, J.S. Foster, K. Babcock, S.R. Manalis, Nature **446**(7139), 1066 (2007)
- J. Choi, Q. Zhang, V. Reipa, N.S. Wang, M.E. Stratmeyer, V.M. Hitchins, P.L. Goering, J. Appl. Toxicol. **29**(1), 52 (2009)
- S.E. Cross, Y.S. Jin, J. Rao, J.K. Gimzewski, Nat. Nanotechnol. **2**(12), 780 (2007)
- C. de Chastellier, L. Thilo, Cell. Microbiol. **8**(2), 242 (2006)
- S. Faraasen, J. Voros, G. Csucs, M. Textor, H.P. Merkle, E. Walter, Pharm. Res. **20**(2), 237 (2003)
- C. Foged, B. Brodin, S. Frokjaer, A. Sundblad, Int. J. Pharm. **298**(2), 315 (2005)
- J. Fritz, M.K. Baller, H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.J. Guntherodt, C. Gerber, J.K. Gimzewski, Science **288**(5464), 316 (2000)
- A.J. Gomes, A.S. Faustino, A.E.H. Machado, M.E.D. Zaniquelli, T.D. Rigoletto, C.N. Lunardi, L.O. Lunardi, Drug Deliv. **13**(6), 447 (2006)
- D.S. Gray, J.L. Tan, J. Voldman, C.S. Chen, Biosens. Bioelectron. **19**(12), 1763 (2004)
- J.K. Hsiao, C.P. Tsai, T.H. Chung, Y. Hung, M. Yao, H.M. Liu, C.Y. Mou, C.S. Yang, Y.C. Chen, D.M. Huang, Small **4**(9), 1445 (2008)
- K.K. Huynh, E.L. Eskelinen, C.C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig, S. Grinstein, EMBO J. **26**(2), 313 (2007)
- A.M. Javier, O. Krefl, M. Semmling, S. Kempter, A.G. Skirtach, O.T. Bruns, P. del Pino, M.F. Bedard, J. Raedler, J. Kaes, C. Plank, G.B. Sukhorukov, W.J. Parak, Adv. Mater. **20**(22), 4281 (2008)
- P.B. Kang, A.K. Azad, J.B. Torrelles, T.M. Kaufman, A. Beharka, E. Tibesar, L.E. DesJardin, L.S. Schlesinger, J. Exp. Med. **202**(7), 987 (2005)
- H. Lee, Y. Liu, D. Ham, R.M. Westervelt, Lab Chip **7**(3), 331 (2007)
- J. Lu, M. Liong, J.I. Zink, F. Tamanoi, Small **3**(8), 1341 (2007)
- J.S. Medowell, R.J. Swanson, M. Maloney, L. Veeck, J. In Vitro Fert. Embryo Transf. **5**(3), 144 (1988)
- Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent, Small **3**, 1941 (2007)
- C.E. Pedraza, L.G. Nikolcheva, M.T. Kaartinen, J.E. Barralet, M.D. McKee, Bone **43**(4), 708 (2008)
- S.C.W. Richardson, K.L. Wallom, E.L. Ferguson, S.P.E. Deacon, M.W. Davies, A.J. Powell, R.C. Piper, R. Duncan, J. Control. Release **127**(1), 1 (2008)
- G. Shekhawat, S.H. Tark, V.P. Dravid, Science **311**(5767), 1592 (2006)
- I. Slowing, B.G. Trewyn, V.S.Y. Lin, J. Am. Chem. Soc. **128**(46), 14792 (2006)
- L.I. Slowing, B.G. Trewyn, V.S.Y. Lin, J. Am. Chem. Soc. **129**(28), 8845 (2007)
- E. Tasciotti, X.W. Liu, R. Bhavane, K. Plant, A.D. Leonard, B.K. Price, M.M.C. Cheng, P. Decuzzi, J.M. Tour, F. Robertson, M. Ferrari, Nat. Nanotechnol. **3**(3), 151 (2008)
- L. Thiele, B. Rothen-Rutishauser, S. Jilek, H. Wunderli-Allenspach, H.P. Merkle, E. Walter, J. Control. Release **76**(1–2), 59 (2001)
- L. Thiele, H.P. Merkle, E. Walter, Pharm. Res. **20**(2), 221 (2003)
- A.P.F. Trombone, C.L. Silva, L.P. Almeida, R.S. Rosada, K.M. Lima, C. Oliver, M.C. Jamur, A.A. Coelho-Castelo, Genet. Vaccines Ther. **5**, 9 (2007)
- H. Vallhov, S. Gabrielsson, M. Stromme, A. Schevinius, A.E. Garcia-Bennett, Nano Lett. **7**(12), 3576 (2007)
- N. van der Wel, D. Hava, D. Houben, D. Fluitsma, M. van Zon, J. Pierson, M. Brenner, P.J. Peters, Cell **129**(7), 1287 (2007)
- A. Verma, O. Uzun, Y.H. Hu, Y. Hu, H.S. Han, N. Watson, S.L. Chen, D.J. Irvine, F. Stellacci, Nat. Mater. **7**(7), 588 (2008)



Supplementary Material – Figure 1



Supplementary Material – Video 1



Supplementary Material – Video 2



Supplementary Material – Video 3

**Artículo 2:**

**“Intracellular polysilicon barcodes for cell tracking”**

**Autores:** Elisabet Fernández-Rosas, Rodrigo Gómez, Elena Ibañez, Lleonard Barrios, Marta Duch, Jaume Esteve, Carme Nogués, José Antonio Plaza.

**Revista:** Small (2009). 5(21), 2433-2439.

**Índice de Impacto:** 6.171 (2009)





# Intracellular Polysilicon Barcodes for Cell Tracking

Elisabet Fernandez-Rosas, Rodrigo Gómez, Elena Ibañez, Leonardo Barrios, Marta Duch, Jaume Esteve, Carme Nogués,\* and José Antonio Plaza\*

**D**uring the past decade, diverse types of barcode have been designed in order to track living cells in vivo or in vitro, but none of them offer the possibility to follow an individual cell up to ten or more days. Using silicon microtechnologies a barcode sufficiently small to be introduced into a cell, yet visible and readily identifiable under an optical microscope, is designed. Cultured human macrophages are able to engulf the barcodes due to their phagocytic ability and their viability is not affected. The utility of the barcodes for cell tracking is demonstrated by following individual cells for up to ten days in culture and recording their locomotion. Interestingly, silicon microtechnology allows the mass production of reproducible codes at low cost with small features (bits) in the micrometer range that are additionally biocompatible.

## Keywords:

- barcodes
- cell tracking
- micromachining
- optical microscopy
- polysilicon

## 1. Introduction

An increasing demand for tracking smaller items has driven the exploration for novel methods of barcoding at much smaller scales.<sup>[1]</sup> Individual cell tracking is of great interest in cell biology<sup>[2]</sup> to evaluate individual cell behavior (cell survival, cell movement, relationship with other cells, etc.) under different conditions (exposure to toxic gases or compounds, to a chemical or light stimulus (chemotaxy, phototaxy) or to X-ray microbeams, for example). Therefore, in the last decade there has been a growing interest in developing different types of barcodes to track living cells either in vivo or in vitro. Encoded particles from different materials and patterns have been proposed to follow cells in culture. Quantum-dot-tagged microbeads,<sup>[3]</sup> metallic barcodes,<sup>[4,5]</sup> porous-silicon photonic crystals,<sup>[6]</sup> acrylic-encoded carriers,<sup>[7]</sup> iron oxide magnetic nanoparticles,<sup>[8,9]</sup> poly(dimethylsiloxane) (PDMS) particles,<sup>[10]</sup> nano-

disk codes,<sup>[11]</sup> and diamond nanoparticles<sup>[12]</sup> have been used among other devices. While some of these particles act as a barcode because of their own nature,<sup>[5]</sup> others need to be coupled to different fluorochromes,<sup>[3,13]</sup> and this extra step makes barcode manufacturing more expensive and difficult. Additionally, the use of fluorochromes requires a fluorescence microscope or a confocal scanning laser microscope to visualize the barcode but UV light and laser beams have been reported to be harmful for living cells.<sup>[14]</sup> Codes can be introduced into cells,<sup>[15]</sup> attached to the plasma membrane, immobilized on a solid substrate via complementary single-stranded DNA or immunocytochemical reaction systems,<sup>[16]</sup> or can even be used as a chamber containing the cell.

Until now, codes have been envisaged to follow different cell populations mixed in the same culture or to follow a subpopulation of cells in vivo. To track individual cells during several days in culture and using an optical microscope, the codes have to fulfill special biological, optical, and fabrication requirements. First, from the biological point of view, codes must be designed to the micrometer size, sufficiently small to be introduced into a cell. In addition, the number of uniquely identifiable barcodes must be large enough to track a sufficient number of cells to perform biological studies, and the devices have to be made of a biocompatible material in order to ensure cell viability. Second, from the optical point of view, the codes have to be simple and visible under light microscopes. Thus, the structures that represent every single bit have to be larger than the resolution limit of these microscopes, which is in practice close to 1  $\mu\text{m}$ . Finally, the fabrication technology of the codes

[\*] Dr. C. Nogués, Dr. E. Ibañez, Dr. L. Barrios  
Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia  
Facultat Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona  
08193-Bellaterra, Barcelona (Spain)  
E-mail: carme.nogues@uab.cat

Dr. J. A. Plaza, E. Fernández-Rosas, R. Gómez, M. Duch,  
Prof. J. Esteve  
Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC)  
Campus UAB, 08193-Bellaterra, Barcelona (Spain)  
E-mail: joseantonio.plaza@ultra.cnm.es

DOI: 10.1002/sml.200900733

has to be able to mass-produce reproducible codes at low cost with small features (bits) in the micrometer range. Silicon microtechnologies, used for microelectromechanical system (MEMS) and nanoelectromechanical system (NEMS) fabrication, can fulfill these requirements and produce these devices. Silicon structures are already mass-produced by semiconductor industries at the micrometer and submicrometer scale. As complex silicon structures can be precisely micromanomachined, they can offer high performance and versatility.<sup>[17]</sup>

The aim of the present study was to develop and test the use of polysilicon barcodes for single-living-cell labeling and tracking. The study addresses the barcode concept and the design of a fabrication technology that fulfills the aforementioned optical and biological requirements. Micromanomachined barcodes were added to a cell culture to test their internalization and their functionality as labels. In addition, the study also investigated the possible effects of the barcodes on cell survival. Finally, the effectiveness of the barcodes is illustrated by the study of human macrophage activity in terms of cell locomotion.

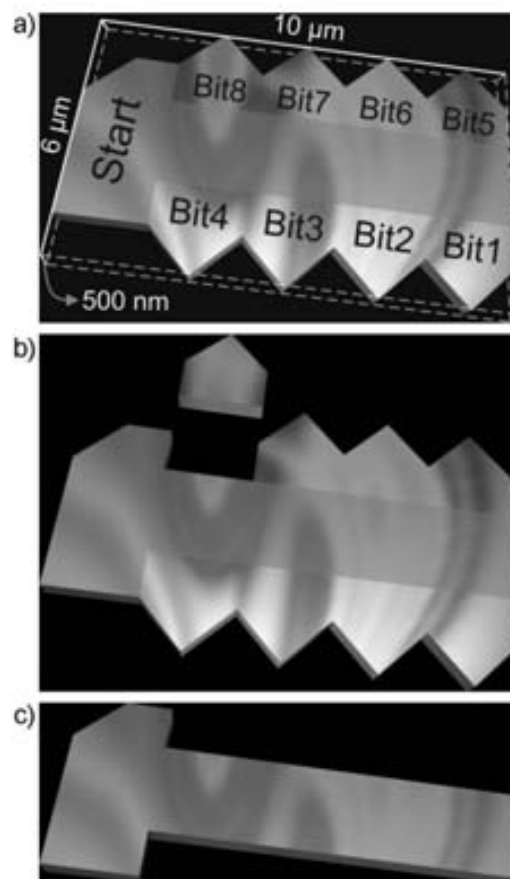
## 2. Results and Discussion

### 2.1. Barcode Design

A barcode is an optical representation of alphanumeric digits used to uniquely identify an item. At the beginning, barcodes were designed in one dimension (linear or 1D barcodes) and data were represented in parallel lines as wide and narrow bars. In addition, barcodes could also be represented in two-dimensional geometric patterns (2D barcodes). In these cases squares, dots, hexagons, and so on can also be used. Here, we propose a 2D barcode design that consists of a matrix code with pentagonal digits arranged on a grid pattern. The matrix is divided into a regular  $4 \times 2$  grid (Figure 1a) that contains a total of 8 bits (1 or 0) to give binary data to the barcode reader (Figure 1b). Barcodes have to be asymmetric in order to allow the correct reading of data. For this reason, the barcodes have been designed with a start marker to help the user read the message in its correct orientation (Figure 1c).

The data capacity, that is, the number of possible different codes, depends on the number of bits of the barcode. The proposed design has 8 bits, which means 256 different codes, from 0 to 255. Figure 2a shows three different codes. If all the pentagons are present the binary code is 1111 1111, which in decimal representation corresponds to the number 255; if the pentagon Bit8 is left the binary code is 0111 1111, which in decimal corresponds to the number 127; and if all the pentagons are left the binary code is 0000 0000, which corresponds to the number 0. A schematic view of the 256 different codes is shown in Figure 2b.

The barcode dimensions have to fulfill requirements in terms of cell biology and identifiability. The devices have to be small enough to be introduced into different cell types. Typical cells have volumes in the range from  $500$  to  $14000 \mu\text{m}^3$ . In addition, as most cell studies are performed using light and confocal microscopes, features smaller than  $1 \mu\text{m}$  could be difficult to identify. Thus, considering the code visibility, the



**Figure 1.** Schematic view of the intracellular barcode. a) The whole device showing the array of bits and the start point. b) A code with one bit left (Bit number 8). c) The asymmetric structure to indicate the starting point to the barcode reader.

lateral dimensions of the barcodes were fixed to  $10 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ . In contrast, the thickness of the barcode was fixed to submicrometer dimensions,  $500 \text{ nm}$ , according to the small volume criteria. Due to the submicrometer range of the thickness of the barcode, the maximum volume of an individual barcode was  $30 \mu\text{m}^3$ . Thus, the volume of the barcode is approximately 20 to 500 times smaller than that of many typical cells.

### 2.2. Microfabrication of Polysilicon Barcodes

The thickness of the code has to be as small as possible to reduce the volume of the chip compared to the cell volume. Silicon microtechnologies, used for MEMS and NEMS fabrication, enable us to produce devices with dimensions in the micrometer range or even smaller and layers with thicknesses from several micrometers to a few nanometers. In addition, porous silicon has been demonstrated to be biocompatible in extracellular applications<sup>[18]</sup> even though its cytotoxicity when located inside cells has not been analyzed. According to this preliminary result, we proposed to use silicon in its polysilicon configuration as a base material for manufacturing the barcodes. Additional advantages of the polysilicon material are that it is a well-known material in the



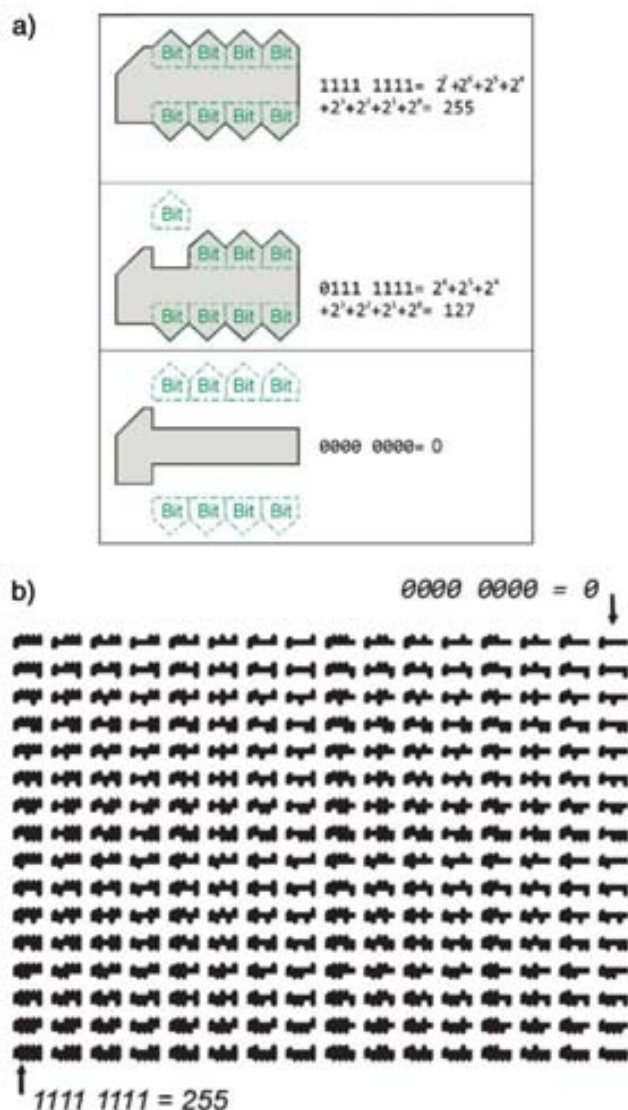


Figure 2. Symbology of the designed barcodes. a) Examples of the equivalent binary and decimal data for three different examples of barcodes and b) mask of the 256 different codes (8 bits) designed.

semiconductor industry, it can be deposited uniformly from a few nanometers to several micrometers, and it can be patterned with micrometric or submicrometric dimensions by dry-etching techniques and optical-photolithographic processes.

The technology of the whole fabrication process is shown in Figure 3. The polysilicon intracellular barcodes were fabricated on 4 in. p-type (100) silicon wafers. For the release of the devices it was necessary to use a sacrificial layer between the silicon bulk wafer and the device layer. Therefore, a plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) silicon oxide layer was deposited on the front side of the wafer to be used as a sacrificial layer. This material was selected because it can be easily removed by HF, which does not etch polysilicon. The next step was the deposition of the device layer, a 0.5- $\mu\text{m}$ -thick low-pressure chemical vapor deposition (LPCVD) polysilicon layer. The barcodes were patterned by a photolithographic step and a posterior dry etching. The etching uniformity

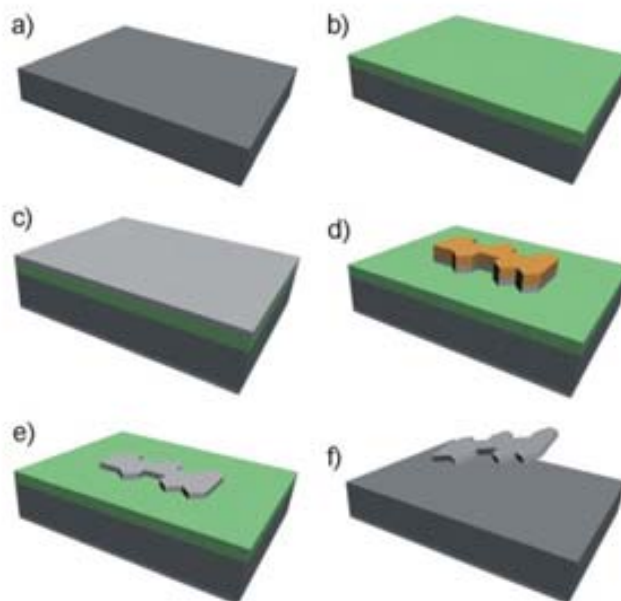


Figure 3. Barcode fabrication process. a) Silicon wafers are used as starting material, b) a silicon oxide layer is deposited at the front side of the wafer as a sacrificial layer, c) a LPCVD polysilicon oxide layer is deposited as structural layer, d) a photolithographic step is used to define the barcodes geometries, e) barcode patterning is achieved by polysilicon dry etching, and f) barcodes are released by silicon oxide etching in HF vapors.

through the whole wafer and the vertical profile of the etching were required due to the extremely small dimensions of the codes ( $10 \times 6 \times 0.5 \mu\text{m}^3$ ). An inductively coupled plasma etcher (ICP, Alcatel A601) was used as it offers a 5% etch uniformity through the whole wafer and also provides an extremely vertical etching profile. Barcodes were patterned by vertical silicon/polysilicon dry etching using an optimized Bosch process recipe. The etch stops at the buried silicon oxide layer and then the photoresist was removed by plasma etching. Finally, the codes were released by the etching of the silicon oxide sacrificial layer after 40 min in vapors of HF (49%). The barcodes were obtained from the substrate by ultrasounds in ethanol for 5 min and were collected. A scanning electron microscope (SEM) image of fabricated barcodes is shown in Figure 4. The results also show that the barcodes do not break during fabrication or collection, which could be one of the main sources of false identification.

### 2.3. Cellular Uptake of Barcodes

Barcode cellular uptake was analyzed on human macrophages differentiated *in vitro* and kept in culture for several days. Macrophages were chosen because they have the capacity to phagocytose large pathogens and it has been described that they can engulf polystyrene particles at least up to  $15 \mu\text{m}$ .<sup>[19]</sup> Once differentiated, macrophages attach to culture plates and can measure up to 90- $\mu\text{m}$  long by 20- $\mu\text{m}$  wide and 15- $\mu\text{m}$  high in the widest region. Macrophage cultures were analyzed 24 h after barcode addition to check their cellular uptake. Using an inverted optical microscope, barcodes were localized either

inside macrophages (Figure 5) or on their surroundings. To ascertain that barcodes were inside the cells, and not over or under the plasma membrane, cells were further analyzed with a SEM equipped with a focused ion beam work station (SEM-FIB), which allows cutting the cells with extreme accuracy. Five cells that apparently contained a barcode in their cytoplasm were cut with the FIB to verify this hypothesis. Results confirmed that in all the cells analyzed the barcode was

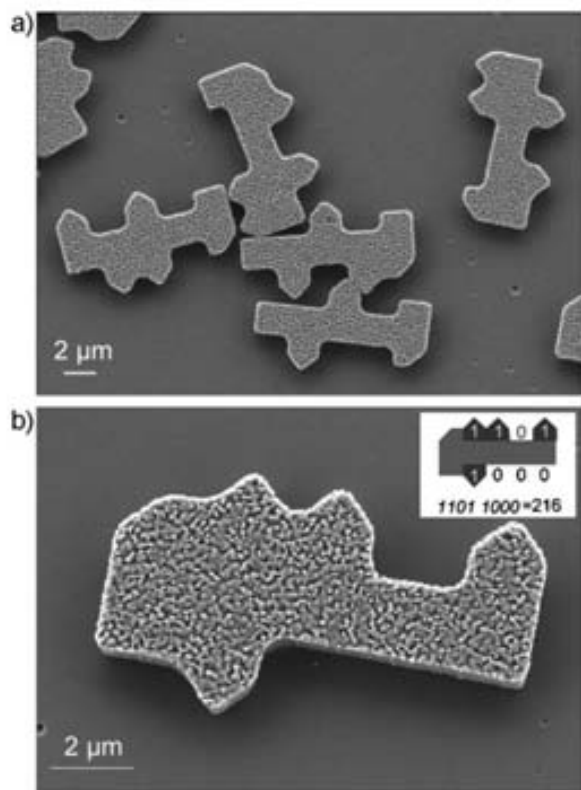


Figure 4. SEM images of different barcodes (a) and a barcode with the binary code 1101 1000 that corresponds to decimal number 216 (b).

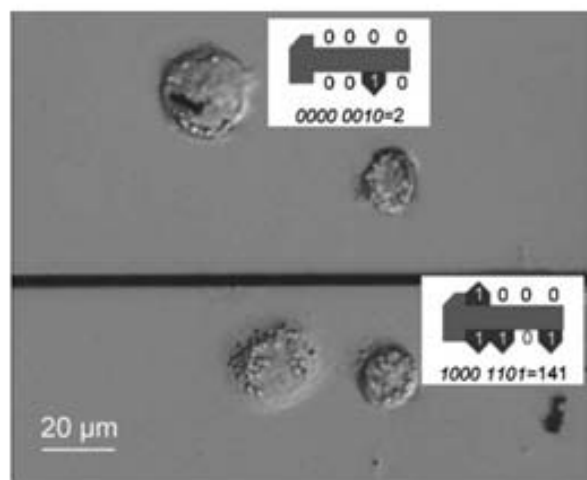


Figure 5. Light microscope micrograph of an *in vitro* culture of macrophage cells with polysilicon barcodes. Cells with (upper left insert) and without barcodes, as well as an isolated barcode are shown. The picture was taken with a 40× objective on an inverted optical microscope.

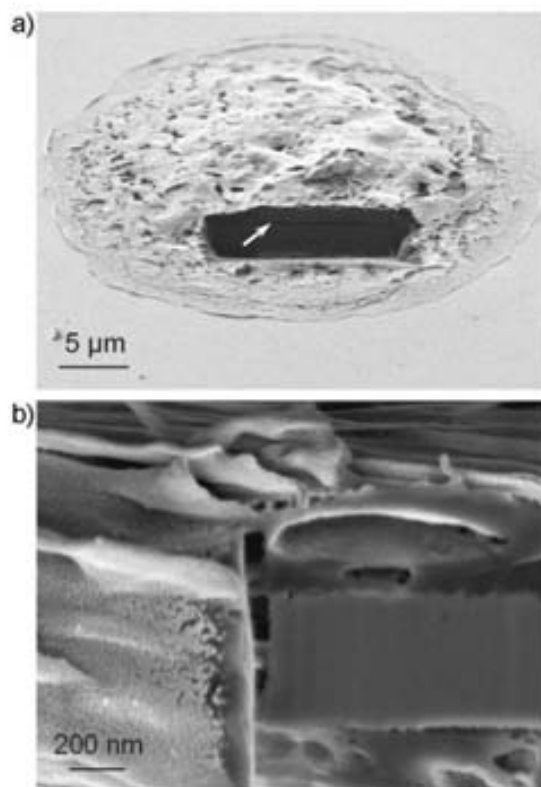


Figure 6. SEM images of macrophages with a barcode in their cytoplasm cut with FIB. a) The arrow indicates the presence of the barcode inside the cytoplasm. b) A detail of a barcode where the surrounding cytoplasm can be seen.

present inside their cytoplasm (Figure 6), thus demonstrating that macrophages are able to phagocytose polysilicon barcodes of 10 μm × 6 μm × 0.5 μm dimensions.

#### 2.4. Feasibility of Polysilicon Barcodes for Cell Labeling

To evaluate the identifiability of barcodes under an inverted optical microscope, several cells incubated in the presence of different barcodes were selected and photographed with a digital camera. Each individual barcode could be clearly read using light microscopy. As barcodes have been designed with a reading start marker, no interpretation mistakes occurred. In Figure 7, two different barcodes found inside two different macrophages are shown. The flat shape of cells facilitates the flat-placed position of the barcodes, allowing their clear identification. Only in a very few cases were the barcodes positioned in a 90° inclined plane regarding the focal plane and could not be read.

#### 2.5. Barcode Biocompatibility and Macrophage Survival

A crucial biological requirement is the biocompatibility of the barcodes. Both biocompatibility and cell viability were tested in our study. Macrophages carrying a polysilicon barcode were studied during 10 days to evaluate cell survival. The initial



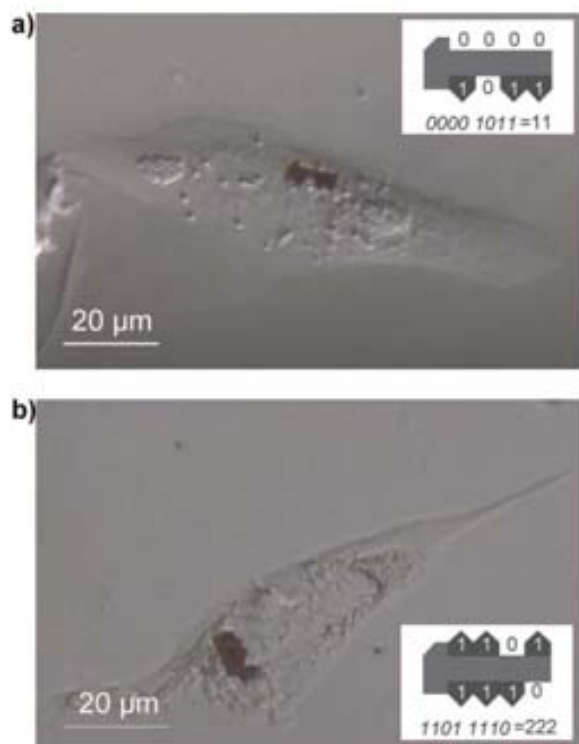


Figure 7. Inverted light microscopy images of two macrophages with a barcode in their cytoplasm. a) Barcode 11 and b) barcode 222. A schematic view of both barcodes is shown in the insets.

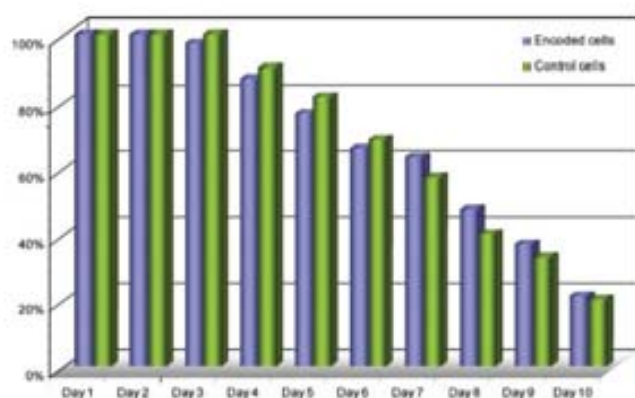


Figure 8. Cell viability of encoded (with polysilicon barcodes) and control macrophages during 10 days in culture. No statistically significant differences in the survival rates were found between the two populations.

macrophage population (38 cells) was reduced down to 20.0% (8 cells) after 10 days in culture (Figure 8). This decrease is similar to that observed in control cultures without polysilicon barcodes (21.1%;  $n = 70$  cells). In fact, when survival rates of encoded (with a barcode) and control macrophages were compared, no significant differences were found in either the first five days in culture, or in the last five days (difference between proportions test). Hence, these results demonstrate that the reduction in macrophage viability can be attributed to the normal behavior of these cells after differentiation, which attach to the substrate, stop proliferating, and finally die,<sup>[20]</sup> and not to the presence of the barcodes.

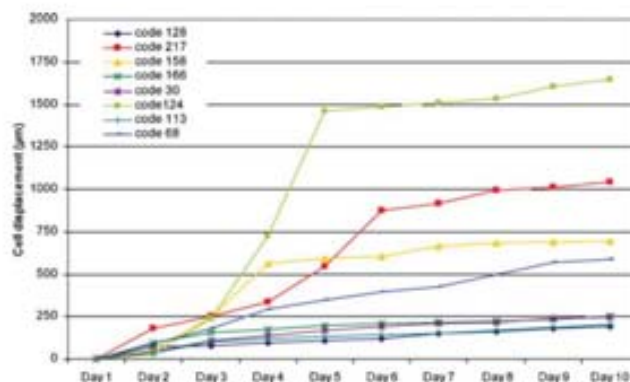


Figure 9. Daily movements of eight different macrophages with a barcode in their cytoplasm during 10 days in culture.

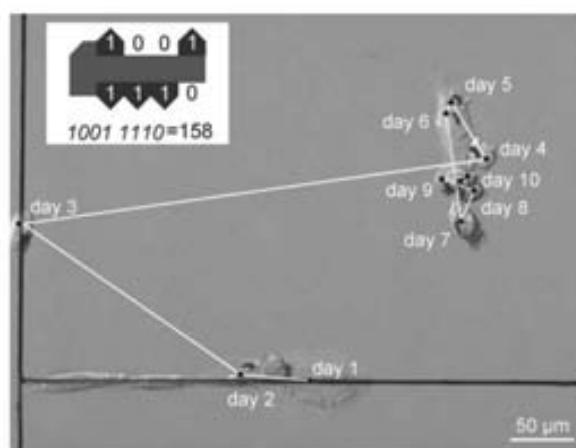


Figure 10. Daily movements of encoded macrophage-158 during 10 days in culture. Pictures were taken daily with an inverted light microscope. The picture shown is a composition of the daily micrographs taken and the white line indicates the cell trajectory throughout the 10 days. Macrophage 158 has travelled a total of 697  $\mu\text{m}$ .

## 2.6. Effectiveness of Barcodes for Cell Tracking

Cell tracking was carried out in 38 different macrophages carrying a polysilicon barcode. Macrophages were cultured on reticulated coverslips to record the coordinates of each cell containing a barcode. We were able to localize and identify a particular cell every 24 h during 10 days despite of its changing morphology during cell locomotion. Each cell was tracked individually and its movement was recorded. From the data obtained, the trajectory of 8 individual cells that survived up to 10 days was drawn, and the partial or total distance covered was measured (Figures 9 and 10). In general, cells moved more actively during the first five days in culture. Cell locomotion data indicates that polysilicon barcodes do not induce any cytotoxicity or damaging effects. Until now, cells were tracked using manual or automated detectors coupled to sophisticated software,<sup>[21,22]</sup> which allows following of the cells for up to one or two days. The advantage of using barcodes is that no special equipment is needed other than an inverted light microscope that is typically found in all cell biology laboratories.

### 3. Conclusions

In the present work we demonstrate that fabrication of barcodes for labeling and tracking individual living cells is possible using silicon microtechnologies. We have designed and produced barcodes small enough to be introduced into a living cell without apparently disturbing its normal behavior, but at the same time big enough to be readily identified under optical microscopes. This technology allows the production of thousands of barcodes with different codes, and most importantly, involves a mass-production with low cost and high versatility. Silicon microtechnology allows the fabrication of robust barcodes (they do not break during production, release, or cell uptake) with lateral dimensions in the micrometer or submicrometer range where the digits structures are an internal part of the whole barcode. Using this microtechnology, reduction of the actual barcode size to submicrometer range could be envisaged; the limiting factor is only the resolution of present optical microscopes. The designed barcodes can be visualized and their patterns easily recognized under a light microscope using a 60 $\times$  objective, the maximum magnification objective routinely used in cell culture laboratories. As no UV light or laser beam is employed to illuminate the barcode, phototoxicity is prevented and cells are not disturbed.

We have demonstrated cell uptake of barcodes in macrophages, and that internalized barcodes can be correctly identified using only an inverted optical microscope. In addition, we have shown that polysilicon is biocompatible. Finally, an example of the utilization of polysilicon barcodes in cell tracking has been provided by individually following the encoded macrophages during 10 days and recording their locomotion. The immediate future is to evidence the functionality of the barcodes in other cells types without phagocytic capacity. It has been described that HeLa cells and fibroblasts (NIH 3T3) can endocytose particles as large as 6  $\mu\text{m}$ .<sup>[23,24]</sup> Thus, this innovative system to track cells could be used in a large variety of cells. The long-term future is to design automated track systems to detect and recognize the barcode pattern of polysilicon barcodes.

### 4. Experimental Section

**Macrophage culture:** Human monocytic cell line THP-1 (ECACC No.88081201) was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) in standard conditions. THP-1 cells (20 000 cells per well) were plated in 24-well dishes on reticulated glass coverslips in the presence of 0.16  $\mu\text{m}$  phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) during 3 days to promote macrophage differentiation. Polysilicon barcodes were added in the third day at a rate of 0.5 barcodes per cell, adjusted to achieve a maximum number of cells with only one phagocytosed barcode.

**Barcode imaging:** After 24 h in contact with polysilicon barcodes, cell culture medium was changed to remove the nonphagocytosed devices and assure that only barcodes inside cells or in close contact with the cells were left. Barcodes were localized

and identified under an optical inverted microscope (Olympus IX71, Hamburg, Germany) with differential interference contrast. Only macrophages with one phagocytosed barcode were selected and individually followed during 10 days. Images were taken every 24 h and cell location was recorded. Reticulated coverslips were used to trace individual cell trajectories. Surviving macrophages at day 10 were fixed in Karnovsky's solution (2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde) at room temperature, dehydrated in ethanol series, critical point-dried using CO<sub>2</sub> (K850 critical point drier Emitech), mounted on the specimen holder, coated with gold, and observed in an S-570 SEM (Hitachi, Tokyo, Japan). Finally, a combined Strata 235 Dual SEM-FIB work station (FEI, Hillsboro, OR, USA) was used to section cells to verify that barcodes were inside macrophages.

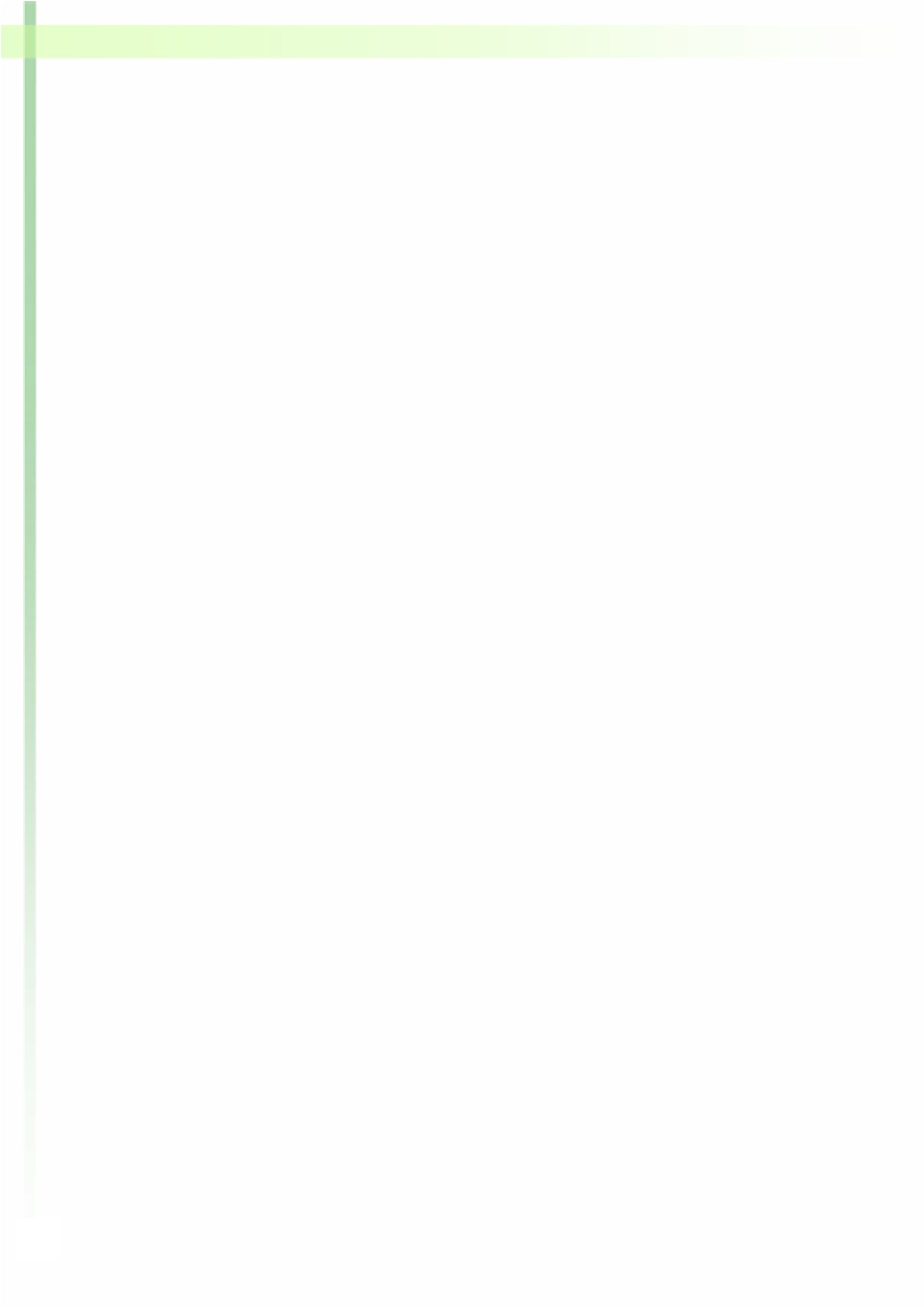
### Acknowledgements

This study was financed by the Spanish government through the MINAHE 2 project MEC-TEC2005-07996-CO2-01. We also wish to thank the IMB-CNM clean room staff and the Servei Microscopia Universitat Autònoma de Barcelona.

- [1] N. H. Finkel, X. H. Lou, C. Y. Wang, L. He, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 353A–359A.
- [2] D. B. Weibel, W. R. DiLuzio, G. M. Whitesides, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 209–218.
- [3] M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631–635.
- [4] S. R. Nicewarner-Pena, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan, *Science* **2001**, *294*, 137–141.
- [5] A. Bulbarelo, S. Sattayasamitsathit, A. G. Crevillen, J. Burdick, S. Mannino, P. Kanatharana, P. Thavarungkul, A. Escarpa, J. Wang, *Small* **2008**, *4*, 597–600.
- [6] F. Cunin, T. A. Schmedake, J. R. Link, Y. Y. Li, J. Koh, S. N. Bhatia, M. J. Sailor, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 39–41.
- [7] O. Beske, J. J. Guo, J. R. Li, D. Bassoni, K. Bland, H. Marciniak, M. Zarowitz, V. Temov, I. Ravkin, S. Goldbard, *J. Biomol. Screening* **2004**, *9*, 173–185.
- [8] W. J. Rogers, C. H. Meyer, C. M. Kramer, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2006**, *3*, 554–562.
- [9] C. Wilhelm, F. Gazeau, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3161–3174.
- [10] D. Dendukuri, D. C. Pregibon, J. Collins, T. A. Hatton, P. S. Doyle, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 365–369.
- [11] L. Qin, M. J. Banholzer, J. E. Millstone, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3849–3853.
- [12] O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi, F. Druon, J. P. Boudou, T. Sauvage, P. Georges, P. A. Curmi, F. Treussart, *Small* **2008**, *4*, 2236–2239.
- [13] B. K. Oh, J. M. Nam, S. W. Lee, C. A. Mirkin, *Small* **2006**, *2*, 103–108.
- [14] J. R. McCarthy, F. A. Jaffer, R. Weissleder, *Small* **2006**, *2*, 983–987.
- [15] L. C. Mattheakis, J. M. Dias, Y. J. Choi, J. Gong, M. P. Bruchez, J. Q. Liu, E. Wang, *Anal. Biochem.* **2004**, *327*, 200–208.
- [16] D. K. Wood, G. B. Braun, J. L. Fraikin, L. J. Swenson, N. O. Reich, A. N. Cleland, *Lab Chip* **2007**, *7*, 469–474.
- [17] J. Voldman, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 433–434.
- [18] E. Tasciotti, X. W. Liu, R. Bhavane, K. Plant, A. D. Leonard, B. K. Price, M. M. C. Cheng, P. Decuzzi, J. M. Tour, F. Robertson, M. Ferrari, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 151–157.

- [19] C. Foged, B. Brodin, S. Frokjaer, A. Sundblad, *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 315–322.
- [20] S. Tsuchiya, Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, K. Tada, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 1530–1536.
- [21] O. Debeir, I. Camby, R. Kiss, P. Van Ham, C. Decaestecker, *Cytometry Part A* **2004**, *60A*, 29–40.
- [22] K. Li, M. Chen, T. Kanade, *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention–MICCAI 2007, Pt 2, Proceedings* **2007**, *4792*, 295–302.
- [23] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11613–11618.
- [24] A. M. Javier, O. Kreft, M. Semmling, S. Kempter, A. G. Skirtach, O. T. Bruns, P. del Pino, M. F. Bedard, J. Raedler, J. Kaes, C. Plank, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4281–4287.

Received: May 2, 2009  
Published online: August 10, 2009





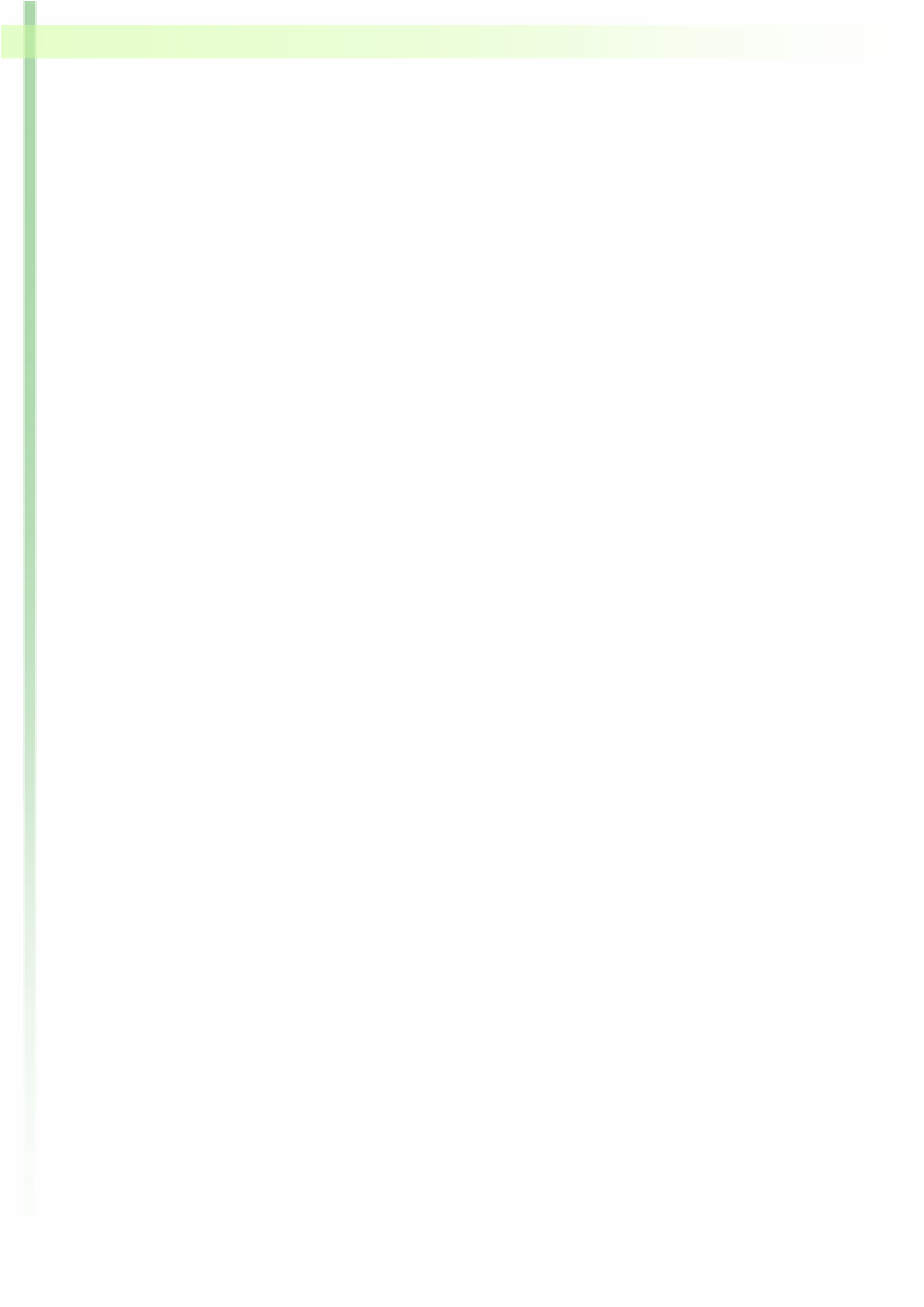
**Artículo 3:**

**“Chemical functionalization of polysilicon microparticles for single cell studies”**

**Autores:** Elisabet Fernández-Rosas, Antoni Baldi, Elena Ibañez, Leonard Barrios, Rodrigo Gómez, Marta Duch, Sergi Novo, José Antonio Plaza, Jaume Esteve, Onofre Castells, Carme Nogués, César Fernández-Sánchez.

**Revista:** Langmuir (aceptado).

**Índice de Impacto:** 3.898 (2009)



## Chemical functionalization of polysilicon microparticles for single cell studies

Elisabet Fernández-Rosas <sup>a,b</sup>, Antoni Baldi <sup>a</sup>, Elena Ibañez <sup>b</sup>, Leonardo Barrios <sup>b</sup>, Sergi Novo <sup>b</sup>, Jaume Esteve <sup>a</sup>, José A. Plaza <sup>a</sup>, Marta Duch <sup>a</sup>, Rodrigo Gómez <sup>a</sup>, Onofre Castells <sup>c</sup>, Carme Nogués <sup>b,\*</sup>, César Fernández-Sánchez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC). Campus UAB, 08193-Bellaterra, Barcelona (Spain).*

<sup>b</sup> *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona (Spain).*

<sup>c</sup> *Servei de Microscòpia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona (Spain).*

Corresponding authors: [carme.nogues@uab.cat](mailto:carme.nogues@uab.cat); [cesar.fernandez@imb-cnm.csic.es](mailto:cesar.fernandez@imb-cnm.csic.es)  
Phone number: +34935947700; fax number: +34935801496

### ABSTRACT

In this work, two types of polycrystalline-silicon (polysilicon) microparticles were modified with fluorescent specific ligands in order to be selectively attached to chemical residues located at the plasma membrane and thus to be applied to study individual cells in culture. Two different functionalization approaches based on adsorption and covalent attachment were assayed and compared in terms of the efficiency of the ligand immobilisation and stability of the modified particle in culture medium. Cylindrical microparticles (non-encoded microparticles) and shape-encoded microparticles (barcodes) were used with the aim of demonstrating the non-dependence of the particle size and shape on the efficiency of the immobilisation protocol. It is shown that the covalent attachment of the ligand to the surface of the microparticle, previously modified with an aldehyde-terminated silane, gave the best results. As a proof of concept, Vero cells in culture were labelled with modified barcodes and successfully tracked for up to one week without any alteration in the viability of the cells. It is anticipated that such modified microparticles could be feasible platforms for the introduction of other analytical functions of interest in single cell monitoring and cell sorting in automatic analysis systems.

Keywords: microparticles, polysilicon, chemical functionalization, covalent attachment, single cell, plasma membrane.

### 1. Introduction

Over the last few years, there has been an increasing interest in cell tracking to evaluate single cell behavior in any situation and for both *in vivo* and *in vitro* conditions (Weibel et al., 2007). For this purpose, cells must be isolated and monitored continuously. However, cells need to be grouped to grow adequately and, consequently, monitoring single cells in culture is rather cumbersome and requires the use of expensive or complex equipment (Li et al., 2008). In this context, a more suitable option would be to encode the cells individually and unmistakably using

barcodes. Such barcodes should be small enough to either be placed into the cytoplasm of the cell or to be attached to the outer surface of the plasma membrane without altering the cell viability. Besides, the data storage capacity of the barcodes should be as large as possible in order to be able to encode the maximum number of different cells in the same culture.

Our group has previously demonstrated that macrophage cells could be individually tagged and easily tracked under an optical microscope by using barcodes made of



polysilicon biocompatible material (Fernandez-Rosas et al., 2009; 2010). Macrophages are cells with the ability to engulf foreign bodies such as bacteria and cell debris and incorporate them in phagocytic vesicles for their destruction. In this context, macrophages were able to phagocyte barcodes and their viability was not affected. This tagging process was shown to be effective for tracking macrophages in culture for several days. However, few mammalian cell lines exhibit phagocytic capacity.

A more generic approach for tagging cells using barcodes, with the potential of being applied to any cell line, could be based on the attachment of such particles to the plasma membrane. For this purpose and as an example, particles could be coated with a lectin such as the wheat germ agglutinin (WGA). WGA selectively interacts with N-acetylglucosamine and N-acetylneuraminic acid (sialic acid), which are part of glycoproteins and glycolipids present at the plasma membrane (Nagata et al., 1974). The resulting modified particles could be attached to the plasma membrane of any cell type and thus cells could be tracked over a period of time. This approach would also enable to tag different cells in a culture with different barcodes coated with different ligands, e.g. antibodies, which selectively interact with the plasma membrane of target cells.

The use of shape-encoded microparticles that can be read under a brightfield microscope could represent a cost-effective and highly attractive approach to track individual cells over time. For this purpose, barcodes must contain features (bits) bigger than the practical resolution limit of 1 $\mu$ m. In this context, silicon microtechnologies used for the fabrication of microelectromechanical systems (MEMS) offer a reproducible and accurate method to mass-produce complex particles with dimensions in the micrometer range and a well-defined shape and width (Fernandez-Rosas et al., 2009, 2010). Microfabricated barcodes of biocompatible materials may offer unique possibilities to identify a sufficient number of individual cells in order to perform biological studies.

The development of efficient immobilisation strategies that preserve the structural and

functional integrity of the proteins on surfaces is still a key challenge for surface scientists (Shirahata et al., 2008). Furthermore, the extraordinary broad spectrum of protein functions and, in the case of antibodies, their specific recognition ability to distinguish among similar ligands, makes them very attractive functional elements to directly select specific cells, as well as to construct biochemical sensors and actuators (Luppa et al., 2001). Immobilisation of proteins can be easily accomplished by direct adsorption, but there is a large variety of chemical protocols, which are more robust and better controlled (Rusmini et al., 2007). However, the development of protocols for the attachment of proteins to solid supports for particular applications is an empiric process that cannot be anticipated due to the many different experimental conditions that may affect the protein stability and alter its physicochemical properties (You et al., 2009).

A comparative study of the functionalization of polysilicon microparticles using two different approaches is reported in this work. Particles were modified by adsorption and covalent attachment with either a WGA or a generic immunoglobulin G (IgG), both labelled with a fluorophore organic molecule. The WGA lectin would enable the attachment of the particles to any cell type whereas the IgG would be representative of an antibody to a specific membrane receptor in a selected cell type, taking into account that all antibodies share the same basic structure. Fluorescence studies were carried out to assess the efficiency of the immobilisation of the ligand to the particle surface and ligand retention on the particle surface over time under cell culture conditions. Finally, it is shown that barcodes functionalised with WGA indeed adhere to the plasma membrane of non-phagocytic Vero cells without causing any apparent alteration in the cell viability. Individual tagged cells could thus be tracked for one week. As pointed above, the fact that the modified barcodes are effectively attached to the outer surface of the cell plasma membrane makes this protocol of more widespread application and with the potential of being generic for any cell line just by choosing the appropriate ligand.

## 2. Experimental

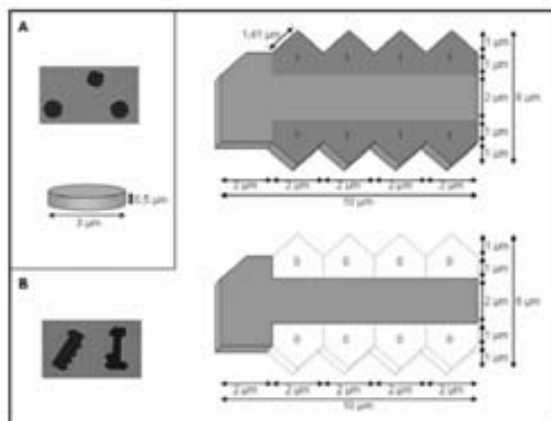
### 2.1. Chemicals

Alexa Fluor 488 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG conjugate (A11017, Invitrogen) and Wheat Germ Agglutinin (WGA) Texas Red<sup>®</sup>-X conjugate (W21405, Invitrogen) were selected as ligands. Triethoxysilylundecanal (TESUD, SIT8194.0) was purchased from Gelest. All other chemicals were of reagent grade.

### 2.2. Design and fabrication of polysilicon barcodes & non-encoded microparticles

Polysilicon material was used for the manufacturing of barcodes (10 $\mu$ m x 6 $\mu$ m x 0.5 $\mu$ m; surface area from 61 to 111  $\mu$ m<sup>2</sup>; 88  $\mu$ m<sup>2</sup> mean surface area) and non-encoded cylindrical microparticles (3  $\mu$ m diameter x 0.5  $\mu$ m thickness; 18.85  $\mu$ m<sup>2</sup> surface area) (Fig. 1). The design of the barcodes has been





**Fig. 1** Brightfield microscope images and schemes showing dimensions of the polysilicon microparticles, **A)** non-encoded microparticles and **B)** barcodes.

described previously by Fernandez-Rosas et al. (Fernandez-Rosas et al., 2009). Briefly, they are polyhedral microparticles containing pentagonal alphanumeric digits (bits), arranged on a 2D optical grid pattern that enables their unambiguous identification. The matrix contains a total of 8 bits (1 or 0) in a regular 4 x 2 grid with a start marker to help the user read the code in its correct orientation. Its data capacity is 256 different barcodes from 0 (0000 0000) to 255 (1111 1111), and dimensions were fixed to 10 μm x 6 μm x 0.5 μm thickness (Fig. 1).

The microfabrication process was based on the technology used for MEMS fabrication (Fernandez-Rosas et al., 2009). Briefly, 4-in. p-type (100) silicon wafers were used as substrate for the fabrication of the microparticles. A plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) silicon oxide layer was deposited on the front side of the wafer to be used as a sacrificial layer, followed by the deposition of a 0.5 μm-thick polysilicon layer by low pressure chemical vapor deposition (LPCVD). Then, the microparticles were patterned by a photolithographic process followed by a dry etching step carried out with an inductively coupled plasma etcher (ICP, Alcatel A601) and using an optimized Bosch process recipe. Next, the photoresist was removed by plasma etching. Finally the microparticles were released by the etching of the silicon oxide sacrificial layer in HF (49%) vapors for 40 min and collected in ethanol by applying ultrasounds for 5 min.

### 2.3. Chemical functionalization of barcodes and non-encoded microparticles

Two strategies of functionalization were used, that is adsorption and covalent attachment. 525,000 barcodes and 1,750,000 non-encoded microparticles, both exposing a total surface area of 45x10<sup>6</sup> μm<sup>2</sup>, which had been stored in ethanol, were used in both approaches.

Adsorption was carried out following the procedure patented by Gustafson et al. (Gustafson et al., 1987), with slight variations. Briefly, ethanol was removed and particles were suspended in 20 μL of 0.01 M Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 containing 0.1% sodium azide, sonicated for 15 min, and incubated overnight under agitation at room temperature (RT) after adding 200 μg/mL of the ligand (WGA or IgG). Then, microparticles were centrifuged at 14,000 rpm and 4°C for 15 min and rinsed three times with PBS containing 2.5% sucrose, 0.25% BSA and 0.05% sodium azide. Finally, microparticles were resuspended in 50 μL of PBS.

Covalent attachment of the selected ligands was carried out as follows. Microparticles were suspended in 200 μL of H<sub>2</sub>O deionized (DI) water and spun for 5 min at 2,000 rpm. Then, they were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min, resuspended in 200 μL of an acid piranha solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70:30 v/v; caution: it is highly corrosive and a powerful oxidising agent) and sonicated for 1 h at RT. After another centrifugation step at 14,000 rpm for 15 min, they were resuspended in 200 μL of a diluted basic piranha solution (NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O, 1:1:5 v/v:v) and sonicated for 30 min at RT. At this point, microparticles could be stored in DI water until further use. After a rinsing step in DI water, a silanization process of the particle surface was carried out. Here, microparticles were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min, resuspended in 200 μL ethanol, and centrifuged again at 14,000 rpm for 5 min; then ethanol was removed and the microparticles were sonicated for 2 h at RT in 100 μL of an ethanolic solution containing 5% (v/v) TESUD and 5% (v/v) 0.1 M acetate buffer pH = 5.2 (Kang et al., 2005; Shirahata et al., 2008). Next, microparticles were rinsed twice in 200 μL dry ethanol and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. The microparticles were dried in an oven at 90°C for 1 h to get a complete dehydration of their surface and thus induce the formation of stable siloxane bonds. Next, the covalent attachment of the ligand (WGA or IgG) was carried out. The silanized microparticles were resuspended in 15 μL PBS containing 5 mM sodium cyanoborohydride and sonicated, followed by the rapid addition of 5 μL of the ligand containing solution to obtain a final concentration of 200 μg/mL. Then the microparticles were incubated overnight at 4°C, under gentle stirring. Next, the microparticles were centrifuged at 14,000 rpm and 4°C for 15 min and then rinsed three times. The first rinsing step was carried out in 200 μL PBS containing 1% BSA (w/v). The following rinsing steps were carried out in 200 μL PBS. Finally, the microparticles were resuspended in 50 μL of PBS.



#### 2.4. Assessment of immobilisation efficiency and stability

To compare both adsorption and covalent functionalization processes, barcodes and non-encoded microparticles modified with IgG and WGA fluorescent conjugates were maintained for 0, 2, 4 and 8 days under standard cell culture conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (MEM-FBS, all from Gibco). Bright-field and fluorescence images were captured using a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM, TCS SP2 AOBs) with LASAF Lite 1.8.1 software (Leica), adjusting the capture conditions and the laser power (488 nm for IgG-modified microparticles and 561 nm for WGA-modified ones), in order to observe the maximum light intensity range but avoiding saturation of the images. The extent of biomolecule immobilisation and its stability was evaluated by carrying out a thorough analysis of those images with the MetaMorph 5.1 software (Molecular Devices). Images of different microparticles (number between 27 and 37) arbitrarily selected were analyzed for every condition tested. The efficiency of each functionalisation protocol was evaluated as the percentage of microparticles showing an average of fluorescence light intensity higher than a 5% (value of 12.8 in arbitrary units) of the maximum (256 arbitrary units). Microparticles showing an average fluorescence light intensity lower than 5% of the maximum observed were considered not efficiently modified and discarded for further analysis. The mean fluorescence light intensities of the efficiently modified microparticles were then compared with the Mann-Whitney test.

#### 2.5. Cytotoxicity assay

Vero cells (CCL-81, ATCC) were cultured in MEM-FBS at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. To study the cytotoxicity of the WGA-modified barcodes, cells were seeded in 24-well dishes with 1 ml of culture medium at a density of 5,000 cells/well, and cultured under the standard conditions mentioned above. The cell to barcode ratio was adjusted to 1:1 in order to get a maximum number of cells labelled with a barcode. Cultures were maintained for 10 days. Cell death was evaluated every 24 h with tripan blue and the mean generation time (MGT) was calculated as  $T/3.32 (\log N - \log N_0)$ , where  $T$  is the total culture time in hours, and  $N_0$  and  $N$  the initial and final cell densities, respectively.

#### 2.6. Individual cell tracking

Glass gridded coverslips were placed inside 24-well dishes and sterilized under an UV light

for 45 min. Then, Vero cells were plated over the coverslips at a density of 5,000 cells/well, together with 5,000 WGA functionalized barcodes/well and cultured in MEM-FBS as above. The cultures were maintained for 7 days. After 24 h, the culture medium was replaced by fresh culture medium in order to remove those barcodes not attached to any cell. Some cells with one barcode were located and identified using the optical inverted microscope and daily followed during one week. Images were taken every 24 h and cell location was recorded. Reticulated coverslips were used to re-localize and trace individual cell trajectories. Finally, cultures were fixed in Karnovsky's solution (2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde) at RT, dehydrated in ethanol series, critical point-dried using CO<sub>2</sub> (K850 critical point drier Emitech), mounted on the specimen holder, coated with gold and observed in a Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL JSM-6300), equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (Link ISIS-200, Oxford).

### 3. Results and discussion

Polysilicon has previously been shown by our group to be a suitable material for the manufacturing of microparticles (Fernandez-Rosas et al., 2010). The controlled deposition of layers of this material, having thicknesses from just a few nanometers to several micrometers, has been commonly carried out in the fabrication of MEMS. Using microfabrication technologies, polysilicon layers can be patterned with micrometric and submicrometric dimensions by dry-etching techniques and photolithographic processes. Polysilicon has been applied to the development of BioMEMS. Its surface has been modified with different polymers and biomolecules (Lan et al., 2005; Jonkheijm et al., 2008; Shirahata et al., 2008; Stegmaier and del Campo, 2009) and has exhibited a good biocompatibility in long-term studies (Veiseh and Zhang, 2006). In the present work, the modification of polysilicon microparticles, having different shapes and sizes, required the implementation of particular processes, which differed from those previously reported with polysilicon substrates and spherical silica micro- and nanoparticles (Sharma and Gilchrist, 2007). Brightfield images of polysilicon barcodes and non-encoded microparticles used in this work are shown in Fig. 1.

Two different protocols for the modification of polysilicon microparticles were applied, that is adsorption and covalent-based approaches. Both of them were tested in terms of its effectiveness for the immobilisation of the ligands as well as the stability of the resulting immobilised molecules



over time under cell culture conditions. The WGA lectin and a secondary anti-mouse IgG both conjugated to Texas Red and Alexa Fluor 488 fluorophores, respectively, were chosen for the modification of the microparticles. The former was tested due to its ability to interact with carbohydrate moieties present in almost any cell plasma membrane whereas the latter represents the antibody family, a group of proteins sharing the same basic structure but with the ability to recognize different specific target molecules. The use of fluorophore labels enabled to make a quantitative estimation of the degree of biofunctionalization of the microparticles using a CLSM.

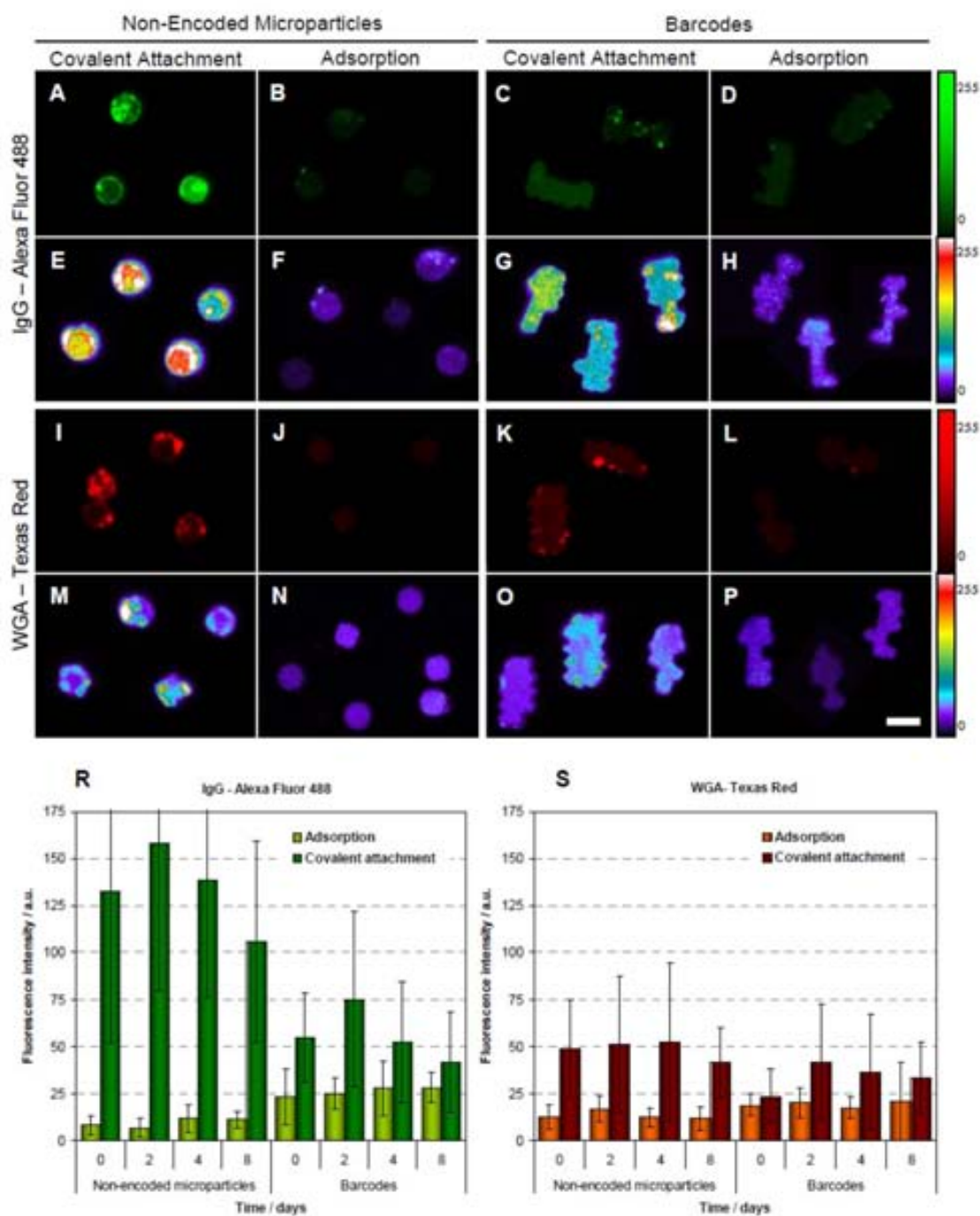
The first step of microparticle functionalization is the generation of reactive groups on the silicon surface. Non-oxidized silicon surfaces have been chemically modified using different protocols, most of them involving UV or thermal based radical reactions (Shirahata et al., 2007). These protocols are difficult to implement when working with microparticles and, besides, a limited number of chemical groups can be added to the silicon surface. Taking advantage of the native silicon oxide layer that spontaneously grows on the silicon surface at room conditions, more widespread silanization processes of this silicon oxide layer were previously reported (Veisoh and Zhang, 2006; Janssen et al., 2006). In this work, the induced growth of silicon oxide on the surface of the polysilicon microparticles was carried out by treating them with an acid piranha solution. The following incubation in a diluted basic piranha solution appeared to activate the silanol groups present at the silicon oxide layer (Janssen et al., 2006). Three different silanes were tested for the covalent attachment of the ligand to the silicon oxide layer (see supplementary information) and TESUD was chosen in terms of efficiency of the ligand immobilisation and simplicity of the silanization protocol. Using this silane, primary amines of the ligand react with the aldehyde groups to form an imine group, which is further transformed into a more stable secondary amine by selectively reducing the double carbon nitrogen bond with sodium cyanoborohydride (Miller and Roby, 1983). It is important to point out that the chemical modification of microparticles is not straightforward since undesirable agglomeration and sedimentation may easily take place under different experimental conditions and give rise to a poor functionalization efficiency and thus to a low yield of functionalized microparticles. Moreover, the shape and material of these microparticles should be taken into account. Cylindrical and polyhedron-like microparticles have flat surfaces which can interact, leading to the aggregation and precipitation of

microparticles and difficulting their modification. By contrast, spherical microparticles expose a much smaller area to interact with other microparticles. Therefore, all the steps required for the attachment of the ligands to our microparticles were carefully tested and optimized so that a good efficiency of the immobilisation process could be attained. In particular, sonication steps applied for various periods of time, as described in the Experimental section, appeared to be effective in minimizing particle aggregation during the functionalization process.

In order to ensure that the polysilicon surface of the microparticles could be oxidized and further silanized, a test to evaluate the extent of silane functionalization was carried out with (3-aminopropyl)trimethoxysilane and rhodamine B isothiocyanate, as described elsewhere (Kang et al., 2005) (description of this experiment and fluorescence images of the modified surfaces are shown in the supplementary information). This assay evidenced the correct silanization of the polysilicon particle surface (Fig. S2).

Next, the efficiency and stability of the chemical surface modification was tested in 27-37 particles selected from different batches of barcodes and non-encoded microparticles, so that possible size and shape effects could be detected. Fluorescence intensities were measured in both types of microparticles (barcodes or non-encoded microparticles), for each modification process (adsorption and covalent attachment), protein conjugates (IgG-Alexa Fluor 488 or WGA-Texas Red) and time in culture (0, 2, 4 or 8 days) (Fig. 2A-P).

Non-encoded microparticles showed significant differences in the efficiency of both modification processes. The yield was quite low for the adsorption approach, and only between 15-35 % and between 35-60 % of the non-encoded microparticles were modified with IgG and WGA, respectively. As for the covalent modification, between 80-100 % of the non-encoded microparticles were modified with both IgG and WGA ligands. However, when working with barcodes, none of the modification protocols was clearly superior to the other and between 70-97% of them were efficiently modified by either adsorption or covalent immobilisation with both IgG and WGA ligands. After selecting only the efficiently modified particles, following the criterion defined in the experimental section, the covalent attachment of the selected ligand resulted in significantly higher intensities than those measured when the ligand was adsorbed, indicating a better particle coverage for both non-encoded microparticles and barcodes modified with either WGA (Fig. 2R, time 0) or IgG (Fig. 2S, time 0). The lower efficiency of

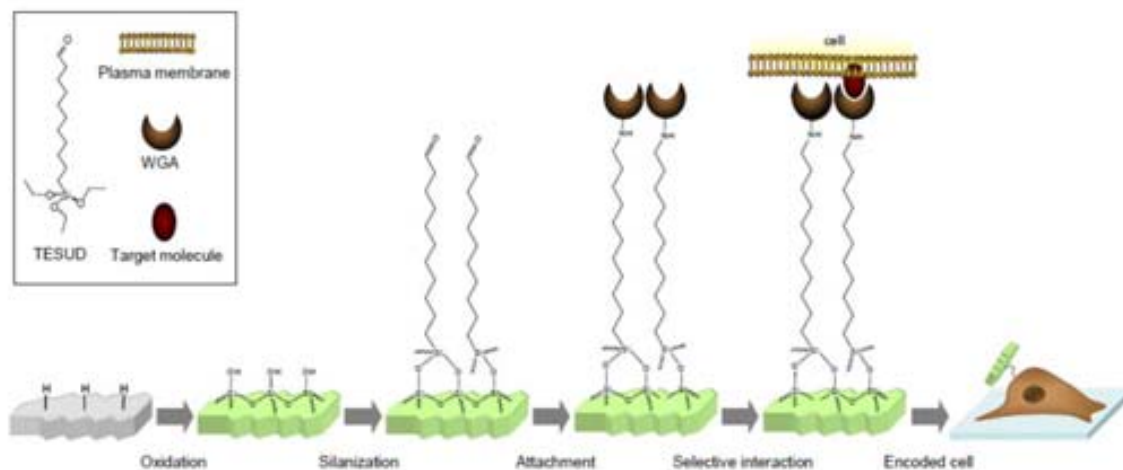


**Fig. 2** CLSM images of non-encoded microparticles (**A, B, I, J**) and barcodes (**C, D, K, L**) modified by adsorption (**B, J, D, L**) and covalent attachment (**A, C, I, K**) with IgG antibody Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugate (green emission) and WGA Texas Red<sup>®</sup>-X conjugate (red emission). Capture conditions were adjusted in order to avoid saturated images [255, arbitrary units]. Pseudo-colored images (**E-H, M-P**) were made to facilitate the comparison of the fluorescence intensities of the microparticles. **R**) and **S**) Plots showing the mean fluorescence intensity of the modified microparticles versus time (0-8 days). The number of particles analyzed was  $\geq 30$ . Error bars correspond to the standard deviation of the intensity of those particles. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ .

adsorption in non-encoded microparticles may be explained by their higher tendency to aggregate during the modification process. Non-encoded microparticles form large aggregates that may hinder the access of the ligand to the surface of particles located inside the aggregates. This was not observed for barcodes. The covalent attachment process includes several sonication steps that would prevent the non-encoded microparticle aggregation.

Regarding the stability of the modified microparticles during the 8-day period studied, no significant differences were found for the intensity values recorded during the time frame that every condition was analysed (Fig. 2R-S). It is interesting to remark that the highest intensities were obtained with the non-encoded microparticles modified by covalent attachment of the ligand. This may be related to all non-encoded microparticles exhibiting





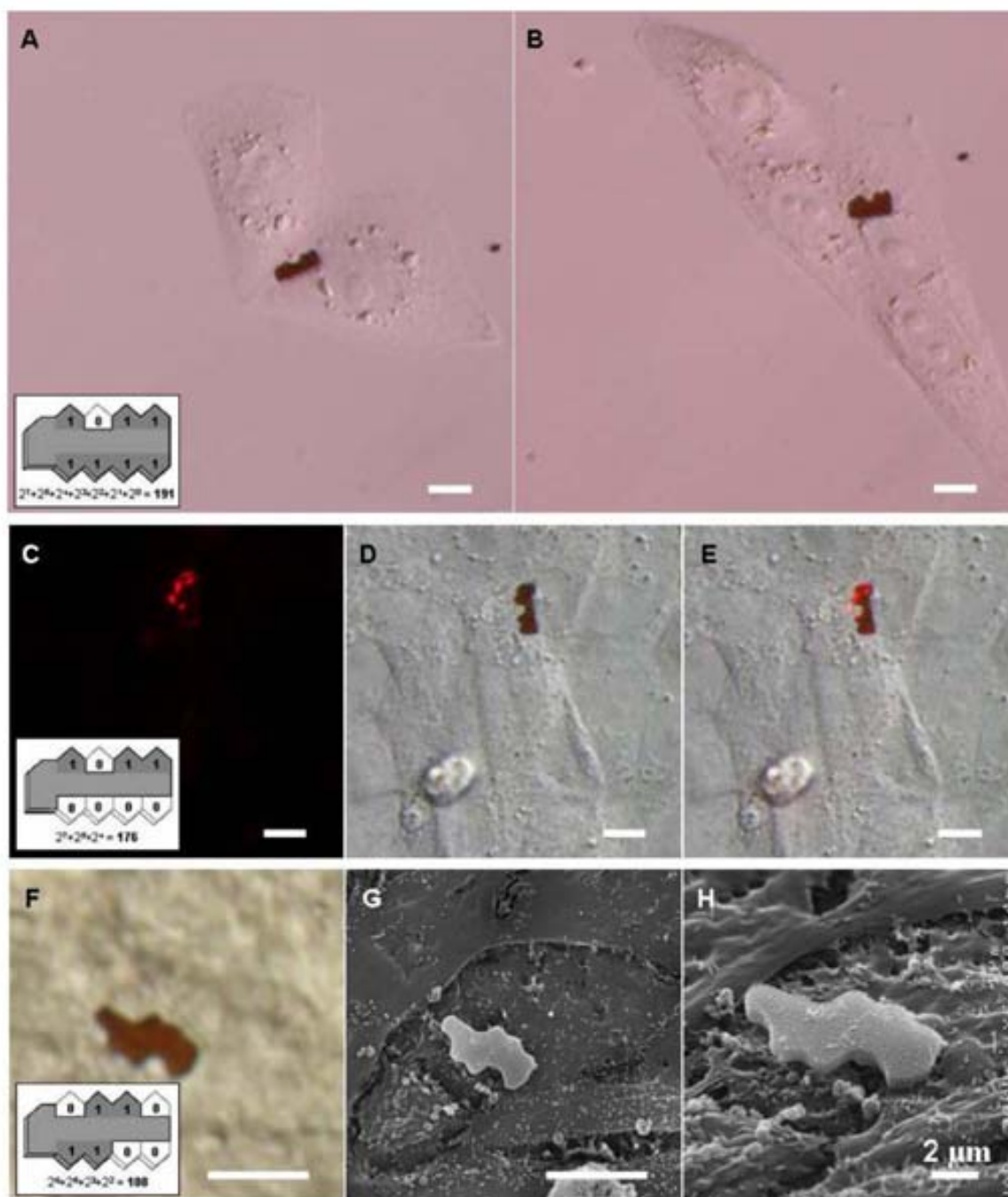
**Scheme 1.** Polysilicon barcode surface modification steps and selective interaction with the cell plasma membrane.

the same shape, a more uniform size and smaller dimensions compared with the barcodes. The differences observed between WGA and IgG functionalization could be attributed to their inherent emission pattern. It is well reported that the Alexa Fluor® family (Invitrogen) show superior photostability and can be conjugated to proteins without significant self-quenching, which results in brighter conjugates and in general better performance than others using more conventional fluorophores such as Texas Red. Porous silicon and polysilicon materials have previously been demonstrated to be biocompatible in extracellular (Tasciotti et al., 2008) and intracellular (Fernández-Rosas et al., 2009, 2010) applications, respectively. On the other hand, WGA appears to cause very low toxicity effects (Wright, 1984) at the usual working concentrations (1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), for incubation times up to 48 h (Heinrich et al., 2005). In the present work a maximum theoretical amount of 40 ng/mL WGA attached to the barcodes was used, which is several orders of magnitude lower than the maximum recommended. Therefore, any possible toxic effects of the modified barcodes may arise from the functionalization process. To discard this possibility, a test study was carried out in Vero cultures for 10 days with 5,000 cells and 5,000 WGA-modified barcodes/well. The estimated cell density was plotted against time and the resulting graph is shown in Fig. S3 (supplementary information). No significant differences were found in MGT values between the cultures with the WGA-modified barcodes (76.65 h) and the controls (72.57 h). Finally, in order to prove the correct modification of microparticles, WGA-modified barcodes were used to track individual cells. The main steps of the barcode modification process described above and its interaction with the cell are shown in Scheme 1. To facilitate the localization of targeted cells on the last day of an exponentially growing

culture, cells were plated on gridded glass coverslips. A total of 44 cells with only one barcode attached to their plasma membrane were selected and they were individually tracked and photographed every 24 h during 7 days. Fig. 3A-B shows two cells, one labelled with the modified barcode 191 (1011 1111), which divided 24 h later. Tracked surviving cells were observed under a fluorescence microscope only on the last day of culture and detection of fluorescence on day 7 (Fig. 3C and 3E) demonstrates the stability of the barcode modification process. To further confirm the robustness of the barcode attachment to the cell membrane, cells were treated the last day to be observed with a SEM. As cultures were nearly confluent, a SEM equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer was used to allow the visualization of the grid pattern in the coverslip and facilitate the localization of the cells. An example is shown in Fig. 3F-H, in which a barcode is still firmly attached to the cell surface even after the processing for SEM.

#### 4. Conclusions

To summarize, polysilicon barcodes were fabricated and modified with a ligand (WGA or IgG) with the aim of attaching them to the outer surface of the plasma membrane. Polysilicon is a biocompatible material highly suitable for the fabrication of microparticles. Up to 256 different types of encoded polysilicon microparticles were fabricated using microfabrication technologies and modified with two different fluorescent protein conjugates by adsorption and covalent attachment. A comparative study carried out with both modification strategies clearly evidenced that covalent attachment gave rise to a more robust and efficient immobilisation of the conjugates to the microparticle surface. Having not observed cytotoxic effects of the



**Fig. 3** Examples of encoded cells individually tracked. **A)** Two cells, one labelled with the modified barcode 191 (1011 1111), which divided 24 h later (image **B**). Cell labelled with code number 176 (1011 0000) tracked for seven days and observed on the last day of culture under a fluorescence microscope (**C**) and a brightfield (**D**) microscope. **E**) Merged image of **C** and **D**. Images **F-H** show the barcode 108 (0110 1100) firmly attached to a cell observed under brightfield (**F**) and SEM (**G-H**) microscopes. Scale bar = 10  $\mu$ m unless otherwise indicated.

WGA-modified barcodes, individual Vero cells in culture, labelled with a single barcode, were successfully tracked for up to seven days. The modification of barcodes with specific ligands following the protocol described here could be of general use for labelling cells coming from different cell lines and thus be monitored individually or be used for cell sorting using an appropriate fluidic platform.

### Acknowledgements

This study was financed by the Spanish government through the MINAHE 3 project MEC- TEC2008-06883-C03-01 and TEC2008-06883-C03-03. We also wish to thank the IMB-CNM clean room staff and the Servei de Microscòpia of the Universitat Autònoma de Barcelona.

### Appendix A. Supplementary data

Electronic Supplementary Information (ESI) available: Surface functionalization of polysilicon microparticles with different silanes, assessment of surface silanization of polysilicon substrates and cytotoxicity analysis in Vero cell cultures containing WGA-modified barcodes.

## References

- Fernandez-Rosas, E., Gómez, R., Ibañez, E., Barrios, L., Duch, M., Esteve, J., Nogués, C., Plaza, J.A. **2009**. *Small* 5, 2433-2439.
- Fernandez-Rosas, E., Gómez, R., Ibañez, E., Barrios, L., Duch, M., Esteve, J., Plaza, J.A., Nogués, C. **2010**. *Biomed. Microdevices* 12, 371-379.
- Gustafson, E. K., Trebino, R., Lee, J. **1987**. U. S. Patent, 4886761.
- Heinrich, E.L., Welty, L.A., Banner, L.R., Oppenheimer, S.B., 2005. *Acta Histochem.* 107, 335-344.
- Janssen, D., De Palma, R., Verlaak, S., Heremans, P., Dehaen, W. **2006**. *Thin Solid Films* 515, 1433-1438.
- Jonkheljm, P., Weinrich, D., Schröder, H., Niemeyer, C. M., Waldmann, H. **2008**. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* 47, 9618-9647.
- Kang, M., Trofin, L., Mota, M.O., Martin, C.R. **2005**. *Anal. Chem.* 77, 6243-6249.
- Lan, S., Velseh, M., Zhang, M., **2005**. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1697-1708.
- Li, K., Miller, E.D., Chen, M., Kanade, T., Weiss, L.E., Campbell, P.G. **2008**. *Med. Image. Anal.* 12, 546-566.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. **2001**. *Clin. Chim. Acta* 314, 1-26.
- Miller, A.W., Roby, J.F. **1983**. *Biotech. Bioengineer.* 25, 2795-2800.
- Nagata, Y., Burguer, M.M. **1974**. *J. Biol. Chem.* 249, 3116-3122.
- Rusmini, F., Zhong, Z., Feljen, J. **2007**. *Blomacromol.* 8, 1775-1789.
- Sharma, M.K., Gilchrist, M.L. **2007**. *Langmuir* 23, 7101-7112.
- Shirahata, N., Hozumi, A., Yonezawa, T. **2005**. *Chem. Rec.* 5, 145-159.
- Shirahata, N., Nakanishi, J., Echikawa, Y., Hozumi, A., Masuda, Y., Ito, S., Sakka, Y. **2008**. *Adv. Funct. Mater.* 18, 3049-3055.
- Stegmaler, P., del Campo, A. **2009**. *Chemphyschem.* 10, 357-369.
- Tasciotti, E., Liu, X., Bhavane, R., Plant, K., Leonard, A.D., Price, B.K., Cheng, M.M., Decuzzi, P., Tour, J.M., Robertson, F., Ferrari, M. **2008**. *Nat. Nanotechnol.* 3, 151-157.
- Velseh, M., Zhang, M. **2006**. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1197-1203.
- Welbel, D.B., Diluzio, W.R., Whitesides, G.M. **2007**. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 209 - 218.
- Wright, C.S. **1984**. *J. Mol. Biol.* 178, 91-104.
- You, C., Bhagawati, M., Brecht, A., Plehler, J. **2009**. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1563 - 1570.



# Chemical functionalization of polysilicon microparticles for single cell studies

Elisabet Fernández-Rosas <sup>a,b</sup>, Antoni Baldi <sup>a</sup>, Elena Ibañez <sup>b</sup>, Leonardo Barrios <sup>b</sup>, Sergi Novo <sup>b</sup>, Jaume Esteve <sup>a</sup>, José A. Plaza <sup>a</sup>, Marta Duch <sup>a</sup>, Rodrigo Gómez <sup>a</sup>, Onofre Castells <sup>c</sup>, Carme Nogués <sup>b,\*</sup>, César Fernández-Sánchez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC). Campus UAB, 08193-Bellaterra, Barcelona (Spain).*

<sup>b</sup> *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona (Spain).*

<sup>c</sup> *Servei de Microscòpia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona (Spain).*

Corresponding authors: [carme.nogues@uab.cat](mailto:carme.nogues@uab.cat); [cesar.fernandez@imb-cnm.csic.es](mailto:cesar.fernandez@imb-cnm.csic.es)

Phone number: +34935947700; fax number: +34935801496

## 1. Surface functionalization of polysilicon microparticles with different silanes

In addition to TESUD, two other functional silane molecules were assessed for the covalent immobilisation of the selected ligands. These were (3-glycididloxypropyl) trimethoxysilane (GPTMOS, 440167) and (3-aminopropyl) trimethoxysilane (APTAMOS, 281778), both from Sigma-Aldrich. The structure of both silanes is shown in Fig. S1.

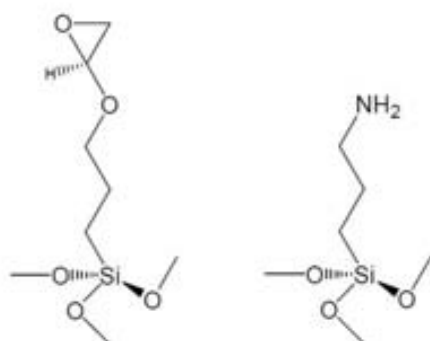


Fig. S1. Chemical structure of GPTMOS & APTAMOS

Following the particle pre-conditioning steps described in the main text, particles were incubated in a solution of the respective silane. GPTMOS modification was carried out in a solution prepared with anhydrous ethanol containing 5 % silane. Anhydrous ethanol was obtained by adding beads of

Molecular Siever 4Å (Mallinckrodt Baker B.V., The Netherlands) to 99.5 % pure ethanol and left it in contact for at least 24 h before using. The use of anhydrous ethanol is a key issue when working with GPTMOS since the epoxy ring functional group is unstable in the presence of water and can lead to the ring opening and thus its inactivation. The incubation of the microparticles in the silane solution was carried out for 5 min under sonication and then overnight under gentle agitation. The next steps were carried out as in the TESUD protocol, the only difference being the ligand incubation solution, which was 0.1 M carbonate buffer pH 8 containing 200 µg/mL ligand. GPTMOS readily reacts with the primary amine moieties of the lysine residues of the ligand structure giving rise to a stable hydroxylamine. This strategy appeared not to be very efficient in terms of the amount of ligand conjugate attached to the particle surface, thus resulting in a light fluorescence intensity of the modified particles. As pointed out above, this was likely related to the instability of the epoxy ring of the silane, even though special care was taken to carry out the silanization process in the absence of water.

APTAMOS modification was carried out by incubating the pre-conditioned particles in a solution prepared with anhydrous ethanol containing 5 % silane for 1 h under gentle agitation. Following the same rinsing and

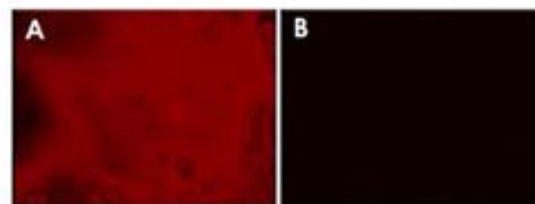


drying steps as in the TESUD protocol, the microparticles were incubated in a 0.1 M carbonate buffer solution pH 8 containing 2.5 % glutaraldehyde (Sigma- Aldrich) for 1 h and rinsed three times in carbonate buffer. The last incubation step was carried out in a solution containing 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ligand solution and 50 mM sodium cyanoborohydride prepared in the carbonate buffer, overnight at 4 °C and under gentle stirring. Finally, the microparticles were rinsed and suspended as described in the TESUD protocol. APTMOS interaction with the ligand requires the use of glutaraldehyde homobifunctional crosslinker, whose aldehyde end groups react with primary amines of both the silane organic moiety and the lysine residues of the ligand. Two imine groups are formed that can be selectively reduced with cyanoborohydride to form stable secondary amine groups. Here, the particle modification appeared to be unsuccessful due to the formation of a kind of gel around the particles that induced their aggregation and consequent sedimentation. This undesirable process could not be controlled. Glutaraldehyde is highly reactive and may cross-link APTMOS molecules from different particles, thus giving rise to the appearance of the gel-like structure.

## 2. Assessment of surface silanization of polysilicon substrates.

The efficiency of the silanization process upon the pre-conditioning treatment in the piranha solutions was tested by adapting the protocol described in Kang et al., 2005. Briefly, pre-conditioned polysilicon substrates (1x1 cm<sup>2</sup>) were incubated in an ethanolic solution containing 5% (v/v) APTMOS and 5% (v/v) acetate buffer (0.1M, pH = 5.2), for 2 h at RT. After two rinsing steps in fresh ethanol, the substrates were cured at 120 °C for 20 min. Then, they were incubated in a 20 mM Rhodamine B isothiocyanate fluorescent dye (Sigma-Aldrich) in dimethylformamide overnight at RT. The substrates were rinsed in dimethylformamide, chloroform and ethanol under sonication and finally dried under a nitrogen stream. Control samples were prepared in the same fashion as above but skipping the silanization step with APTMOS. Rhodamine B isothiocyanate readily reacts with the primary amine groups of the APTMOS-modified polysilicon substrate to form a stable isothiourea bond but it can not be adsorbed on the non-modified polysilicon substrate. Fluorescent images of sample and control substrates are depicted in Fig. S2, which demonstrates the efficient

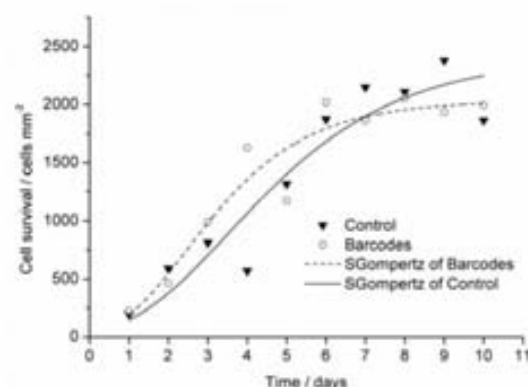
silanization of the polysilicon substrate following the pre-conditioning steps carried out in the piranha solutions.



**Fig. S2.** Fluorescent images of a silanized polysilicon substrate with APTMOS (sample; A) and a non-silanized polysilicon substrate (control; B) upon incubation with Rhodamine B isothiocyanate.

## 3. Cytotoxicity analysis in Vero cell cultures incubated with WGA-modified barcodes.

To analyze the effect of WGA-modified barcodes on Vero cell survival, cell density was evaluated every 24 h during 10 days and compared with the cell density of a control culture without barcodes. As shown in Fig. S3, no significant differences between the two cultures were observed.

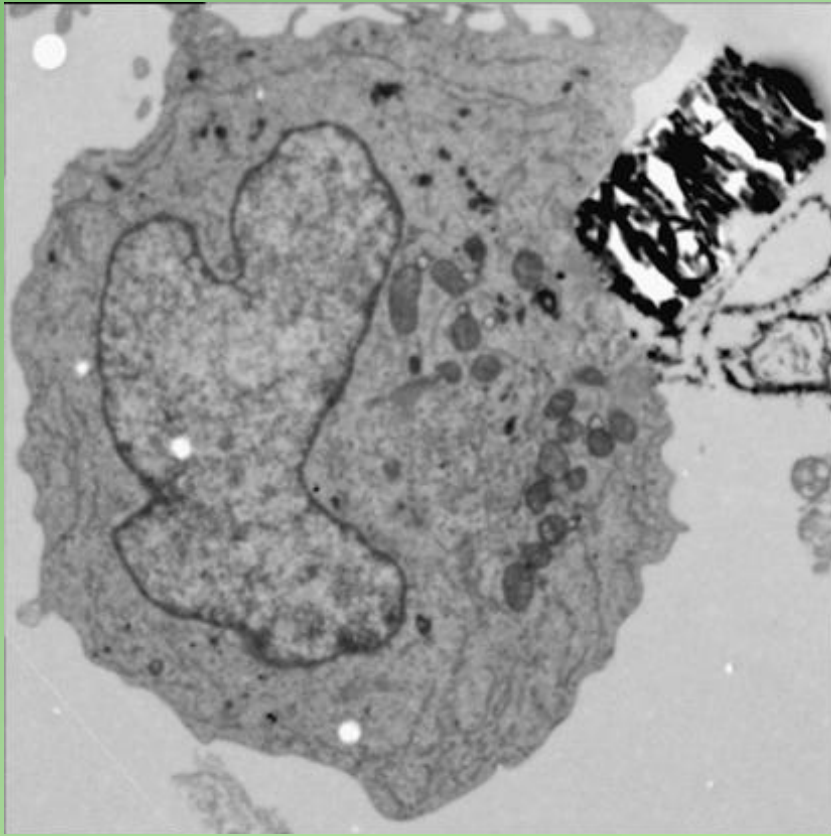


**Fig. S3.** Cell density of Vero cells cultured during 10 days in the presence (○) or absence (▼) of WGA-modified barcodes. Non-linear sigmoidal fitting using the SGompertz model was applied.

## References

Kang, M., Trofin, L., Mota, M.O., Martin, C.R., 2005. *Anal. Chem.* 77, 6243-6249.





## 5. DISCUSIÓN



## 5.1. SELECCIÓN DE MATERIALES Y DISEÑO DE LAS MICROPARTÍCULAS

Para la fabricación de las micropartículas utilizadas en este trabajo se seleccionó el silicio y el polisilicio. Estos materiales son los más indicados para ser utilizados como plataforma para construir un futuro BioMEMS intracelular. Asimismo, trabajos previos de otros grupos habían demostrado que el silicio y el polisilicio son biocompatibles en condiciones extracelulares (Choi *et al.* 2009; FitzGerald *et al.* 2009).

La robustez y versatilidad del silicio, difícilmente alcanzables con otros materiales (Holt 1978), han hecho posible el desarrollo de transistores y circuitos integrados, los dispositivos electrónicos miniaturizados más abundantes. Aparte de su indiscutible supremacía para la fabricación de circuitos integrados, el silicio también es uno de los materiales más utilizados para la fabricación de MEMS y BioMEMS (sensores y actuadores). Tanto en su forma cristalina como policristalina, el silicio es resistente químicamente y relativamente inerte. En la literatura se encuentran varios ejemplos de BioMEMS extracelulares para el estudio de células vivas fabricados en silicio y polisilicio: sensores de cambios en el pH extracelular (revisado por Park y Shuler, 2003), plataformas de *arrays* con microgotas que contienen unas pocas células para estudios citotóxicológicos (Fernandes *et al.* 2009), o microcámaras de cultivo (Fisher *et al.* 2010).

Hasta el momento, un elevado porcentaje de las micro y nanopartículas utilizadas para realizar estudios biológicos o para aplicaciones clínicas tienen forma esférica (revisado por Bendayan 2000; Hiura *et al.* 2010). Esto se debe a que el proceso de síntesis química utilizado para fabricar las partículas es un proceso "*bottom up*", que parte de componentes más pequeños para formar conjuntos más complejos. Exceptuando algunos casos concretos en los que se obtienen formas poliédricas ó de varilla utilizando agentes de dirección del crecimiento (Murphy *et al.* 2005; Chang *et al.* 2010; Stone *et al.* 2011), esta técnica permite controlar el tamaño final de las partículas, pero no su forma.

La forma y dimensiones de las partículas vienen condicionadas por su futura aplicación, por tanto deben cumplir una serie de requisitos tanto biológicos, como de fabricación y uso. Este trabajo propone el uso de técnicas de fabricación típicas de la microelectrónica basada en procesos fotolitográficos. Los procesos mencionados se basan en la tecnología de fabricación "*top down*", mediante la cual se crean partículas micro o nanométricas a partir de estructuras más grandes. La fotolitografía no permite la obtención de unas cantidades de partículas tan elevadas como las que se obtienen por síntesis química, sin embargo tienen de una serie de ventajas para



determinadas aplicaciones. La principal ventaja que ofrece el proceso fotolitográfico es la capacidad de fabricar dispositivos exactamente iguales y con formas totalmente controladas a escala micrométrica e incluso nanométrica. Además, esta técnica permite fabricar dispositivos combinando multitud de materiales y, recientemente, ha empezado a ser utilizada como alternativa para sintetizar partículas poliméricas (Nicewarner-Peña *et al.* 2001; revisado por Canelas *et al.* 2009). Todas estas ventajas abren la posibilidad de diseñar futuros microsistemas que puedan ser introducidos en células vivas.

Las micropartículas de este trabajo se diseñaron de forma que sus dimensiones fueran lo más reducidas posibles para no interferir en el funcionamiento o la actividad de las células, pero lo suficientemente grandes como para poder albergar un dispositivo en el futuro. Si-MP y pSi-MP se diseñaron en forma de cilindros planos de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, puesto que era la forma geométrica con el menor número de ángulos posible pero con caras planas suficientemente grandes para la futura implementación de un sensor o actuador. Los códigos, aunque no tenían que albergar un dispositivo, debían tener suficientes combinaciones como para permitir el seguimiento de un número adecuado de células. A la vez, debían ser simples y con unidades de información visibles bajo un microscopio óptico, el más habitual en los laboratorios de biología celular. Por ello se eligieron formas poliédricas de 10  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$ , con unidades de información pentagonales (bits) de  $\geq 1$   $\mu\text{m}$  de lado, ordenadas y fácilmente reconocibles a través del microscopio óptico, para que la identificación de cada código fuese simple, clara y sin posibilidad de errores. Desde el punto de vista de la biología celular y la óptica, las dimensiones de los códigos cumplían los requisitos necesarios para ser introducidos en células vivas y, al mismo tiempo, ser perfectamente identificables en cualquier microscopio óptico.

## 5.2. INTERIORIZACIÓN Y DESTINO INTRACELULAR DE LAS MICROPARTÍCULAS EN MACRÓFAGOS

Una vez diseñados y fabricadas las micropartículas, el siguiente paso era probar que podían ser introducidas dentro de células en cultivo. Para ello se utilizaron Si-MP y pSi-MP. Algunos tipos celulares pueden interiorizar partículas de hasta 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Foged *et al.* 2005), y los macrófagos, uno de los tipos celulares utilizado en este trabajo, llegan a fagocitar partículas y patógenos de hasta 20  $\mu\text{m}$  (Kang *et al.* 2005a), pero no pueden interiorizar todos los materiales con la misma facilidad. De hecho,

como se ha revisado en la introducción, el material, la carga iónica y el tamaño determinan en gran parte la eficiencia y la velocidad de interiorización de las partículas en las células. Es por esta razón que en algunos casos es necesario modificar su superficie para facilitar la interiorización, recubriéndolas con moléculas como proteínas o polímeros específicos (Thiele *et al.* 2001; Faraasen *et al.* 2003; Thiele *et al.* 2003a; Foged *et al.* 2005) que hagan variar sus características fisicoquímicas. Así, por ejemplo, la poli-L-lisina, las IgG ó la hidroxiapatita aumentan la tasa de fagocitosis (Thiele *et al.* 2001; Pedraza *et al.* 2008), el (3-aminopropil)-N-folato facilita la endocitosis mediada por receptor, mientras que el 3-aminopropil ó el guanidipropil promueven la interiorización en vesículas mediadas por caveolas (Slowing *et al.* 2006), y la hialuronidasa ó el poli(L-lisin)g-poli(etilenglicol) inhiben la fagocitosis (Faraasen *et al.* 2003; Thiele *et al.* 2003a).

En este trabajo se ha podido demostrar, mediante la combinación de diversas técnicas de microscopía y la utilización de cubreobjetos de vidrio reticulados y codificados, que los macrófagos humanos son capaces de fagocitar micropartículas fabricadas en silicio y polisilicio sin necesidad de modificar su superficie. Este resultado es acorde con diversos estudios realizados en células dendríticas (Vallhov *et al.* 2007) y HeLa (Slowing *et al.* 2007) con micropartículas de silicio poroso (2,5  $\mu\text{m}$  y 0,3–1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro respectivamente). En estos trabajos, mediante CLSM y/o TEM, se demostraba que estos tipos celulares pueden fagocitar micropartículas fabricadas en materiales con base de silicio. Más recientemente, Choi y colaboradores (2009) incubaron nano y micropartículas de silicio (0,003–3  $\mu\text{m}$ ) con macrófagos murinos, pero no pudieron confirmar la interiorización de las partículas en las células.

Debido a la carga neta negativa de la membrana plasmática, generalmente las partículas con un potencial  $\zeta$  (carga superficial) positivo son endocitadas con más facilidad (tabla 1). Este parámetro también afecta a la vía de interiorización en las células y a la reactividad en el interior celular, pudiendo influir en el efecto citotóxico de las partículas (Verma *et al.* 2008). En nuestro caso, la rápida sedimentación de Si-MP y pSi-MP impidió la medida del potencial  $\zeta$ . Sin embargo, los grupos silanol que conforman la superficie de estas partículas tienen un  $\text{pK}_a \sim 7,1 \pm 0,5$  (Hair y Hertl 1970). A  $\text{pH} \sim 7$ , por lo tanto, aproximadamente la mitad de estos grupos se halla en forma ionizada ( $\text{Si-OH} \leftrightarrow \text{Si-O}^- + \text{H}^+$ ), y el potencial  $\zeta$  debería ser ligeramente negativo. Sin embargo, en soluciones acuosas y a  $\text{pH}$  fisiológico, como por ejemplo en el medio de cultivo, éste grupo hidroxilo desprotonado puede formar puentes de hidrógeno (Nawrocki, 1997) anulando parcialmente las cargas negativas de la superficie de la micropartícula y, por tanto, la actividad fagocítica de los macrófagos debería ser algo mayor a lo que determinaría el potencial  $\zeta$ . Este proceso podría verse favorecido

también por la presencia de moléculas protonadas en el medio de cultivo (sales, proteínas, aminoácidos), que actuarían como agentes caotrópicos, ejerciendo de puentes entre los grupos silanol de las partículas y la membrana plasmática, ambos cargados negativamente. Aunque no son covalentes, este tipo de interacciones pueden ser fuertes, y se utilizan por ejemplo para purificar el DNA con sílice (con grupos silanol en la superficie igual que el silicio). En nuestro caso, estas interacciones entre las Si-MP ó pSi-MP y la membrana plasmática podrían facilitar la actividad fagocítica de los macrófagos sin necesidad de funcionalizar las micropartículas.

Después de demostrar que los macrófagos son capaces de fagocitar las Si-MP y pSi-MP, el siguiente objetivo fue determinar su destino intracelular, es decir, si las micropartículas quedaban retenidas en compartimentos endosomales o lisosomales, ó si quedaban libres en el citoplasma. La retención en un compartimento limitaría su rango de acción e impediría su interacción con el citosol. Las observaciones en el TEM de los macrófagos incubados con pSi-MP indican que la mayor parte de las micropartículas fagocitadas estaban rodeadas por membranas, y sólo en algunos casos no se pudo detectar la presencia de membrana a su alrededor. Ello puede interpretarse de dos formas distintas: a que la micropartícula se encontraba libre en el citosol, o bien a que la orientación de los cortes ultrafinos no permitía visualizar la membrana en estos casos, siendo esta última la interpretación más probable.

En la mayor parte de células en las que las partículas estaban claramente rodeadas por una membrana, la asociación entre ésta y las micropartículas era estrecha. Ocasionalmente, la membrana del compartimento celular era mucho más laxa, generalmente cuando la vesícula contenía más de una micropartícula. Se ha sugerido que cuando la partícula tiene carga positiva queda estrechamente rodeada por la membrana fagosomal, y la maduración del fagosoma queda inhibida (Thiele *et al.* 2003b; de Chastellier y Thilo 2006). En cambio si la membrana queda laxa alrededor de la partícula, generalmente cuando ésta está cargada negativamente, el fagosoma puede madurar y fusionarse con un lisosoma (Thiele *et al.* 2003b). En nuestro caso, la estrecha asociación de las micropartículas con la membrana indicaría que la carga de las partículas es posiblemente positiva y apoyaría la hipótesis sobre la modificación del potencial  $\zeta$  de las partículas gracias a las moléculas protonadas del medio de cultivo. También en este sentido, los estudios de colocalización de las pSi-MP con los compartimentos endosomal y lisosomal revelaron que el porcentaje de micropartículas que colocalizaban con endosomas tempranos incrementaba con el tiempo, mientras que en endosomas tardíos y lisosomas no varió en 24 h. Esto corroboraría que la mayoría de fagosomas que contienen pSi-MP no pueden madurar, probablemente porque estas

partículas están cargadas positivamente, y estaría de acuerdo una vez más con la hipótesis de Thiele y colaboradores (2003b), y de de Chastellier y Thilo (2006).

La retención de las micropartículas en compartimentos celulares podría limitar la utilidad de futuros dispositivos intracelulares. En cualquier proceso de fagocitosis en condiciones fisiológicas, los macrófagos endocitan patógenos y partículas formando endosomas tempranos que maduran a endosomas tardíos y, finalmente, a lisosomas, en las cuales el microorganismo o partícula es degradado (revisado por Pelkmans y Helenius 2002). No obstante, algunos patógenos son capaces de liberarse de la vesícula que forma el endosoma temprano, quedando libres en el citoplasma celular y evitando la degradación (van der Wel *et al.* 2007). Existen estrategias que reproducen este proceso y permiten liberar las micropartículas al citosol. Por ejemplo, el recubrimiento con poliaminas capaces de inducir la ruptura de las membranas endosomales (Thiele *et al.* 2003b), la incubación de las células con cloroquinas (Abes *et al.* 2006), o el incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo para desestabilizar los endosomas y liberar su contenido (Abes *et al.* 2006). En el futuro será necesario adoptar una de las estrategias mencionadas para evitar la retención de los dispositivos fagocitados en compartimentos celulares.

### 5.3. CITOTOXICIDAD DE LAS MICROPARTÍCULAS EN MACRÓFAGOS Y EMBRIONES DE RATÓN

La citotoxicidad es un parámetro ampliamente utilizado para analizar la magnitud del daño que un material o un compuesto puede causar en las células. En este trabajo, el seguimiento de macrófagos individuales durante 10 días y el test de MTT (también 10 días) indicaron que las micropartículas no causan citotoxicidad en la línea celular utilizada. La disminución del número de células a lo largo del tiempo, también observada en los grupos control sin micropartículas, es debida a que los macrófagos son células diferenciadas que no pueden dividirse y que finalmente mueren (Tsuchiya *et al.* 1982). Si bien es cierto que el silicio no se había utilizado anteriormente para aplicaciones intracelulares, sí se han realizado estudios de citotoxicidad con micro y nanopartículas de silicio poroso, el cual se obtiene a partir de la disolución parcial del silicio. El resultado de nuestros análisis coincide con los presentados por otros autores con este material de naturaleza similar, tanto con partículas de tamaño micrométrico en células dendríticas (Vallhov *et al.* 2007), como con partículas nanométricas en células madre mesenquimales humanas (Hsiao *et al.* 2008), células HeLa (Slowing *et al.*

2006 y 2007) ó células epiteliales humanas (Lu *et al.* 2007). Estos trabajos determinaron que las partículas de silicio poroso, capaces de interiorizarse en las células, causaban una baja citotoxicidad, aunque los estudios fueron realizados únicamente durante períodos de 24 ó 48 h. Tanto partículas de silicio monocristalino como de polisilicio y silicio poroso están compuestas por el mismo material, y es lógico que su tasa de interiorización en las células sea parecida. Sin embargo, los agujeros nanométricos del silicio poroso hacen que este tipo de partículas tenga una elevada relación superficie/volumen y, por lo tanto, una superficie reactiva mucho mayor que las partículas de silicio monocristalino o polisilicio de la misma forma y dimensiones. Esta característica podría incrementar la citotoxicidad del silicio poroso, y es necesario tenerla en cuenta al comparar resultados.

En todos los casos parece que el efecto citotóxico de las partículas depende de la superficie total expuesta ó superficie reactiva, que viene determinada por su tamaño y concentración. Este valor es mucho mayor en partículas de tamaño nanométrico, en las que puede ser superior a 1 m<sup>2</sup>/g. La superficie reactiva de nuestras micropartículas no supera en ningún caso los 4·10<sup>-6</sup> m<sup>2</sup>/g. No obstante, en los estudios de citotoxicidad este parámetro raramente es calculado, y lo más habitual es hallar indicada la concentración de partículas en peso/volumen. Choi y colaboradores (2009) analizaron en macrófagos murinos el efecto citotóxico de nanopartículas fotoluminescentes de silicio de 3 nm de diámetro fabricadas por grabado electroquímico, y micropartículas de silicio comerciales de entre 100 nm y 3 µm. Estos autores no pudieron confirmar la interiorización de las partículas en las células, pero detectaron que las nanopartículas producían efecto citotóxico a partir de 20 µg/ml, mientras que las micropartículas de silicio no eran citotóxicas hasta concentraciones de 200 µg/ml. Pasadas 48 h, la toxicidad era siempre más acusada cuando las células habían estado en contacto con partículas de tamaño nanométrico, probablemente por su mayor área superficial relativa o porque su pequeño tamaño no impide que entren en el núcleo de las células e interaccionen con el material genético. Nuestros estudios no detectaron citotoxicidad en ningún caso, pero es importante remarcar que la concentración de micropartículas utilizada fue tan sólo de 1,35 µg/ml y 0,45 µg/ml para Si-MP y pSi-MP respectivamente, y que estas micropartículas eran homogéneas en forma y tamaño.

Se ha descrito que las células más vulnerables a los efectos citotóxicos son aquellas que se encuentran en proliferación (Pan *et al.* 2007), pero los macrófagos son células diferenciadas que, debido a su especialización, no pueden dividirse. Con el fin de completar los estudios de citotoxicidad de micropartículas en células proliferativas, se utilizaron embriones de ratón en estadio de pronúcleos, uno de los tipos celulares más sensibles a cualquier cambio y capaces de dividirse.



El hecho de poder demostrar que Si-MP y pSi-MP no comprometen la viabilidad de los embriones es de gran importancia. Estas células son extremadamente sensibles y cualquier alteración puede producir un bloqueo del desarrollo embrionario y, en consecuencia, su muerte. Es por esta razón que los ensayos con embriones de ratón en estadio de pronúcleos se utilizan muy frecuentemente para validar material como placas, medios de cultivo o sueros, antes de ser comercializado o utilizado en los programas de fecundación in vitro en humanos (Mcdowell *et al.* 1988). En este caso, la valoración de citotoxicidad fue más allá, ya que el material a testar (las micropartículas) no se añadió al medio de cultivo de los embriones, sino que se inyectó directamente en su citoplasma. El porcentaje de embriones que alcanzó el estadio de blastocisto fue muy similar al de los controles, proporcionando la prueba definitiva de que las micropartículas de silicio fabricadas mediante técnicas y materiales de microsistemas no son citotóxicas.

#### 5.4. ETIQUETAJE Y SEGUIMIENTO INDIVIDUALIZADO DE CÉLULAS CON CAPACIDAD FAGOCÍTICA MEDIANTE CÓDIGOS DE POLISILICIO

Como primera aproximación para demostrar la utilidad de las micropartículas en estudios de células vivas únicas, se diseñó un sistema de etiquetaje individual de células en cultivo utilizando los códigos. En una primera fase, este sistema fue probado en cultivos de macrófagos, puesto que la capacidad fagocítica de estas células debería permitir la interiorización de los códigos sin necesidad de modificar su superficie, de manera equivalente a lo observado con las Si-MP y pSi-MP.

Una vez verificado que los códigos podían ser fagocitados por los macrófagos, se valoró su posible citotoxicidad. Conocíamos que ni Si-MP ni pSi-MP son citotóxicas en ninguno de los tipos celulares testados, pero aunque los códigos fueron fabricados utilizando el mismo material y tecnología de fabricación, su forma y dimensiones son distintas y con más ángulos. Sin embargo, la superficie reactiva de los códigos ( $2,78 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{g}$ ) es similar a la de Si-MP y pSi-MP, con lo cual se podía esperar una citotoxicidad baja. En efecto, después de 10 días en cultivo no se observaron diferencias significativas en la tasa de supervivencia de la población analizada respecto al control, y los resultados de desplazamiento indican que los códigos de polisilicio no inducen citotoxicidad ni daños detectables en los macrófagos.

Las unidades de información básica de nuestros códigos son fácilmente identificables y la presencia de un punto de inicio de lectura confirmó en todos los casos que el código podía leerse claramente utilizando únicamente el microscopio invertido. El hecho de que los macrófagos tengan una forma principalmente aplanada facilitó la disposición de los códigos interiorizados en paralelo a la superficie del substrato. Tan solo se observó puntualmente algunos códigos posicionados en un ángulo cercano a los 90° respecto al plano focal, lo cual no permitió su lectura.

Estos resultados confirman la validez del modelo de etiquetaje propuesto. Hasta el momento algunos autores habían sugerido otros modelos de etiquetaje celular con herramientas fabricadas utilizando tecnologías de microsistemas. Nicewarner-Peña y colaboradores (2001) diseñaron un modelo de etiquetaje basado en la tecnología "top down" de barras metálicas de tamaño micrométrico que alternaban oro y plata para definir un código, mientras que Cunin y colaboradores (2002) propusieron un modelo de cristales de silicio poroso capaces de emitir a diferentes longitudes de onda dependiendo de las condiciones de grabado. No obstante, ninguno de estos diseños de etiquetaje propuestos fue probado en cultivos. Por lo tanto, este trabajo presenta por primera vez un sistema funcional y preciso de etiquetaje individual y seguimiento de células vivas en cultivo.

## 5.5. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE MICROPARTÍCULAS DE POLISILICIO Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

Aunque se ha descrito que algunas células como las HeLa y los fibroblastos NIH 3T3 pueden endocitar partículas de hasta 6  $\mu\text{m}$  (Gratton *et al.* 2008; Muñoz-Javier *et al.* 2008), la mayoría de los tipos celulares no tienen capacidad fagocítica. Así, una vez demostrada la utilidad del sistema de etiquetaje celular propuesto, el siguiente paso fue extender la aplicabilidad de este sistema a otros tipos celulares sin capacidad fagocítica. Para ello, los códigos debían ser extracelulares y adherirse a la membrana plasmática de las células de forma selectiva y lo más estable posible, lo que requería utilizar un protocolo de modificación de la superficie de los códigos. Por otro lado, disponer de un protocolo optimizado y polivalente de modificación de la superficie de las micropartículas, que permita unir diferentes tipos de moléculas, es clave para

estudios futuros en los que las micropartículas puedan albergar dispositivos que sirvan como sensores o actuadores en el interior celular.

Con este objetivo se testaron dos protocolos distintos de funcionalización, la adsorción y la unión covalente, y para evaluar si la diferencia de forma y tamaño de las micropartículas afectaba de algún modo la eficiencia del proceso de funcionalización, se trabajó tanto con las pSi-MP como con los códigos. En ambos casos, la superficie de las micropartículas se oxida al contacto con el aire y forma grupos hidrofílicos silanol capaces de formar puentes de hidrógeno o enlaces covalentes con otros compuestos. Mediante adsorción la molécula forma una película que recubre la superficie. Es un proceso rápido y sencillo, pero se forman enlaces débiles como puentes de hidrógeno, entre la molécula adsorbida y los grupos silanol del silicio. Estos enlaces pueden romperse si se modifican condiciones del medio como el pH ó la concentración de sales. En la modificación por unión covalente se obtienen enlaces estables entre un compuesto y la superficie de silicio. Este procedimiento, aunque más estable en el tiempo, es más complejo y habitualmente requiere de la utilización de moléculas puente que se enlacen mediante grupos reactivos distintos, con el compuesto deseado y los grupos silanol.

Se seleccionaron dos proteínas para unirlas a la superficie de las micropartículas: un anticuerpo (IgG) y una lectina (WGA). En ambos casos se utilizaron conjugadas con moléculas fluorescentes, Alexa Fluor 488 (IgG<sup>488</sup>) y Texas Red (WGA<sup>561</sup>), para facilitar la valoración de la eficiencia de la funcionalización. El anticuerpo se eligió por ser un tipo de proteína capaz de interactuar selectivamente y de forma muy específica con su antígeno, que puede encontrarse en diferentes estructuras celulares. En el futuro, esto deberá permitirnos trabajar con prácticamente cualquier estructura celular utilizando la estrategia de funcionalización puesta a punto en el presente trabajo. El otro ligando, la lectina, se seleccionó teniendo en cuenta que se querían utilizar códigos de polisilicio para etiquetar células sin capacidad fagocítica, ya que esta proteína se une selectivamente a los residuos N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico de las proteínas de membrana. También se seleccionó porque a las concentraciones de trabajo habituales recomendadas por el fabricante (1-10 µg/ml), presenta unos índices de citotoxicidad muy bajos. En efecto, ni en cultivos primarios ni en líneas de cultivo de células humanas de colon, tras 48 h en contacto con las células y concentraciones de hasta 250 µg/ml de WGA<sup>561</sup>, no se observaron efectos citotóxicos (Heinrich *et al.* 2005).

La modificación de superficies en BioMEMS se utiliza frecuentemente para mejorar su biocompatibilidad o para definir patrones sobre los cuales se pueden adherir células (Veisoh y Zhang 2006). Pueden modificarse con numerosos polímeros y biomoléculas

(Lan *et al.* 2005; Shirahata *et al.* 2005; Jonkheijm *et al.* 2008; Stegmayer *et al.* 2009), pero hasta el momento, la mayor parte de estas modificaciones se efectúan sobre superficies de polisilicio y óxido de silicio. La funcionalización del silicio por adsorción o por unión covalente tiene protocolos bien definidos sobre superficies grandes (Lan *et al.* 2005) y nanopartículas (Sharma y Gilchrist 2007), que habitualmente sedimentan lentamente en soluciones acuosas. No obstante, aunque la superficie de las micropartículas tenga las mismas características fisicoquímicas, en solución sedimentan y se agregan de forma distinta. Una de las razones principales de que esto ocurra es el tamaño, pero la eficiencia de modificación de superficies depende también en gran medida de la forma y el material que las componen. La mayoría de nanopartículas se obtienen por síntesis química, y suelen tener formas esféricas donde la superficie de contacto entre ellas es mínima, lo cual dificulta la agregación. En nuestro caso tanto la forma cilíndrica de las pSi-MP como las formas poliédricas de los códigos, tienen caras planas que pueden contactar entre sí haciendo que las partículas se agreguen y precipiten rápidamente. Esto provocaría que algunas caras de las micropartículas no quedarán expuestas al medio y no se funcionalizarán.

Tanto en la modificación por adsorción como en la modificación por unión covalente fue necesario implementar algunos pasos adicionales en los procesos previamente descritos para modificar otros sustratos a priori similares. En nanopartículas de polisilicio (Sharma y Gilchrist 2007) u otros materiales, por ejemplo, los lavados se realizan habitualmente mediante membranas de diálisis, pues estas partículas suelen ser estables en suspensión. Por el contrario, las superficies de gran tamaño permiten lavados rápidos e incluso el secado de la muestra de forma fácil. La solución propuesta en este trabajo para poder lavar las micropartículas fue la centrifugación, que se llevó a cabo a 4°C para evitar la degradación de las proteínas unidas a la superficie de las micropartículas y facilitar la sedimentación de estas últimas. Para desagregar y mantener en suspensión pSi-MP y códigos, se utilizó la sonicación y la agitación continuada, respectivamente.

Las moléculas puente más utilizadas para la modificación covalente son los silanos, análogos de los alcanos pero derivados del silicio. Para crear grupos reactivos en las superficies de polisilicio no oxidadas que permitan enlazar estas moléculas puente, un procedimiento habitual es la modificación física, que implica un tratamiento con luz UV o reacciones térmicas basadas en radicales libres altamente reactivos (Shirahata *et al.* 2005). Veisheh y Zhang (2006) mejoraron el rendimiento del proceso de silanización aprovechando la capa de óxido nativo que se forma espontáneamente en las superficies de polisilicio en condiciones normales. Sin embargo, a causa de la agregación, estos protocolos son difíciles de llevar a cabo cuando se trabaja con

micropartículas, y el número de grupos que se pueden añadir a la superficie del silicio es limitado. En este trabajo, para evitar un bajo porcentaje de recubrimiento con el silano en pSi-MP y códigos, el crecimiento de la capa de óxido de silicio en la superficie de las micropartículas se controló mediante el tratamiento con una solución ácida. A continuación se utilizó una solución con pH básico para activar los grupos silanol generados en la capa superficial que debían crear un enlace con el silano (Janssen *et al.* 2006).

Para seleccionar la molécula que debía actuar como molécula puente entre las micropartículas y la proteína funcional, se probaron distintos silanos. Se valoró tanto la eficiencia de su inmovilización en la superficie de la micropartículas como la simplicidad del protocolo en cada caso, y finalmente se seleccionó el TESUD, un silano que ha dado buenos resultados en otros trabajos (Melamed *et al.* 2011). Los enlaces siloxano entre el silano y las micropartículas, reversibles con el agua, se fijaron deshidratando completamente la muestra para eliminar totalmente el agua de este enlace. Pero secar completamente las micropartículas provoca su agregación. Es por esta razón que fue necesario añadir un paso adicional de sonicación. Una vez fijado este enlace, los grupos aldehído del otro extremo del TESUD formaron enlaces covalentes imino con las aminas primarias de la proteína, que el cianoborohidruro sódico añadido a la reacción redujo a aminas secundarias, todavía más estables (Miller y Robyt 1983). Para corroborar que los procesos realizados daban lugar a las reacciones descritas la formación del enlace siloxano se evaluó con el silano APTMOS e isotiocianato de rodamina B, una molécula que es capaz de formar enlaces covalentes con el silano, pero no puede quedar adsorbida. Se usó como modelo el APTMOS, pero todos los etoxi-silanos reaccionan de manera similar. El proceso que se llevó a cabo demuestra que la silanización tenía lugar en la superficie activada del polisilicio.

Siguiendo la estrategia de silanización con GPTMOS, se obtuvo una baja eficiencia en la unión de las proteínas. Ello probablemente se debiera a la gran inestabilidad del anillo epoxi del GPTMOS, a pesar de que se puso especial cuidado en realizar el proceso de silanización en ausencia de agua. La modificación con APTMOS también se desestimó porque se formaba una película de gel alrededor de las partículas que inducía su agregación y, en consecuencia, su sedimentación. Este proceso no es controlable debido a que el glutaraldehído es un compuesto muy reactivo y puede reaccionar con varias moléculas de APTMOS, formando redes poliméricas tridimensionales que le daban el aspecto gelificado a las micropartículas.

Después de poner a punto ambas técnicas, se valoró la eficiencia de la adsorción y la modificación covalente de superficies. En la funcionalización por adsorción se generó la capa de óxido nativo por oxidación del silicio en contacto con el aire. La baja



eficiencia de esta técnica en pSi-MP puede deberse a la tendencia de las micropartículas a formar agregados en este paso, que impedirían la completa oxidación de la superficie de las partículas localizadas en la región interna del cúmulo. Estas diferencias no se observan en los códigos, los cuales, si bien tenderían a precipitar, no formarían estos agregados. Sin embargo, en la modificación covalente, tanto la oxidación como el resto de pasos se llevaron a cabo en solución y repetidas sonicaciones, lo cual impidió la formación de agregados, y dio lugar a una elevada eficiencia de funcionalización.

Después de 8 días en condiciones de cultivo no se detectó disminución en la intensidad de fluorescencia en ningún caso, indicando que en ambos procesos de funcionalización el enlace creado es estable. Sin embargo, es interesante destacar que las pSi-MP presentaron siempre los valores de mayor intensidad, siendo los más elevados en la modificación por funcionalización covalente. Este hecho puede deberse a la diferencia de forma, mayor uniformidad de tamaño y dimensiones más reducidas de las pSi-MP respecto a los códigos, que podría resultar en una menor tendencia a formar agregados y precipitar durante el proceso de modificación.

Estos resultados evidenciaron que la modificación covalente era la funcionalización más adecuada para nuestra finalidad: trabajar en condiciones de cultivo y durante períodos de tiempo largos. Este resultado es coherente, ya que durante el proceso de adsorción se forman enlaces más débiles e inestables, que pueden romperse en condiciones de cultivo. Es por esta misma razón que la modificación covalente es el procedimiento más utilizado para modificar superficies (Shirahata *et al.* 2005). Tanto para IgG<sup>488</sup> como para WGA<sup>561</sup>, las diferencias observadas entre los valores de intensidad de fluorescencia de cada condición analizada con respecto al tiempo (0, 2, 4 y 8 días) en condiciones de cultivo no fueron estadísticamente significativas.

## 5.6. ETIQUETAJE Y SEGUIMIENTO INDIVIDUALIZADO DE CÉLULAS SIN CAPACIDAD FAGOCÍTICA MEDIANTE CÓDIGOS DE POLISILICIO

En el último estudio de este trabajo, los códigos de polisilicio modificados covalentemente con la lectina WGA<sup>561</sup> fueron utilizados para el etiquetaje extracelular y el seguimiento individualizado de células Vero, sin capacidad fagocítica. Aunque en los estudios previos se había demostrado la ausencia de citotoxicidad de los códigos cuando se hallaban presentes en el interior de las células, y por tanto era de esperar

que su presencia en el exterior no afectara la viabilidad celular, no se podía descartar un posible efecto citotóxico de la lectina unida covalentemente a su superficie. Si se considera que toda la proteína utilizada durante el proceso de funcionalización se unió covalentemente a los códigos, la cantidad de WGA<sup>561</sup> presente en los cultivos sería de 40 ng/ml. Esta cantidad es varios órdenes de magnitud inferior al máximo recomendado por la casa comercial ó al valor umbral de toxicidad detectado por Heinrich y colaboradores (2005). La baja densidad de células sembradas en un inicio ralentizó el crecimiento inicial de la población, incrementando el MGT en todos los cultivos, pero no se observaron diferencias significativas con el control. A nivel individual, las células etiquetadas tampoco mostraron diferencias significativas respecto a las células no etiquetadas en la supervivencia celular tras 7 días de cultivo. En vista de estos resultados, la WGA<sup>561</sup> unida a los códigos de polisilicio no parecía tener efecto citotóxico sobre el cultivo celular utilizado.

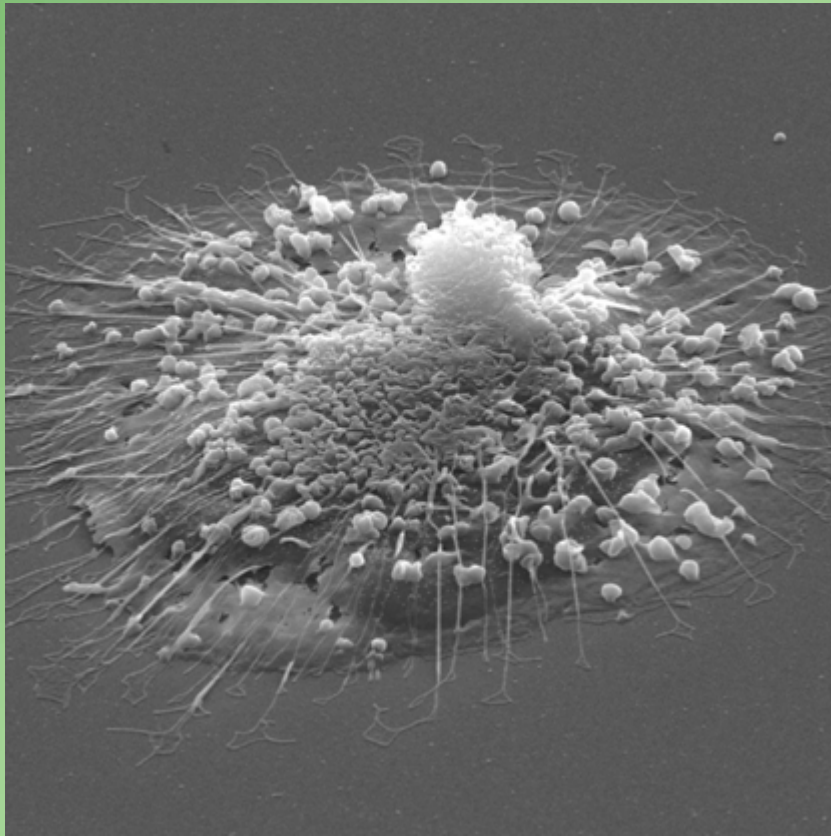
El último día de cultivo todas las células etiquetadas que seguían vivas mantenían el código unido a su superficie. La visualización de dichas células en el microscopio de fluorescencia demostró que los códigos continuaban emitiendo en el espectro del rojo, lo que demostraba que la proteína WGA<sup>561</sup> quedaba fuertemente anclada a la superficie de polisilicio de los códigos. Estos códigos seguían unidos a la membrana plasmática de las células incluso después del tratamiento del cultivo para su observación en el SEM. Este dato confirma la resistencia del enlace que se establece entre la lectina WGA<sup>561</sup> y las glicoproteínas de la membrana celular.

Los resultados obtenidos prueban que el seguimiento de células en cultivo utilizando códigos extracelulares de polisilicio modificados con un ligando funcional es factible. Este es el primer dispositivo pasivo para el estudio individualizado de células vivas fabricado con técnicas de microelectrónica y basado en procesos fotolitográficos. Si bien es cierto que la eficacia y la simplicidad del método permiten utilizarlo en cualquier laboratorio de biología celular y en una gran variedad de tipos celulares, también es necesario decir que tiene alguna limitación. La mayor parte de líneas celulares, igual que las células Vero, se dividen y duplican su población cada 24 h aproximadamente. Esto conlleva que, en cada división, una de las dos células seguirá etiquetada, pero la otra no. Por otro lado, a pesar de la baja densidad de células sembrada en un inicio, durante los últimos días de cultivo la densidad celular era muy elevada, y la localización de las células etiquetadas era más complicada. Otros sistemas de etiquetaje como los *quantum dots* no presentan este problema, ya que cada célula contiene un gran número de partículas (Sabharwal *et al.* 2009), pero sólo permiten distinguir entre poblaciones celulares, no células individuales. En este caso,

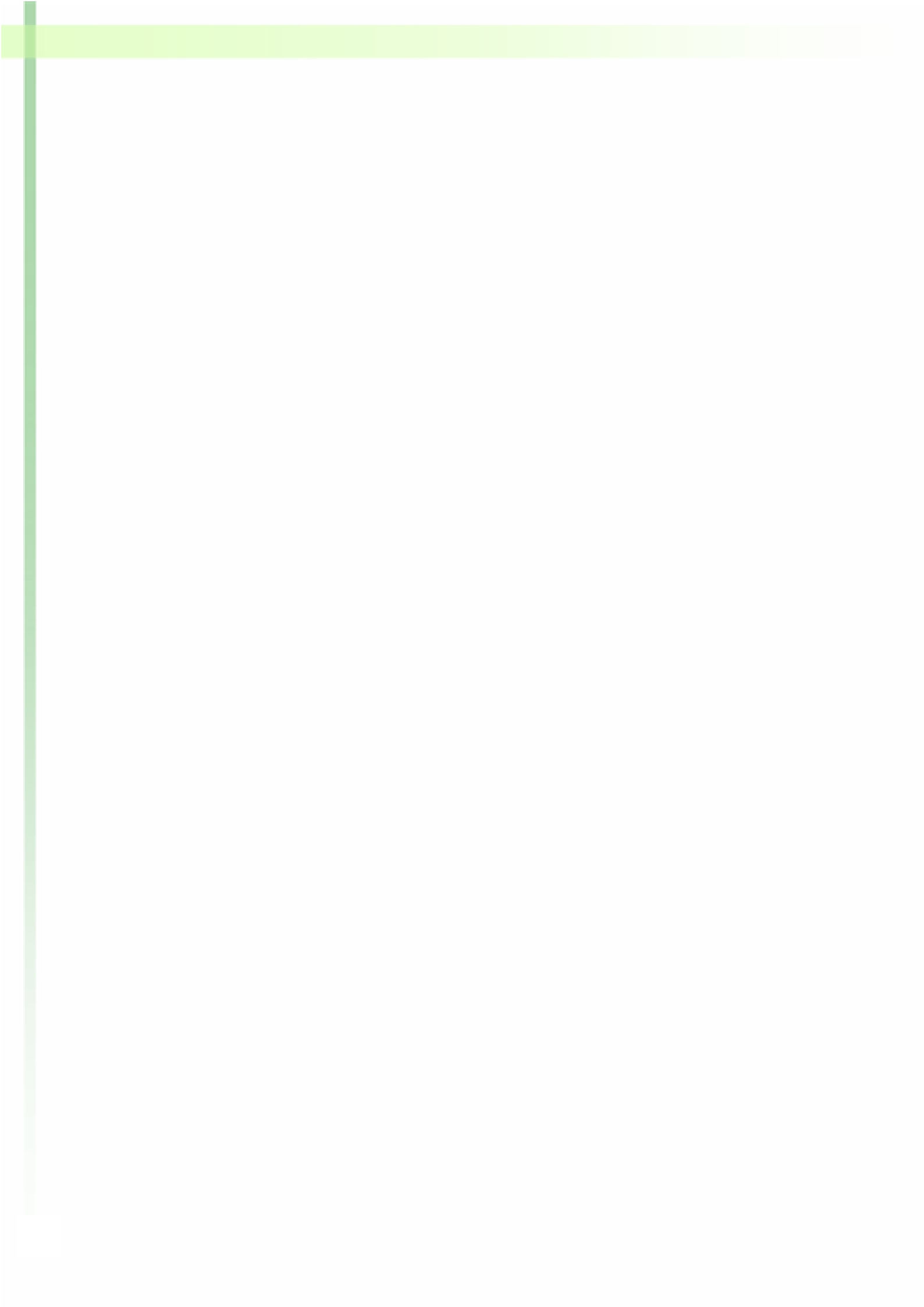
también es un problema la citotoxicidad provocada por las nanopartículas (Lovrić *et al.* 2005; revisado por Hoshino *et al.* 2007).

Hasta el momento, este tipo de seguimientos tan solo había sido posible mediante detectores manuales o automáticos que requerían del uso de *softwares* sofisticados (Debeir *et al.* 2004; Li *et al.* 2008), y que no permitían seguir las células más allá de uno o dos días. Nuestra metodología representa una gran ventaja respecto a las anteriores, pues permite seguir células individualmente en cultivo con una probabilidad de error muy baja, durante por lo menos un período de 10 días sin necesidad de monitorizarlas continuamente, y utilizando únicamente un microscopio óptico invertido, un instrumento presente en todos los laboratorios de biología celular. Esta herramienta podría ser muy interesante para el etiquetaje de tipos celulares como las neuronas, células especializadas que no se dividen pero viven largos periodos de tiempo, y que en la actualidad se monitorizan mediante *time-lapse* (Tojima *et al.* 2010). En el futuro, la automatización del sistema de reconocimiento, lectura y seguimiento celular, facilitaría la localización de células concretas en cualquier estudio y, por lo tanto, proporcionaría una nueva herramienta sencilla y económica para realizar estudios en célula única con cualquier tipo celular.

En resumen, este trabajo ha permitido demostrar que silicio y polisilicio, materiales prácticamente imprescindibles para el desarrollo de BioMEMS intracelulares, son válidos para el desarrollo de estos dispositivos. En la actualidad, algunos autores han publicado los primeros trabajos que también aplican técnicas de microelectrónica para la fabricación de sistemas de liberación de fármacos de silicio poroso (Serda *et al.* 2010a,b), y sus resultados de citotoxicidad concuerdan con los obtenidos en este trabajo. En el futuro, será necesario estudiar más a fondo los posibles efectos que puedan causar los dispositivos en las células, como por ejemplo la activación de señales celulares o variaciones en la expresión génica ó la traducción de proteínas, pero el conocimiento adquirido con el presente trabajo es la base para el desarrollo de sensores intracelulares para células vivas utilizando técnicas de fabricación de microelectrónica.



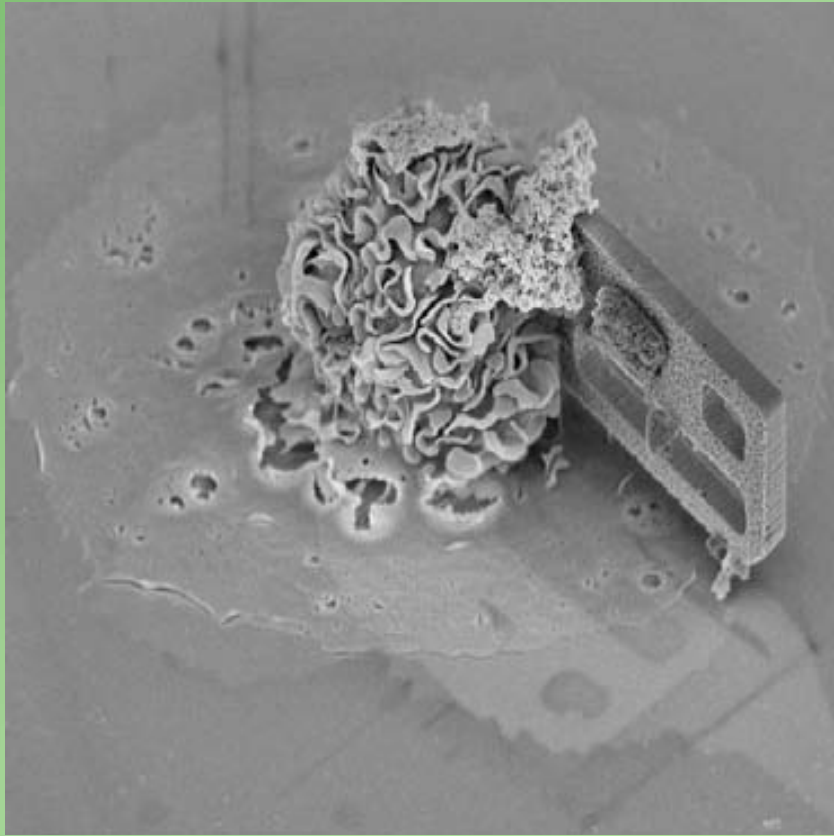
## 6. CONCLUSIONES



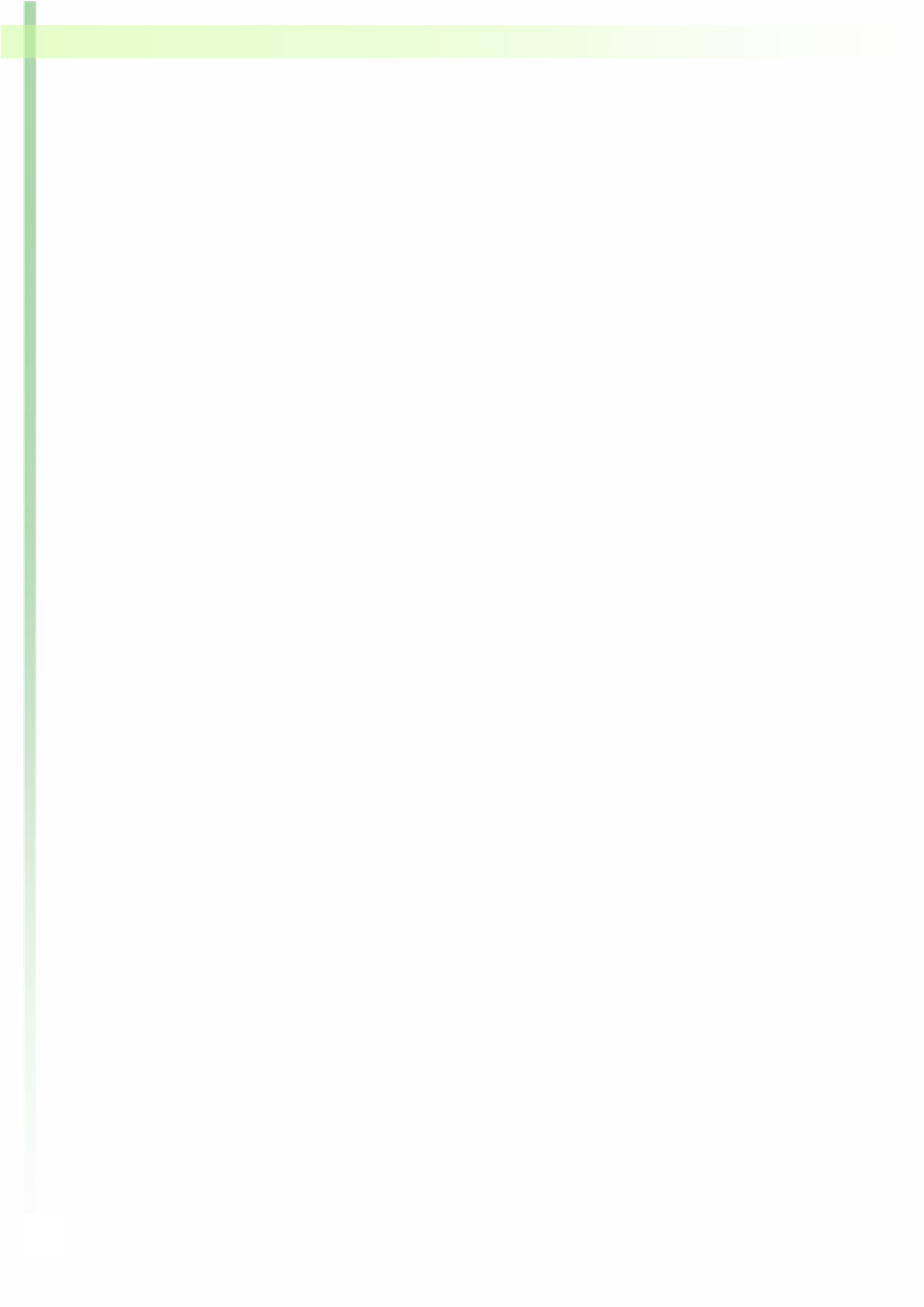


1. El diseño y la fabricación mediante procesos fotolitográficos ha permitido obtener Si-MP, pSi-MP de dimensiones adecuadas para albergar futuros dispositivos intracelulares en células vivas.
2. Tanto Si-MP como pSi-MP pueden ser interiorizadas por células vivas en cultivo con capacidad fagocítica. Una vez endocitadas por macrófagos, estas micropartículas quedan atrapadas en compartimentos celulares.
3. Las Si-MP y pSi-MP no causan ningún efecto citotóxico significativo al ser fagocitadas por macrófagos en cultivo, ni comprometen el desarrollo preimplantacional de embriones de ratón microinyectados con una sola micropartícula.
4. Los códigos de polisilicio son el primer dispositivo celular pasivo válido para etiquetar y seguir individualmente células vivas con capacidad fagocítica en cultivo durante periodos largos de tiempo. Estos códigos presentan unidades de información fácilmente reconocibles mediante microscopía óptica.
5. La funcionalización de la superficie de pSi-MP y códigos de polisilicio por unión covalente es más eficiente y estable que la modificación por adsorción, y la molécula puente más adecuada para anclar proteínas a la superficie de las partículas de polisilicio es el TESUD. La forma y el tamaño de las partículas afecta a la eficiencia de funcionalización, y para la modificación covalente es mejor en pSi-MP que en los códigos de polisilicio.
6. Los códigos de polisilicio funcionalizados covalentemente con la lectina WGA<sup>561</sup> se adhieren a la membrana plasmática de células Vero en cultivo con una unión robusta y estable, sin causar citotoxicidad. Los códigos funcionalizados permiten etiquetar y seguir individualmente células vivas en cultivo sin capacidad fagocítica inherente, sin necesidad de monitorizarlas ininterrumpidamente.





## 7. BIBLIOGRAFÍA



## A

Abes S, Williams D, Prevot P, Thierry A, Gait MJ, Lebleu B. (2006) Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J Control Release* 110(3), 595-604.

Akin D, Sturgis J, Ragheb K, Sherman D, Burkholder K, Robinson JP, Bhunia AK, Mohammed S, Bashir R. (2007) Bacteria-mediated delivery of nanoparticles and cargo into cells. *Nat Nanotechnol* 2(7), 441-449.

Anselmetti D. (2009) *Single Cell Analysis: Technologies and Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania. ISBN: 978-3-527-31864-3

## B

Bao G, Suresh S. (2003) Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nat Mater* 2(11), 715-725.

Barlow PG, Donaldson K, MacCallum J, Clouter A, Stone V. (2005) Serum exposed to nanoparticle carbon black displays increased potential to induce macrophage migration. *Toxicol Lett* 155(3), 397-401.

Bashir R. (2004) BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 56(11), 1565-1586.

Bendayan M. (2000) A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology. *Biotech Histochem* 75(5), 203-242.

Bengtsson M, Ståhlberg A, Rorsman P, Kubista M. (2005) Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels. *Genome Res* 15(10), 1388-1392.

Benítez MA, Plaza JA, Sheng SQ, Esteve J. (1996) A new process for releasing micromechanical structures in surface micromachining. *J Micromech Microeng* 6, 36-38.

Bulbarello A, Sattayasamitsathit S, Crevillen AG, Burdick J, Mannino S, Kanatharana P, Thavarungkul P, Escarpa A, Wang J. (2008) Striped alloy nanowire optical reflectance barcodes prepared from a single plating solution. *Small* 4(5), 597-600.

Burg TP, Godin M, Knudsen SM, Shen W, Carlson G, Foster JS, Babcock K, Mandlis SR. (2007) Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* 446(7139), 1066-1069.



Butoescu N, Seemayer CA, Foti M, Jordan O, Doelker E. (2009) Dexamethasone-containing PLGA superparamagnetic microparticles as carriers for the local treatment of arthritis. *Biomaterials* 30(9), 1772-1780. Epub 2009 Jan 8.

## C

Canelas DA, Herlihy KP, DeSimone JM. (2009) Top-down particle fabrication: control of size and shape for diagnostic imaging and drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1(4), 391-404.

Chan CS, De Stasio G, Welch SA, Girasole M, Frazer BH, Nesterova MV, Fakra S, Banfield JF. (2004) Microbial polysaccharides template assembly of nanocrystal fibers. *Science* 303(5664), 1656-1658.

Chang JA, Vithal M, Baek IC, Seok SI. (2010) Evolution of phase and morphology of titanium dioxide induced from peroxo titanate complex aqueous solution. *J Nanosci Nanotechnol* 10(1), 163-169.

Chen X, Zhou X, Wong ST. (2006) Automated segmentation, classification, and tracking of cancer cell nuclei in time-lapse microscopy. *IEEE Trans Biomed Eng* 53(4), 762-766.

Choi J, Zhang Q, Reipa V, Wang NS, Stratmeyer ME, Hitchins VM, Goering PL. (2009) Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of photoluminescent silicon nanoparticles with silicon micron-sized particles in RAW 264.7 macrophages. *J Appl Toxicol* 29(1), 52-60.

Cockerham K, Aro S, Liu W, Pantchenko O, Olmos A, Oehlberg M, Sivaprakasam M, Crow L. (2008) Application of MEMS technology and engineering in medicine: a new paradigm for facial muscle reanimation. *Expert Rev Med Devices* 5(3):371-381.

Collard D, Takeuchi S, Fujita H. (2008) MEMS technology for nanobio research. *Drug Discov Today* 13(21-22), 989-996.

Colvin GA, Lambert JF, Dooner MS, Cerny J, Quesenberry PJ. (2007) Murine allogeneic in vivo stem cell homing. *J Cell Physiol* 211(2), 386-391.

Cong P, Young DJ, Hoit B, Ko WH. (2006) Novel long-term implantable blood pressure monitoring system with reduced baseline drift. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 1854-1857.

Conner SD, Schmid SL. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927), 37-44.

Cossart P, Lecuit M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J* 17(14), 3797-3806.

Cossman J. (2001) Gene expression analysis of single neoplastic cells and the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Histochem Cytochem* 49(6), 799-800.

Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. (2007) Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol* 2(12), 780-783.

Cunin F, Schmedake TA, Link JR, Li YY, Koh J, Bhatia SN, Sailor MJ. (2002) Biomolecular screening with encoded porous-silicon photonic crystals. *Nat Mater* 1(1), 39-41.

## D

de Chastellier C, Thilo L. (2006) Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cell Microbiol* 8(2), 242-256.

de Rose R, Zelikin AN, Johnston APR, Sexton A, Chong SF, Cortez C, Mulholland W, Caruso F, Kent SJ. (2008) Binding, Internalization, and Antigen Presentation of Vaccine-Loaded Nanoengineered Capsules in Blood. *Adv Mater* 20(24):4698-4703.

de Souza N. (2010) Single-cell methods. *Nat Methods* 7(1), 35.

Debeir O, Camby I, Kiss R, Van Ham P, Decaestecker C. (2004) A model-based approach for automated in vitro cell tracking and chemotaxis analyses. *Cytometry A* 60(1), 29-40.

Delehanty JB, Mattoussi H, Medintz IL. (2009) Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. *Anal Bioanal Chem* 393(4), 1091-1105.

Demirci U. (2007) Using micro-electro-mechanical systems (MEMS) to develop diagnostic tools. *J Vis Exp* 8, 314. <http://www.jove.com/details.stp?id=314>. DOI: 10.3791/314.

Dendukuri D, Pregibon DC, Collins J, Hatton TA, Doyle PS. (2006) Continuous-flow lithography for high-throughput microparticle synthesis. *Nat Mater* 5(5), 365-369.

Dobrucki JW, Feret D, Noatynska A. (2007) Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies. *Biophys J* 93(5), 1778-1786.

Dooner M, Cerny J, Colvin G, Demers D, Pimentel J, Greer D, Abedi M, McAuliffe C, Quesenberry P. (2004) Homing and conversion of murine hematopoietic stem cells to lung. *Blood Cells Mol Dis* 32(1), 47-51.

## E

Eastman PS, Ruan W, Doctolero M, Nuttall R, de Feo G, Park JS, Chu JS, Cooke P, Gray JW, Li S, Chen FF. (2006) Qdot nanobarcodes for multiplexed gene expression analysis. *Nano Lett* 6(5), 1059-1064.

Egozcue J, Santaló J, Giménez C, Pérez N, Vidal F. (2000) Preimplantation genetic diagnosis. *Mol Cell Endocrinol* 166(1), 21-25.

Elman NM, Ben-Yoav H, Sternheim M, Rosen R, Krylov S, Shacham-Diamand Y. (2008) Towards toxicity detection using a lab-on-chip based on the integration of MOEMS and whole-cell sensors. *Biosens Bioelectron* 23(11), 1631-1636.

Evans CL, Xie XS. (2008) Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Ann Rev Anal Chem* 1, 883-909.

Evora C, Soriano I, Rogers RA, Shakesheff KN, Hanes J, Langer R. (1998) Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Control Release* 51(2-3), 143-152.

## F

Faklaris O, Garrot D, Joshi V, Druon F, Boudou JP, Sauvage T, Georges P, Curmi PA, Treussart F. (2008) Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway. *Small* 4(12), 2236-2239.

Faraasen S, Vörös J, Csúcs G, Textor M, Merkle HP, Walter E. (2003) Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate. *Pharm Res* 20(2), 237-246.

Fernandes TG, Diogo MM, Clark DS, Dordick JS, Cabral JM. (2009) High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. *Trends Biotechnol* 27(6), 342-349.

Ferrari M. (2005) Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5(3), 161-171.

Ferrari M. (2007) *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*. Springer. New York, Estados Unidos. ISBN: 978-0-387-25561-3.

Ferrati S, Mack A, Chiappini C, Liu X, Bean AJ, Ferrari M, Serda RE. (2010) Intracellular trafficking of silicon particles and logic-embedded vectors. *Nanoscale* 2(8), 1512-1520.

Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP, Speicher MR. (2007) High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 35(3), e15.

Finkel NH, Lou X, Wang C, He L. (2004) Barcoding the microworld. *Anal Chem* 76(19), 352A-359A.

Fischer R, Steinert S, Fröber U, Voges D, Stubenrauch M, Hofmann GO, Witte H. (2011) Cell cultures in microsystems: Biocompatibility aspects. *Biotechnol Bioeng* 108(3), 687-693.

FitzGerald V, Martin RA, Jones JR, Qiu D, Wetherall KM, Moss RM, Newport RJ. (2009) Bioactive glass sol-gel foam scaffolds: Evolution of nanoporosity during processing and in situ monitoring of apatite layer formation using small- and wide-angle X-ray scattering. *J Biomed Mater Res A* 91(1), 76-83.

Fitzpatrick E, McBride S, Yavelow J, Najmi S, Zanzucchi P, Wieder R. (2006) Microfluidic techniques for single-cell protein expression analysis. *Clin Chem* 52(6), 1080-1088.

Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. (2005) Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 298(2), 315-322.

Fritz J, Baller MK, Lang HP, Rothuizen H, Vettiger P, Meyer E, Güntherodt H, Gerber C, Gimzewski JK. (2000) Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science* 288(5464), 316-318.

## G

Gefen O, Balaban NQ. (2008) The Moore's Law of microbiology - towards bacterial culture miniaturization with the micro-Petri chip. *Trends Biotechnol* 26(7), 345-347.

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 113(11), 1555-1560.

Gerlich D, Mattes J, Eils R. (2003) Quantitative motion analysis and visualization of cellular structures. *Methods* 29(1), 3-13.

Gomes AJ, Faustino AS, Machado AE, Zaniquelli ME, de Paula Rigoletto T, Lunardi CN, Lunardi LO. (2006) Characterization of PLGA microparticles as a drug carrier for 3-ethoxycarbonyl-2h-benzofuro[3,2-f]-1-benzopyran-2-one. Ultrastructural study of cellular uptake and intracellular distribution. *Drug Deliv* 13(6), 447-454.

Gonzalo-Ruiz J, Alonso-Lomillo MA, Muñoz FJ. (2007) Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice. *Biosens Bioelectron* 22(7), 1517-1521.

Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem* 15(4), 897-900.

Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, Van Steirteghem A, Bertrand C, Liebaers I, Devroey P, Sermon K. (2008) Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 23(3), 481-492.

Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM. (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33), 11613-11618.

Gray DS, Tan JL, Voldman J, Chen CS. (2004) Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array. *Biosens Bioelectron* 19(12), 1765-1774.

## H

Hair ML, Hertl W. (1970) Acidity of surface hydroxyl groups. *J Phys Chem* 74(1), 91-94.

Hamilton N. (2009) Quantification and its applications in fluorescent microscopy imaging. *Traffic* 10(8), 951-961.

Han M, Gao X, Su JZ, Nie S. (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* 19(7), 631-635.

Heinrich EL, Welty LA, Banner LR, Oppenheimer SB. (2005) Direct targeting of cancer cells: a multiparameter approach. *Acta Histochem* 107(5), 335-344.

Hiura T, Koseki H, Shiraishi K, Asahara T, Tsurumoto T, Shindo H, Baba K, Taoda H, Terasaki N. (2010) Photocatalytic TiO<sub>2</sub> particles confer superior antibacterial effects in a nutrition-rich environment: an in vitro study. *Biomed Res* 31(2), 151-154.

Holt CA. (1978) *Electronic Circuits: Digital and Analog*. Chapter 4. John Wiley and Sons (WIE) Int Ed. Hoboken, New Jersey, Estados Unidos. ISBN-10: 0471044687.

Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K. (2007) Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity. *J Artif Organs* 10(3), 149-157.

Hsiao JK, Tsai CP, Chung TH, Hung Y, Yao M, Liu HM, Mou CY, Yang CS, Chen YC, Huang DM. (2008) Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system of gadolinium for effective human stem cell tracking. *Small* 4(9), 1445-1452.

Hsiung LC, Yang CH, Chiu CL, Chen CL, Wang Y, Lee H, Cheng JY, Ho MC, Wo AM. (2008) A planar interdigitated ring electrode array via dielectrophoresis for uniform patterning of cells. *Biosens Bioelectron* 24(4), 875-881.

Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saffig P, Grinstein S. (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* 26(2), 313-324.

I

Ingham CJ, van Hylckama Vlieg JE. (2008) MEMS and the microbe. *Lab Chip* 8(10):1604-1616.

J

Janssen D, De Palma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. (2006) Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films* 515, 1433-1438.

Jeon NL. (2007) BioMEMS: forging new collaborations between biologists and engineers. *J Vis Exp* 9, 411. <http://www.jove.com/details.stp?id=411>. DOI: 10.3791/411.

Jonkheijm P, Weinrich D, Schröder H, Niemeyer CM, Waldmann H. (2008) Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(50), 9618-9647.

Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. (2009) Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol* 6, 33-60.

K

Kakisky T, Quake SR. (2011) Single-cell genomics. *Nat Methods* 8(4), 311-304.

Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, DesJardin LE, Schlesinger LS. (2005a) The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* 202(7), 987-999.

Kang M, Trofin L, Mota MO, Martin CR. (2005b) Protein capture in silica nanotube membrane 3-D microwell arrays. *Anal Chem* 77(19), 6243-6249.

Kanno T, Gopel SO, Rorsman P, Wakui M. (2002) Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet. *Neurosci Res* 42(2), 79-90.

Kasili PM, Song JM, Vo-Dinh T. (2004) Optical sensor for the detection of caspase-9 activity in a single cell. *J Am Chem Soc* 126(9), 2799-2806.



Kiama SG, Cochand L, Karlsson L, Nicod LP, Gehr P. (2001) Evaluation of phagocytic activity in human monocyte-derived dendritic cells. *J Aerosol Med* 14(3), 289-299.

Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmüller G. (2002) Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* 20(4), 387-392.

Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B. (2008) Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci.* 28(12), 2959-2964.

Kofron CM, Fong VJ, Hoffman-Kim D. (2009) Neurite outgrowth at the interface of 2D and 3D growth environments. *J Neural Eng* 6(1):016002.

Kubitscheck U, Grünwald D, Hoekstra A, Rohleder D, Kues T, Siebrasse JP, Peters R. Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 168(2), 233-243.

Kuchimaru T, Sato F, Aoi Y, Fujita T, Ikeda T, Shimizu K, Kato Y, Iida T. (2008) Microchamber arrays for the identification of individual cells exposed to an X-ray microbeam. *Radiat Environ Biophys* 47(4), 535-540.

## L

Lan S, Veiseh M, Zhang M. (2005) Surface modification of silicon and gold-patterned silicon surfaces for improved biocompatibility and cell patterning selectivity. *Biosens Bioelectron* 20(9), 1697-1708.

Laval-Gilly P, Falla J, Klestadt D, Henryon M. (2000) A new approach to evaluate toxicity of gases on mobile cells in culture. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44(3), 483-488.

Lechuga LM, Tamayo J, Álvarez M, Carrascosa LG, Yufera A, Doldán R, Peralías E, Rueda A, Plaza JA, Zinoviev K, Domínguez C, Zaballos A, Moreno M, Martínez-A C, Wenn D, Harris N, Bringer C, Bardinal V, Camps T, Vergnenègre C, Fontaine C, Díaz V, Bernad A. (2006) A highly sensitive microsystem based on nanomechanical biosensors for Genomics applications. *Sens Actuators B Chem* 118, 2-10.

Lee H, Liu Y, Ham D, Westervelt RM. (2007) Integrated cell manipulation system - CMOS/microfluidic hybrid. *Lab Chip* 7(3), 331-337.

Levsky JM, Singer RH. (2003) Gene expression and the myth of the average cell. *Trends Cell Biol* 13(1), 4-6.

Li K, Miller ED, Chen M, Kanade T, Weiss LE, Campbell PG. (2008) Cell population tracking and lineage construction with spatiotemporal context. *Med Image Anal* 12(5), 546-566.

Li PC, Harrison DJ. (1997) Transport, manipulation, and reaction of biological cells on-chip using electrokinetic effects. *Anal Chem* 69(8), 1564-1568.

Lovrić J, Bazzi HS, Cuie Y, Fortin GR, Winnik FM, Maysinger D. (2005) Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J Mol Med.* 83(5), 377-385.

Lu J, Liong M, Zink JI, Tamanoi F. (2007) Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small* 3(8), 1341-1346.

## M

Madou MJ. (2002) *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*, 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press, Taylor & Francis LLC. Danvers, Massachusetts, Estados Unidos. ISBN: 978-0-849-30826-0.

Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. (2006) *Immunology*, 7<sup>th</sup> Edition. Mosby, Elsevier. Amsterdam, Holanda. ISBN: 978-0-323-03399-2.

Mattheakis LC, Dias JM, Choi YJ, Gong J, Bruchez MP, Liu J, Wang E. (2004) Optical coding of mammalian cells using semiconductor quantum dots. *Anal Biochem* 327(2), 200-208.

Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H. (2010) Light, including ultraviolet. *J Autoimmun* 34(3), J247-J257.

Maysinger D, Lovrić J, Eisenberg A, Savić R. (2007) Fate of micelles and quantum dots in cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 65(3), 270-281.

McCarthy JR, Jaffer FA, Weissleder R. (2006) A macrophage-targeted theranostic nanoparticle for biomedical applications. *Small* 2(8-9), 983-987.

McDowell JS, Swanson RJ, Maloney M, Veeck L. (1988) Mouse embryo quality control for toxicity determination in the Norfolk in vitro fertilization program. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 5(3), 144-148.

Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* 4(6), 435-446.

Melamed S, Ceriotti L, Weigel W, Rossi F, Colpo P, Belkin S. (2011) A printed nanolitre-scale bacterial sensor array. *Lab Chip.* 11(1), 139-146.

Miller AW, Robyt JF. (1983) Sodium cyanoborohydride in the immobilization of proteins to glutaraldehyde-activated aminoalkyl silica. *Biotech Bioengineer* 25, 2795-2800.

Min W, Lu S, Chong S, Roy R, Holtom GR, Xie XS. (2009) Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy. *Nature* 461(7267), 1105-1109.

Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. (2008) Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification. *J Mass Spectrom* 43(12), 1692-1700.

Mockler TC, Chan S, Sundaresan A, Chen H, Jacobsen SE, Ecker JR. (2005) Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* 85(1), 1-15.

Moore GE. (1995) Lithography and the future of Moore's law. *Proc of SPIE* 2438, 2-17.

Muller DJ. (2008) AFM: a nanotool in membrane biology. *Biochemistry* 47(31), 7986-7998.

Muñoz-Javier A, Kreft O, Piera Alberola A, Kirchner C, Zebli B, Sussha AS, Horn E, Kempter S, Skirtach AG, Rogach AL, Rädler J, Sukhorukov GB, Benoit M, Parak WJ. (2006) Combined atomic force microscopy and optical microscopy measurements as a method to investigate particle uptake by cells. *Small* 2(3), 394-400.

Muñoz-Javier A, Kreft O, Semmling M, Kempter S, Skirtach AG, Bruns OT, del Pino P, Bedard MF, Raedler J, Kaes J, Plank C, Sukhorukov GB, Parak WJ. (2008) Uptake of Colloidal Polyelectrolyte-Coated Particles and Polyelectrolyte Multilayer Capsules by Living Cells. *Adv Mater* 20(22), 4281-4287.

Murphy CJ, Sau TK, Gole AM, Orendorff CJ, Gao J, Gou L, Hunyadi SE, Li T. (2005) Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *J Phys Chem B* 109(29), 13857-13870.

Murthy SK. (2007) Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine* 2(2), 129-141.

Muzzey D, van Oudenaarden A. (2009) Quantitative time-lapse fluorescence microscopy in single cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 301-327.

## N

Nawrocki J. (1997) The silanol group and its role in liquid chromatography. *J Chromatogr A* 779(1-2), 29-71.

Nguyen TA, Lu Y, Yang X, Shi X. (2007) Carbon and steel surfaces modified by *Leptothrix discophora* SP-6: characterization and implications. *Environ Sci Technol* 41(23), 7987-7996.

Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761), 622-627.

Nicewarner-Peña SR, Freeman RG, Reiss BD, He L, Pena DJ, Walton ID, Cromer R, Keating CD, Natan MJ. (2001) Submicrometer metallic barcodes. *Science* 294(5540), 137-141.

Nock V, Blaikie RJ, David T. (2008) Patterning, integration and characterisation of polymer optical oxygen sensors for microfluidic devices. *Lab Chip* 8(8), 1300-1307.

Nuxoll EE, Siegel RA. (2009) BioMEMS devices for drug delivery. *IEEE Eng Med Biol Mag* 28(1), 31-39.

## O

Oh BK, Nam JM, Lee SW, Mirkin CA. (2006) A fluorophore-based bio-barcode amplification assay for proteins. *Small* 2(1), 103-108.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7), 552-565.

## P

Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnke-Dechent W. (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11), 1941-1949.

Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46(3), 143-151.

Park S, Lee MR, Pyo SJ, Shin I. (2004) Carbohydrate chips for studying high-throughput carbohydrate-protein interactions. *J Am Chem Soc* 126(15), 4812-4819.

Park TH, Shuler ML. (2003) Integration of cell culture and microfabrication technology. *Biotechnol Prog* 19(2), 243-253.

Pedraza CE, Nikolcheva LG, Kaartinen MT, Barralet JE, McKee MD. (2008) Osteopontin functions as an opsonin and facilitates phagocytosis by macrophages of hydroxyapatite-coated microspheres: implications for bone wound healing. *Bone* 43(4), 708-716.

Peixoto A, Evaristo C, Munitic I, Monteiro M, Charbit A, Rocha B, Veiga-Fernandes H. (2007) CD8 single-cell gene coexpression reveals three different effector types present at distinct phases of the immune response. *J Exp Med* 204(5), 1193-1205.

Pelkmans L, Helenius A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3(5), 311-320.

Petersen KE. (1982) Silicon as a Mechanical Material. *Proc IEEE* 70(5), 420-457.

## Q

Qin L, Banholzer MJ, Millstone JE, Mirkin CA. (2007) Nanodisk codes. *Nano Lett* 7(12), 3849-3853.

## R

Richardson SC, Wallom KL, Ferguson EL, Deacon SP, Davies MW, Powell AJ, Piper RC, Duncan R. (2008) The use of fluorescence microscopy to define polymer localisation to the late endocytic compartments in cells that are targets for drug delivery. *J Control Release* 127(1), 1-11.

Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marquès L, Calderón G, Velilla E, Martínez-Passarell O, Oliver-Bonet M, Benet J, Navarro J. (2010) Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 25(7), 1824-1835.

Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM. (2006) Technology insight: in vivo cell tracking by use of MRI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3(10), 554-562.

Rosenfeld N, Young JW, Alon U, Swain PS, Elowitz MB. (2005) Gene regulation at the single-cell level. *Science* 307(5717), 1962-1965.

## S

Sabharwal N, Holland EC, Vazquez M. (2009) Live cell labeling of glial progenitor cells using targeted quantum dots. *Ann Biomed Eng* 37(10), 1967-1973.

Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A. (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132(3), 487-498.

Samitier J. (2009) La Nanomedicina: nuevas tecnologías aplicadas al diagnóstico y la terapia. *Física y Sociedad* 20, 44.

Sanz V, de Marcos S, Galbán J. (2007) Direct glucose determination in blood using a reagentless optical biosensor. *Biosens Bioelectron* 22(12), 2876-2883.

Sartori A, Gatz R, Beck F, Rigort A, Baumeister W, Plitzko JM. (2007) Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J Struct Biol* 160(2), 135-145.

Sbiaa Z. (2006) MEMS fabricated chip for an implantable drug delivery device. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 5621-5624.

Schmidt BT, Feduska JM, Witt AM, Deasy BM. (2008) Robotic cell culture system for stem cell assays. *Industrial Robot* 35(2), 116-124.

- Schroeder T. (2005) Tracking hematopoiesis at the single cell level. *Ann N Y Acad Sci* 1044, 201-209.
- Semmling M, Kreft O, Muñoz Javier A, Sukhorukov GB, Käs J, Parak WJ. (2008) A novel flow-cytometry-based assay for cellular uptake studies of polyelectrolyte microcapsules. *Small* 4(10), 1763-1768.
- Serda RE, Mack A, Pulikkathara M, Zaske AM, Chiappini C, Fakhoury JR, Webb D, Godin B, Conyers JL, Liu XW, Bankson JA, Ferrari M. (2010a) Cellular association and assembly of a multistage delivery system. *Small* 6(12), 1329-1340.
- Serda RE, Mack A, van de Ven AL, Ferrati S, Dunner K Jr, Godin B, Chiappini C, Landry M, Brousseau L, Liu X, Bean AJ, Ferrari M. (2010b) Logic-Embedded Vectors for Intracellular Partitioning, Endosomal Escape, and Exocytosis of Nanoparticles. *Small* 6(23), 2691-2700.
- Sharma MK, Gilchrist ML. (2007) Templated assembly of biomembranes on silica microspheres using bacteriorhodopsin conjugates as structural anchors. *Langmuir* 23(13), 7101-7112.
- Shekhawat G, Tark SH, Dravid VP. (2006) MOSFET-Embedded microcantilevers for measuring deflection in biomolecular sensors. *Science* 311(5767), 1592-1595.
- Shirahata N, Hozumi A, Miura Y, Kobayashi K, Sakka Y, Yonezawa T. (2006) An efficient matrix that resists the nonspecific adsorption of protein to fabricate carbohydrate arrays on silicon. *Thin Solid Films* 499, 213-218.
- Shirahata N, Hozumi A, Yonezawa T. (2005) Monolayer-derivative functionalization of non-oxidized silicon surfaces. *Chem Rec* 5(3), 145-159.
- Shirahata N, Nakanishi J, Echikawa Y, Hozumi A, Masuda Y, Ito S, Sakka Y. (2008) Liquid Manipulation Lithography to Fabricate a Multifunctional Microarray of Organosilanes on an Oxide Surface under Ambient Conditions. *Adv Funct Mater.* 18(19), 3049-3055.
- Silva GA. (2006) Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nat Rev Neurosci* 7(1), 65-74.
- Singhal R, Orynbayeva Z, Kalyana Sundaram RV, Niu JJ, Bhattacharyya S, Vitol EA, Schrlau MG, Papazoglou ES, Friedman G, Gogotsi Y. (2011) Multifunctional carbon-nanotube cellular endoscopes. *Nat Nanotechnol* 6(1), 57-64.
- Slowing I, Trewyn BG, Lin VS. (2006) Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J Am Chem Soc* 128(46), 14792-14793.
- Slowing II, Trewyn BG, Lin VS. (2007) Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. *J Am Chem Soc* 129(28), 8845-8849.



Song LS, Guatimosim S, Gómez-Viquez L, Sobie EA, Ziman A, Hartmann H, Lederer WJ. (2005) Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 99-111.

Spiller DG, Wood CD, Rand DA, White MR. (2010) Measurement of single-cell dynamics. *Nature* 465(7299), 736-745.

Stegmaier P, del Campo A. (2009) Photoactive branched and linear surface architectures for functional and patterned immobilization of proteins and cells onto surfaces: a comparative study. *Chemphyschem* 10(2), 357-369.

Stone J, Jackson S, Wright D. (2011) Biological applications of gold nanorods. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 3(1), 100-109.

Swanson JA, Baer SC. (1995) Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 5(3), 89-93.

## T

Takeda M, Takahashi M, Nasu M, Matsumoto S. (2010) In vivo patch-clamp analysis of response properties of rat primary somatosensory cortical neurons responding to noxious stimulation of the facial skin. *Mol Pain* 6, 30-39.

Tasciotti E, Liu X, Bhavane R, Plant K, Leonard AD, Price BK, Cheng MM, Decuzzi P, Tour JM, Robertson F, Ferrari M. (2008) Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications. *Nat Nanotechnol* 3(3), 151-157.

Teixidor GT, Gorkin RA 3rd, Tripathi PP, Bisht GS, Kulkarni M, Maiti TK, Battacharyya TK, Subramaniam JR, Sharma A, Park BY, Madou M. (2008) Carbon microelectromechanical systems as a substratum for cell growth. *Biomed Mater* 3(3), 034116.

Thiele L, Diederichs JE, Reszka R, Merkle HP, Walter E. (2003a) Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials* 24(8), 1409-1418.

Thiele L, Merkle HP, Walter E. (2003b) Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. *Pharm Res* 20(2), 221-228.

Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. (2001) Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release* 76(1-2), 59-71.

Tian B, Cohen-Karni T, Qing Q, Duan X, Xie P, Lieber CM. (2010) Three-dimensional, flexible nanoscale field-effect transistors as localized bioprobes. *Science* 329(5993), 830-834.

Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H. (2010) Asymmetric clathrin-mediated endocytosis drives repulsive growth cone guidance. *Neuron* 66(3), 370-377.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. (1982) Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42(4), 1530-1536.

## U

Urquiza R, López J, Gonzalez-Herrera A, Povedano V, Ciges M. (2009) Tympanic-ossicular prostheses and MEMS technology: whats and whys. *Acta Otolaryngol* 129(4), 411-415.

## V

Vaccaro DE, Yang M, Weinberg JS, Reinhardt CP, Groman EV. (2008) Cell tracking using nanoparticles. *J Cardiovasc Trans Res* 1, 217-220.

Vallhov H, Gabrielsson S, Strømme M, Scheynius A, Garcia-Bennett AE. (2007) Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells. *Nano Lett* 7(12), 3576-3582.

van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129(7), 1287-1298.

Veisoh M, Zhang M. (2006) Effect of silicon oxidation on long-term cell selectivity of cell-patterned Au/SiO<sub>2</sub> platforms. *J Am Chem Soc* 128(4), 1197-1203.

Verma A, Uzun O, Hu Y, Han HS, Watson N, Chen S, Irvine DJ, Stellacci F. (2008) Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nP. *Nat Mater* 7(7), 588-595.

Vo-Dinh T, Kasili P. (2005) Fiber-optic nanosensors for single-cell monitoring. *Anal Bioanal Chem* 382(4), 918-925.

Voldman J. (2003) BioMEMS: Building with cells. *Nat Mater* 2(7), 433-434.

## W

Wacker SA, Oswald F, Wiedenmann J, Knöchel W. (2007) A green to red photoconvertible protein as an analyzing tool for early vertebrate development. *Dev Dyn*. 236(2), 473-480.

Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. (2006) The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol* 24(10), 1211-1217.

Wagner K, Kautz A, Röder M, Schwalbe M, Pachmann K, Clement JH, Schnabelrauch M. (2004) Synthesis of oligonucleotide-functionalized magnetic nanoparticles and study on their in vitro cell uptake. *Appl Organomet Chem* 18(10), 514-519.

Wang D, Bodovitz S. (2010) Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends Biotechnol* 28(6), 281-290.

Wang SQ, Wei C, Zhao G, Brochet DX, Shen J, Song LS, Wang W, Yang D, Cheng H. (2004) Imaging microdomain Ca<sup>2+</sup> in muscle cells. *Circ Res* 94(8), 1011-1022.

Warren L. (2008) Single-cell gene-expression analysis by quantitative RT-PCR. Tesis. California Institute of Technology. <http://resolver.caltech.edu/CaltechETD:etd-08012007-102846>

Warren L, Bryder D, Weissman IL, Quake SR. (2006) Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47), 17807-17812.


Wiedenmann J, Oswald F, Nienhaus GU. (2009) Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life* 61(11), 1029-1042.

Wilhelm C, Gazeau F. (2008) Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 29(22), 3161-3174.

Wood JP, Lascaratos G, Bron AJ, Osborne NN. (2008) The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells. *Mol Vis* 14, 334-344.


## Y

You C, Bhaga-wati M, Brecht A, Piehler J. (2009) Affinity capturing for targeting proteins into micro and nanostructures. *Anal Bioanal Chem* 393(6-7), 1563-1570.



*Questions are what matters. Questions, and discovering the right ones, are the key to staying on course... The wave of information threatens to obscure strategy, to drown it in details and numbers, calculation and analysis, reaction and tactics. To have strong tactics we must have strong strategy on one side and accurate calculation on the other. Both require seeing into the future.*

Gary Kasparov, "How Life Imitates Chess"



*Tactics is knowing what to do when there is something to do. Strategy is knowing what to do when there is nothing to do.*

Savielly Tartakower, Polish Chess Grandmaster



