

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 905**

51 Int. Cl.:

B01F 5/06	(2006.01)
C12M 3/00	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
G01N 33/48	(2006.01)
B01F 13/00	(2006.01)
C12M 3/06	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2003 PCT/US2003/031503**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2004 WO04034016**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2003 E 03773139 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1581612**

54 Título: **Dispositivo microfluídico de compartimentos múltiples para investigación en neurociencias**

30 Prioridad:

04.10.2002 US 416278 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2016

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**JEON, NOO LI y
COTMAN, CARL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 588 905 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico de compartimentos múltiples para investigación en neurociencias

5 **Campo de la invención**

La invención descrita en la presente memoria se refiere al campo de la nanotecnología, concretamente a un dispositivo microfluídico de compartimentos múltiples adecuado para investigación en neurociencias.

10 **Antecedentes**

Se describió por primera vez un dispositivo de cultivo de compartimentos múltiples para aislamiento neurítico por Campenot para cultivos primarios de neuronas simpáticas. En este método, se recubre una placa de cultivo celular con colágeno y se raspan líneas paralelas, separadas 200 μm , a lo largo de la superficie de la placa. Se sella una pieza de teflón de tres compartimentos en una placa de Petri con grasa de silicona y se siembran en placa neuronas en la pequeña cámara central de la pieza de teflón. Las neuritas crecen hacia fuera y se adentran en los otros dos compartimentos a ambos lados, alineándose en paralelo a las raspaduras. Se han utilizado variaciones de la cámara de Campenot en estudios de diversos tipos de neuronas de proyección largas. Sin embargo, la cámara de Campenot no funcionaba bien cuando se utilizaba para cultivar neuronas corticales e hipocámpicas.

Ivins, *et al.* desarrollaron una cámara diseñada para cultivos de neuronas corticales e hipocámpicas utilizando una distancia de barrera relativamente corta (150 μm frente a 300 μm en la cámara de Campenot clásica). Estas cámaras utilizan un cubreobjetos de vidrio fijado a tubos de teflón sometidos a hemisección utilizando Sylgard 184 (Dow Corning, Corning NY). Se aplica una pequeña cantidad de grasa de vacío de silicona a la parte inferior del cubreobjetos utilizando un microscopio de disección y se coloca todo el aparato sobre la placa de cultivo tisular. Las neuritas se extienden a través de la barrera de grasa de vacío entre el poliestireno y el cubreobjetos, si la barrera de grasa de vacío es lo suficientemente delgada. Un problema de estos dispositivos es que el procedimiento de producción de las cámaras es laborioso y su éxito está directamente relacionado con el nivel de aptitud del individuo que utiliza el dispositivo. Adicionalmente, no existe una alineación de neuronas y el aparato no es compatible con la obtención de imágenes de células vivas, por tanto, se observaron los efectos de agresiones sólo tras fijarse las células.

El documento EP 1 174 182 A1 da a conocer un microchip para una reacción química. El microchip presenta un sustrato de diamante de tamaño minúsculo. Una pluralidad de partes de combinación de reacción química y una trayectoria de comunicación horizontal que se compone de un canal que se comunica con y conecta dicha pluralidad de partes de combinación de reacción química entre sí se forman en la superficie del sustrato de diamante.

El documento EP 1 199 354 A1 da a conocer un método de formación de un patrón de células sobre una superficie. Se forman patrones previamente en la superficie presentando un patrón de moléculas de fomento del crecimiento celular y/o moléculas de inhibición del crecimiento celular unidas sobre la misma. Se cultivan las células sobre dicha superficie con patrones formados previamente de tal manera que formen un patrón de células sobre dicha superficie.

La patente US nº 5.866.345 da a conocer un dispositivo para detectar la presencia de un analito en una muestra fluida. El dispositivo comprende un sustrato sólido microfabricado para definir un orificio de entrada de muestra, un sistema de flujo a escala media que comprende un canal de flujo de muestra en comunicación de fluido con dicho orificio de entrada, y una zona de detección de analito en comunicación de fluido con dicho canal de flujo, presentando dicha zona de detección unas dimensiones a escala media, y una ventana de detección dispuesta en dicha zona de detección.

50 **Sumario de la invención**

El contenido de la invención es un dispositivo para cultivo neural microfluídico de compartimentos múltiples tal como se define en las reivindicaciones independientes. Se definen las formas de realización de la invención en las reivindicaciones dependientes.

Los métodos de cultivo celular son una técnica de investigación utilizada comúnmente que permite la manipulación sistemática del estado de crecimiento de las células. En cultivo celular, pueden variarse los medios de cultivo y sustrato en condiciones controladas. Con técnicas de cultivo bien conocidas, se expone toda la célula a las mismas condiciones. Sin embargo, para la realización de experimentos esto no siempre es ventajoso. Algunas células pueden ser asimétricas y partes de la célula especializadas. Las neuronas, por ejemplo, están polarizadas y presentan muchos procedimientos que se extienden por distancias relativamente largas (por ejemplo, axones). La invención proporciona un dispositivo que permite al investigador modificar mediante ingeniería microentornos a nivel celular. La capacidad para controlar propiedades fluidicas y de superficie a escala micrométrica, apropiada para la biología celular, utilizando procedimientos de microfabricación proporciona nuevas oportunidades para investigar procesos biológicos fundamentales. Por ejemplo, un investigador puede aislar selectivamente y tratar partes o dominios especializados de la célula. El investigador puede dirigir los sitios de unión neuronal y la orientación y

longitud del crecimiento de neuritas mediante técnicas de obtención de micropatrones tales como impresión por microcontacto. En segundo lugar, manteniendo dominios aislados de manera fluidica dentro del área de cultivo, los investigadores pueden suministrar una serie de estímulos positivos o negativos al soma, los axones o las dendritas. Las neuronas representan un tipo celular excelente para ilustrar el concepto de aislamiento y tratamiento selectivo y, por tanto, se utilizan en la presente memoria a título de ejemplo. Sin embargo, los expertos ordinarios en la materia apreciarán que las neuronas son un caso de prueba y que el dispositivo descrito en la presente memoria presenta una aplicabilidad a otros tipos de células o aplicaciones de tipo biológico.

Las formas de realización de la invención se refieren a un dispositivo neuronal microfabricado que combina técnicas de microfabricación, microfluídicas y obtención de micropatrones de superficie para crear un dispositivo de cultivo neuronal de compartimentos múltiples que presenta aplicación a lo largo de varias utilidades diferentes en neurociencia. Pueden obtenerse patrones en superficies de placas de cultivo de vidrio o plástico con moléculas (por ejemplo, poli-lisina y laminina) para guiar la unión y el crecimiento, y se fabrica un dispositivo microfabricado con microcanales incrustados y se sella contra el sustrato con patrones. Las neuronas colocadas en el interior del dispositivo microfluídico pueden cultivarse hasta que los axones y las dendritas presentan crecimiento a lo largo de una barrera con canales incrustados, pudiendo aplicarse en ese punto estímulos positivos o negativos a partes distales de las neuritas. Dado que el dispositivo permite un control activo y aislamiento fluido de microentornos neuronales u otros, permite a los investigadores explorar nuevas vías de investigación para enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, el investigador puede utilizar el dispositivo para imitar cambios que se predice que suceden en microentornos locales en el cerebro que envejece y enferma. El dispositivo, por ejemplo, es útil en la realización de investigaciones sobre la enfermedad de Alzheimer (EA) cuando se desea la capacidad para revelar agresiones de manera local en partes de una neurona. Por ejemplo, utilizando el dispositivo, un investigador puede controlar los sitios de unión somática, gradientes de depósito de factores de unión en el sustrato, y mantener gradientes de fase de fluido de factores tróficos o agresiones neurotóxicas. Debido a que el dispositivo permite la investigación sobre cómo responden las neuritas y los somas a diferentes microentornos, el dispositivo presenta una amplia aplicabilidad en otras áreas de las neurociencias y es útil en la realización de investigación relativa a lesión de la médula espinal (SCI) y/o otras lesiones o enfermedades que afectan al sistema nervioso.

El dispositivo presenta al menos dos compartimentos conectados por una zona que presenta surcos de tamaño micrométrico en la parte inferior de una zona de barrera, mientras se mantiene la integridad fluidica. La utilización de un polímero ópticamente transparente permite la obtención de imágenes de células vivas, y la microfluídica proporciona un mecanismo para aislar dominios dentro del área de cultivo con la capacidad para suministrar estímulos positivos o negativos al soma, los axones o las dendritas. Cuando se aplican métodos de obtención de patrones en sustratos, el dispositivo puede configurarse para dirigir los sitios de unión neuronal, orientación y longitud de crecimiento de neuritas.

El dispositivo se fabrica en una o más formas de realización utilizando técnicas de litografía suave, tales como polidimetilsiloxano, PDMS. Una vez producido, el dispositivo de PDMS se coloca sobre una placa de cultivo tisular (poliestireno) o un sustrato de vidrio, formando dos o más compartimentos. Estos compartimentos están separados por una barrera física en la que están incrustados varios surcos de tamaño micrométrico para permitir que las neuritas (o alguna otra parte de un organismo celular) crezcan a lo largo de los compartimentos mientras se mantiene aislamiento fluido. Pueden utilizarse volúmenes de menos de 2 μ l cada vez. Sin embargo, se considera todavía que los dispositivos que presentan compartimentos con volúmenes mayores o menores se encuentran dentro del alcance de la invención. Pueden sembrarse en placa células en un compartimento somático (cuerpo celular) y después de un periodo de tiempo (aproximadamente 3-4 días), las neuritas se extienden en el compartimento mediante los surcos. Los pequeños surcos que conectan las dos cámaras presentan suficiente diferencia de presión entre los dos compartimentos que puede lograrse viabilidad durante muchas horas. En una o más formas de realización de la invención, la viabilidad de las neuronas en los dispositivos es de aproximadamente entre el 50-70% después de 7 días en cultivo; esto es ligeramente menor pero comparable con el control que se hace crecer sobre placas de cultivo tisular (el 70%-80%). Por tanto, es evidente una morfología neuronal sana tanto en los dispositivos como en los controles.

Los dispositivos que realizan uno o más aspectos de la invención presentan la capacidad a través de la introducción de presión hidrostática de aislar las agresiones en un compartimento y, por tanto, exponer áreas localizadas de neuronas a las agresiones aplicadas en forma soluble. Por ejemplo, los pequeños surcos que conectan las dos cámaras (por ejemplo, somática y neurítica) presentan suficiente resistencia que una diferencia de presión hidrostática entre los dos compartimentos da como resultado la capacidad para contener y aislar una agresión biomolecular (es decir, beta-amiloide, MW=3-4 kD) en el compartimento de menor volumen durante muchas horas (por ejemplo, 15 o más). Por tanto, pueden contenerse las agresiones en un compartimento (por ejemplo, el compartimento neurítico) sin fugas apreciables al compartimento somático.

Es factible la visualización e identificación de neuronas utilizando obtención de patrones de polilisina en combinación con el dispositivo microfluídico. En uno o más casos, se construye el dispositivo para que presente múltiples cámaras. Al menos una de estas cámaras está configurada para dirigir los sitios de unión neuronal y la orientación del crecimiento de neuritas mediante técnicas de obtención de micropatrones, combinadas con compartimentos aislados de manera fluidica con el área de cultivo. La capacidad para dirigir los sitios de unión neuronal y la

orientación del crecimiento de neuritas mediante técnicas de obtención de micropatrones, combinadas con compartimentos aislados de manera fluidica dentro del área de cultivo ofrece ventajas significativas con respecto a los métodos de cultivo abierto habituales y otros métodos convencionales para manipular distintos microentornos neuronales. El dispositivo puede presentar dos o más compartimentos, permitiendo de ese modo la aplicación de sustancias a más de una ubicación neurítica y puede aplicarse a células neuronales y no neuronales.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un procedimiento para fabricar la cámara neuronal configurada según una forma de realización de la invención.

La figura 2 representa la viabilidad de neuronas en el interior del dispositivo microfabricado configurado según una forma de realización de la invención.

La figura 3 ilustra el aislamiento fluidoico utilizando mediciones de intensidad de fluorescencia de fluoresceína (400 Da) en los compartimentos somático y neurítico.

La figura 4 ilustra una demostración de cultivo neuronal en el interior del dispositivo microfabricado y la eficacia de contención de agresiones neuríticas.

La figura 5 ilustra que cuando se utiliza obtención de micropatrones en sustratos el dispositivo microfabricado permite el crecimiento orientado de procesos neuronales a lo largo de cámaras aisladas de manera fluidica.

La figura 6 ilustra un esquema de los diferentes enfoques para la obtención de patrones en neuronas para controlar la dirección de crecimiento.

La figura 7 ilustra un diagrama esquemático de una red microfluidica y un generador microfluidico representativo.

La figura 8 ilustra micrografías de fluorescencia que muestran gradientes de fluoresceína (b) lineales y (c, d) parabólicos en disolución.

La figura 9 ilustra micrografías de fluorescencia de gradientes complejos posibles con el enfoque microfluidico.

La figura 10 ilustra el efecto de disminuir linealmente la concentración de IL-8 sobre la migración de neutrófilos.

La figura 11 ilustra una representación esquemática del dispositivo de barrera virtual y ejemplos de barreras virtuales entre dos disoluciones marcadas con fluorescencia.

La figura 12 ilustra un esquema para la fabricación de neurocámara microfluidica de barrera virtual.

Aunque las figuras 1 a 6 describen la presente invención, las figuras 7 a 12 proporcionan información útil adicional a la invención.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un dispositivo microfluidico de compartimentos múltiples para neurociencias u otra investigación. En la siguiente descripción a título de ejemplo se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de formas de realización de la invención. Sin embargo, resultará evidente para un experto ordinario que la presente invención puede ponerse en práctica sin incorporar todos los aspectos de los detalles específicos descritos en la presente memoria. Las cantidades y mediciones contenidas en la presente memoria son aproximaciones que pueden variarse en algunos casos en cualquier grado que permita que la invención logre la función para la que está diseñada. En otros casos, no se han descrito en detalle características, cantidades o mediciones específicas bien conocidas por los expertos ordinarios en la materia de modo que no se desdibuje la invención. Debe apreciarse, que aunque se exponen ejemplos de la invención en la presente memoria, las reivindicaciones y el alcance total de cualquier equivalente, son lo que definen los límites de la invención.

Fabricación de dispositivos neuronales

El dispositivo de cultivo neuronal configurado según una o más formas de realización de la invención se crea utilizando técnicas de microfabricación, tales como fotolitografía, para crear un molde maestro con resolución micrométrica. La litografía suave es un método rentable utilizado para replicar cámaras y dispositivos a partir de un molde "maestro", habitualmente utilizando el elastómero, polidimetilsiloxano (PDMS). Por tanto, los dispositivos pueden fabricarse para una sola utilización para minimizar problemas de contaminación y reproducibilidad. Debido a que una vez que se forma un molde, la replicación de un dispositivo de PDMS es relativamente sencilla, el enfoque permite la fabricación reproducible de varios dispositivos para cada serie experimental.

La figura 1 ilustra un procedimiento para fabricar una cámara neuronal configurada según una forma de realización de la invención. Los procedimientos de fabricación ilustrados en la presente memoria son proporcionados a título de ejemplo únicamente y también son posibles otros métodos para producir el dispositivo microfluídico descrito. Tal como se muestra en la figura 1, una pieza superior de la cámara se fabrica de PDMS mediante moldeo contra un molde maestro que presenta un patrón de material fotosensible de dos niveles. Las etapas A y B muestran la formación de microsurcos (3 µm de alto y 10 µm de ancho) en el molde maestro utilizando una capa delgada de material fotosensible. El tamaño de los surcos está diseñado para limitar las neuronas en la cámara somática mientras se permite que los procesos neuríticos en crecimiento atraviesen de una cámara a otra. Sin embargo, los tamaños pueden variar dependiendo de las circunstancias, y otros tamaños que también logran esto mismo o una función similar también se consideran parte de la invención. Los surcos bien definidos con dimensiones controladas permiten que cada cámara funcione de modo aislado de manera fluidica. Las etapas C y D muestran la etapa de fabricación para compartimentos principales para cámaras somáticas y neuríticas. Dos cámaras, separadas por una barrera, forman áreas aisladas de manera fluidica que, por ejemplo, contienen cada una menos de 2 µl de fluido (100 µm de alto, 1500 µm de ancho y 8 mm de largo). Otras disposiciones de cámaras que implican más de 2 cámaras y/o diferentes geometrías de formas también se contemplan comprendidas dentro del alcance de la invención. En la forma de realización de la invención ilustrada en la figura 1, la parte superior del dispositivo se forma mediante moldeo de réplicas de PDMS contra el molde maestro (etapa E). El desmoldeo de PDMS y su sellado en un sustrato plano completa la fabricación de la cámara neuronal (etapa F). En al menos un caso, todo el dispositivo puede caber en un cubreobjetos de vidrio de 25,4 mm x 50,8 mm (1"x2") o un sustrato comparable y compatible con microscopía de fase o DIC y de fluorescencia. El dispositivo puede unirse covalentemente al vidrio mediante tratamiento con plasma de aire o simplemente prensarse sobre placas de cultivo tisular de poliestireno para crear sellados impermeables con los sustratos.

Tal como se mencionó anteriormente, el molde maestro para cada dispositivo puede fabricarse mediante la obtención de patrones en dos capas de material fotosensible. Más específicamente, una impresora de alta resolución (por ejemplo, 7874 ppcm (20.000 ppp)) puede proporcionar un mecanismo para generar una primera máscara de transparencia a partir de un archivo CAD para crear un conjunto de microcanales (por ejemplo, de aproximadamente 10 µm de ancho, separados 50 µm, aunque también se contemplan otras variaciones). Puede hacerse girar el material fotosensible SU-8 5 sobre una oblea de silicio limpiada con plasma de aire a una velocidad de aproximadamente 4000 rpm durante aproximadamente 60 s para obtener un grosor aproximado de 3 µm. Puede utilizarse la máscara de transparencia para obtener patrones en el material fotosensible SU-8 5 y puede utilizarse SU-8 50 como segunda capa y hacerse girar a aproximadamente 1000 rpm durante aproximadamente 60 s. Puede utilizarse una segunda máscara para crear áreas de cámara (por ejemplo, cámaras somática y neurítica) imprimiendo y alineando la segunda máscara con respecto al primer patrón. En una forma de realización de la invención, se imprime la segunda máscara a aproximadamente 2000 ppcm (5080 ppp) con una resolución de aproximadamente 35 µm alineada con respecto al primer patrón. Aunque un experto ordinario en la materia apreciará que también están disponibles otras alternativas de enmascarado.

Después del revelado, puede colocarse la oblea en una placa de Petri limpia y tratarse (por ejemplo, con (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidroxi)triclorosilano) para facilitar la retirada del PDMS del molde maestro. Puede producirse PDMS utilizando una razón 10:1 de prepolímero y catalizador o utilizando cualquier otra técnica de moldeo aceptable. La placa de Petri que contiene la oblea puede calentarse entonces (por ejemplo, en una estufa seca durante 1 hora a 70°C) y puede utilizarse etanol o algún otro producto químico con propiedades de esterilización para esterilizar los dispositivos. Los cubreobjetos de vidrio (22 mm - 30 mm, grosor n.º 1, apropiados) pueden limpiarse mediante sonicación en una disolución en etanol durante 30 min y luego tratarse en un limpiador con plasma de aire durante 10 min para retirar materiales residuales de las superficies. Las placas de cultivo tisular y los cubreobjetos de vidrio pueden recubrirse con poli-L-lisina (Sigma) a 50 µg/ml en H₂O estéril durante 2 horas a temperatura ambiente. Los dispositivos y las placas de cultivo tisular se secan al aire normalmente durante un periodo de tiempo (por ejemplo, durante la noche) antes de su utilización.

Cultivo de neuronas corticales de rata embrionarias

El dispositivo es adaptable para su utilización en una variedad de entornos de cultivo y puede utilizarse, por ejemplo, para cultivar neuronas corticales de rata E18 u otras neuronas. Para fines de ilustración, el procedimiento de utilización de cortezas de embriones de rata E18 se describe en la presente memoria. Sin embargo, tal como reconocerá un experto en la materia a partir de la invención descrita en la presente memoria, la invención no se limita a este ejemplo específico, pero presenta utilizaciones en muchos entornos de cultivo diferentes.

En resumen, pueden diseccionarse cortezas de embriones de rata E18 en CMF-HBSS [solución salina equilibrada de Hank libre de calcio y magnesio (HBSS) que contiene piruvato 1 mM, bicarbonato de sodio 4,2 mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0,3%], enjuagarse con CMF, y resuspenderse en una disolución de tripsina (tripsina al 0,125% en CMF-HBSS que contiene EDTA 0,5 mM) durante 7 min a 37°C o 25 min a la temperatura ambiental. Puede añadirse sobre la tripsinización medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene suero de ternero fetal al 10%, luego puede centrifugarse el tejido a 1000 rpm durante 1 min, y puede resuspenderse el sedimento celular resultante en 2 ml de medio de cultivo (medio neurobasal, Gibco 21103, que contiene suplemento

B27, Gibco i7504, GlutaMAX, Gibco 35050, y penicilina-estreptomicina, Gibco 15070). Tras la trituración a través de pipetas Pasteur pulidas a la llama con el diámetro restringido como máximo al 50%, la suspensión celular puede filtrarse a través de un filtro celular de 40 μm , y determinarse la viabilidad con azul tripano. Pueden sembrarse en placa células con densidades de desde 1 hasta 4×10^6 células/ml. Para sembrar en el interior de dispositivos microfabricados, puede diluirse la suspensión celular 25 veces con respecto al control para obtener una densidad celular por área comparable.

Microscopía

Pueden tomarse imágenes de contraste de fase y de epifluorescencia de cultivos dentro del dispositivo utilizando un sistema de captura de imagen digital (por ejemplo, un microscopio invertido NikonTE300), una cámara CCD y MetaMorph (Universal Imaging, PA). Puede utilizarse DG-4 como fuente de luz de excitación que presenta un obturador interno controlado por MetaMorph para tomar imágenes en el transcurso del tiempo a diferentes longitudes de onda de excitación. También es factible utilizar una platina motorizada para tomar imágenes en múltiples ubicaciones en la totalidad de las muestras. El beneficio de utilizar esta o cualquier otra técnica de imagen es que permite al investigador monitorizar la actividad dentro del dispositivo microfluídico con fines de observación. Por tanto, la invención contempla la utilización de cualquier sistema de imagen adaptado para su utilización con el dispositivo microfluídico descrito en la presente memoria.

Obtención de patrones en sustratos

Es factible absorber selectivamente y obtener patrones de poli-L-lisina en la superficie de placas de cultivo tisular. El molde elastomérico de PDMS, que presenta (por ejemplo) líneas de 25 μm y espacios con una profundidad de 50 μm , puede colarse a partir de obleas de silicio con patrones generadas con SU-8 50 utilizando fotolitografía. La mezcla 10:1 desgasificada de elastómero y agentes de curado puede verterse entonces sobre un patrón maestro y curarse a 70°C durante 1 hora. Puede esterilizarse el molde de PDMS con etanol y permitirse que se seque durante al menos 1 h; puede utilizarse una placa de cultivo tisular estéril como sustrato para el molde. Puede ponerse una gota de una disolución de 50 $\mu\text{g/ml}$ de poli-L-lisina (PLL) en agua desionizada (DI) estéril en un extremo abierto de la red de canales, que llena los canales por acción capilar. Después de llenar los canales, se incuba la disolución durante un periodo de tiempo (por ejemplo, una hora) para permitir la absorción sobre la superficie. Después de esta etapa, se retira el molde de PDMS y se utiliza una disolución tampón nueva o agua desionizada estéril para eliminar por lavado la disolución en exceso.

Puede utilizarse impresión por microcontacto para crear poli-L-lisina sobre el cubreobjetos. La estampa elastomérica de PDMS que presenta líneas de 25 μm y espacios con una profundidad de 10 μm puede colarse a partir de obleas de silicio con patrones generadas con SU-8 10 utilizando fotolitografía. La mezcla 10:1 desgasificada de elastómero y agente de curado puede verterse sobre un patrón maestro y curarse a 70°C durante 1 hora. La estampa de elastómero puede desprenderse del patrón maestro después de enfriamiento. Puede prepararse la tinta bajo la atmósfera ambiental utilizando una disolución 5 mg/ml de octadeciltriclorosilano (OTS) en un disolvente de hexano. La cara con patrones de la estampa de PDMS puede recubrirse con una disolución de OTS mediante una técnica de recubrimiento por rotación a 1500 rpm durante 30 segundos, secarse en una corriente de argón durante 30 segundos, y luego colocarse encima de una superficie de vidrio limpiada previamente y mantenerse en contacto con la estampa tintada durante 30 segundos. Después de la impresión por contacto, la muestra con patrones de OTS puede enjuagarse meticulosamente con alcohol isopropílico y sumergirse en una disolución de 50 $\mu\text{g/ml}$ de PLL en agua durante 2 horas. Una vez creada, la muestra puede enjuagarse con agua y secarse. Pueden verificarse los micropatrones en los sustratos de vidrio utilizando microscopía de fluorescencia; la superficie con micropatrones puede exponerse a una disolución de isotiocianato de fluoresceína (FITC; Molecular Probes, Eugene, OR) 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS (pH 7,4, 50 mM) a 37°C durante 30 min: el grupo NH_2 terminal reacciona con el grupo isotiocianato de FITC produciendo patrones de PLL conjugada con FITC. El sustrato de vidrio con patrones puede lavarse entonces con agua DI y etanol.

Diseño de dispositivos neuronales

En una o más formas de realización de la invención, se fabrican los dispositivos de cultivo neuronal de PDMS. Producir los dispositivos utilizando PDMS es beneficioso (pero no se requiere) porque: (1) PDMS es ópticamente transparente y muy adecuado para la obtención de imágenes de células vivas, (2) pueden producirse muchos moldes a partir del mismo molde maestro con resultados reproducibles, (3) PDMS puede sellarse covalentemente en vidrio utilizando unión por plasma, y (4) también puede producirse un sellado impermeable con poliestireno u otros sustratos planos mediante contacto conforme. Pueden utilizarse placas de cultivo tisular tanto de vidrio como de poliestireno como sustratos para el dispositivo.

Es posible permanecer dentro del alcance y espíritu de la invención adaptando la forma y disposición generalizada de los dispositivos de cultivo neuronal descritos en la presente memoria. Cualquier dispositivo que comprenda al menos dos compartimentos independientes (por ejemplo, compartimentos neurítico y somático) y que presente una zona central, independientemente de la forma, se encuentra dentro del alcance de la invención. Los compartimentos

neurítico y somático están conectados por una zona central que presenta varios microsurcos de una determinada anchura, altura y longitud. Diversos tamaños, formas, configuraciones y número de surcos son posibles. Por ejemplo, un dispositivo de compartimentos múltiples aísla somas en un solo compartimento, mientras que permite que crezcan las neuritas a través de una barrera con canales de tamaño micrométrico incrustadas en una cámara que contiene únicamente neuritas. La distancia de la zona central puede variar. Por ejemplo, cuando se utilizan cultivos de neuronas corticales e hipocámpicas, puede ser necesario optimizar el crecimiento creando una cámara que permite que las neuritas entren en el compartimento exterior después de un periodo de crecimiento moderado. A veces son útiles cámaras con una distancia de barrera relativamente corta (por ejemplo, $\approx 100 \mu\text{m}$ frente a $\approx 300 \mu\text{m}$). Las técnicas de microfabricación garantizan que el dispositivo puede aislar de manera fluidica las cámaras somática y neurítica mientras que todavía permiten que crezcan las neuritas a través de la barrera. El dispositivo microfluidico configurado según la invención presenta zonas de barrera virtual o física.

En una forma de realización de la invención, por ejemplo, el dispositivo contiene 120 surcos, de $10 \mu\text{m}$ de ancho, $3 \mu\text{m}$ de alto y $150 \mu\text{m}$ de longitud. Los surcos pueden estar separados, por ejemplo, $50 \mu\text{m}$ para impedir que colapsen los surcos. Otros tamaños de surcos y separaciones son posibles, pero en términos generales el tamaño de los surcos debe ser lo suficientemente pequeño como para que las neuronas disociadas durante la carga no pasen al compartimento neurítico contiguo. Este diseño simplifica el procedimiento de carga y permite la colocación selectiva de neuronas en un compartimento.

En una forma de realización de la invención, se colocan orificios en cada dispositivo que sirven como entradas de carga y depósitos de medio celular para el intercambio de gases y nutrientes. El dispositivo puede contener, por ejemplo, cuatro orificios (de 8 mm de diámetro), dos en ambos extremos de cada compartimento. Cuando se utilizan orificios pequeños (de $2,3 \text{ mm}$ de diámetro), los dispositivos se secan rápidamente después de unos pocos días. Aunque se añada frecuentemente medio de cultivo celular, existe una baja viabilidad celular con orificios tan pequeños debido al escaso intercambio de nutrientes, desechos y gases tales como CO_2 . En una forma de realización ejemplificativa, el volumen en cada compartimento cubierto (es decir, sin los depósitos) es de menos de $2 \mu\text{l}$. En comparación, los depósitos combinados para cada compartimento pueden contener hasta $400 \mu\text{l}$. Al disponer de volúmenes de cultivo tan pequeños, pueden reducirse las cantidades de reactivos con respecto a los métodos de cultivo tradicionales.

Después de un periodo de tiempo variable (por ejemplo, de aproximadamente 3-4 días) de crecimiento, las neuritas del compartimento somático se extienden en el compartimento neurítico. Aunque son factibles otras velocidades de crecimiento, la velocidad de crecimiento de neuritas en pruebas realizadas utilizando formas de realización de la invención fue de entre 50 y $100 \mu\text{m}$ al día. Después de una cantidad de tiempo apropiada (por ejemplo, 7 días, o cuando se desea una agresión), puede transferirse una cantidad de medio (por ejemplo, $15 \mu\text{l}$) del compartimento neurítico al compartimento somático, dejando una diferencia neta de volumen (por ejemplo, de $30 \mu\text{l}$, suponiendo que se han equilibrado los volúmenes en los dos compartimentos durante los últimos 7 días). Puede administrarse entonces una disolución (por ejemplo, $5 \mu\text{l}$) que contiene la agresión al lado neurítico. Cuando se realizan estas operaciones, es importante proceder con precaución cuando se añaden y retiran cantidades equivalentes a los pocillos en el mismo lado para minimizar efectos de flujo convectivo.

Barrera virtual

La barrera virtual no forma parte de la presente invención, pero se describe con fines ilustrativos.

Las cámaras de barrera virtual se basan en el hecho de que el flujo de líquidos en capilares presenta a menudo un bajo número de Reynolds (Re) y es laminar. Cuando confluyen dos o más corrientes con bajo Re para proporcionar una sola corriente, las corrientes combinadas fluyen en paralelo entre sí sin mezclado turbulento. Esta capacidad para generar y sostener corrientes paralelas de diferentes disoluciones en capilares entre dos corrientes puede utilizarse como barrera virtual. Haciendo pasar corrientes de diferentes disoluciones que contienen medios (verde) y agresión (rojo) sobre las neuronas, el dispositivo puede mantener una barrera virtual y exponer solamente una parte seleccionada de la neurona a los estímulos o la agresión. La figura 11 ilustra una representación esquemática del dispositivo de barrera virtual y ejemplos de barreras virtuales entre dos disoluciones marcadas con fluorescencia. Puede colocarse una pieza de PDMS que contiene microcanal en forma de Y incrustado en su superficie y unirse a un cubreobjetos de vidrio para formar una red de canales. Pueden infundirse fluidos en el canal utilizando bombas de jeringa tal como se indica en el esquema. La micrografía de fluorescencia muestra la unión en la que convergen las dos corrientes, una que contiene dextrano marcado con FITC (representativo de los medios) y la otra que contiene dextrano marcado con Texas Red (representativo de la agresión). La anchura relativa de las corrientes puede controlarse ajustando las velocidades de flujo volumétricas de las corrientes. La razón volumétrica de flujo verde/rojo varió entre 1, 3 y 5 para (A), (B), (C) respectivamente. La figura 11 representa la demostración satisfactoria de la cámara de barrera virtual. El dispositivo microfluidico puede prepararse colocando una pieza de PDMS con canales incrustados (de $300 \mu\text{m}$ de ancho y $100 \mu\text{m}$ de alto) sobre un sustrato plano. Puede fabricarse una forma de realización como un microcanal "en forma de Y" que presentan dos entradas que convergen en un solo canal principal. Las dos entradas se conectaron a bombas de jeringa que contenían FITC-dextrano (verde) y Texas Red-dextrano (rojo), respectivamente. Permitiendo que fluyan diferentes disoluciones desde las entradas, se crearon

corrientes paralelas de diferentes líquidos en el canal principal. En estas condiciones, no existe turbulencia y las corrientes fluyen unas junto a otras con mezclado por difusión. La anchura de la corriente y la posición de la interfase entre corrientes adyacentes pueden controlarse ajustando las cantidades relativas de fluido inyectado en cada entrada. A medida que se aumentó la razón de velocidad de flujo para la disolución verde/roja, aumentó la anchura relativa de las disoluciones verdes de manera correspondiente tal como se muestra en la serie de micrografías de fluorescencia en las figuras 11a a 11c.

La figura 12 ilustra un esquema para la fabricación de una neurocámara microfluídica de barrera virtual. Este diseño utiliza un diseño de “canal en Y” que se aprovecha de las características de flujo laminar del comportamiento de flujo para exponer selectivamente partes de neuronas a agresiones apoptóticas. Sin embargo, son factibles diseños que presentan otras geometrías. La rápida obtención de prototipos de tales dispositivos a medida puede realizarse en menos de 24 horas. Por tanto, es posible probar muchas geometrías diferentes. El procedimiento comienza con el diseño de la maqueta del dispositivo utilizando un programa CAD a partir del que se generará una fotomáscara de transparencia de alta resolución. Esta fotomáscara puede utilizarse para exponer selectivamente un material fotosensible (polímero sensible a la luz) grueso que se hizo girar sobre un sustrato plano (es decir, oblea de Si), figura 12A. El revelado del material fotosensible dejará un relieve positivo que puede servir como molde maestro que presenta un relieve positivo (150 μm) de microcanal “en forma de Y”, figura 12B. Se formará un relieve negativo de PDMS mediante colado y curado del prepolímero de PDMS frente al molde maestro positivo, figura 12C. Esta réplica de PDMS con canal incrustado puede unirse contra un sustrato de vidrio para producir las cámaras y los sistemas de canales microfluídicos requeridos. Pueden perforarse orificios de entrada y salida para el fluido y las células a partir del PDMS utilizando una herramienta afilada, figura 12D. Debe esterilizarse el dispositivo completado utilizando etanol y secarse antes de su utilización.

Barrera física

La fabricación de la cámara de barrera física según la presente invención es similar a la cámara de barrera virtual excepto por una etapa de fotolitografía adicional para generar una serie de pequeños canales en la barrera que permitirán que crezcan los procesos de neuronas a lo largo de la barrera al tiempo que se minimiza el mezclado de fluidos. La primera etapa de fotolitografía (figuras 1A y 1B) genera el relieve de canales estrechos y delgados con dimensiones de menos de 10 μm . La longitud de los canales, que define la longitud de la barrera entre las cámaras somática y neurítica, puede variar entre ≈ 50 y ≈ 200 μm . La anchura de barrera óptima que permite que las neuritas crezcan a lo largo en un tiempo razonable (varios días) y aún realicen una función de barrera reproducible depende de las situaciones de la prueba. El tamaño así como la densidad de estos canales pueden variarse para un crecimiento óptimo. La segunda etapa de fotolitografía, figuras 1C y 1D, definirá los microcompartimentos en los que se cultivarán las neuronas. Estas áreas serán relativamente más grandes (de 150 μm de alto, 1500 μm de ancho y 1,5 cm de largo) en comparación con el primer patrón para los canales.

Una vez que se fabrica el molde maestro, puede colarse y curarse el prepolímero de PDMS para replicar el patrón en relieve, y colocarse sobre un sustrato plano para completar el dispositivo. Antes de ensamblar el PDMS con un sustrato, pueden perforarse orificios para depósito en el PDMS utilizando una simple herramienta afilada para permitir la adición y retirada de medios y otras agresiones. Debido a que el volumen total de líquido para llenar la cámara de este tamaño es minúsculo (≈ 25 μl) en comparación con los volúmenes necesarios para una cámara de Campenot o placa de Petri convencional (varios ml), la cantidad de agresiones y medios requeridos para los experimentos se reduce drásticamente.

Otro diseño sería someter a ataque químicos los microcanales en el sustrato de vidrio o plástico al tiempo que se mantiene una barrera sólida en PDMS. La fabricación del dispositivo microfluídico es más sencilla y más fácil de usar si puede utilizarse con cualquier sustrato plano. La fabricación de canales en el sustrato requerirá el acceso a salas blancas e instrumentos sofisticados a los que no tienen acceso la mayoría de laboratorios de biología. Si el dispositivo de barrera física no puede mantener la integridad fluidica, el investigador puede cargar diferentes cantidades de líquido en las cámaras de tal manera que el flujo lento de líquido contrarresta el mezclado de agonistas en la cámara somática. Por ejemplo, puede añadirse ligeramente más volumen de líquido en la cámara somática en comparación con la cámara neurítica (en la que se introducirán agresiones) para generar presión hidrostática de tal manera que las agresiones desde la cámara neurítica no prosperen a lo largo de la barrera.

Diseño de la cámara

Tal como se expone en la sección anterior, se representan dos diseños de cámara distintos, pero también son factibles otros diseños o un híbrido de ambos diseños. Los dos diseños representados presentan diferentes ventajas y desventajas. Aunque el diseño y la fabricación de la cámara de barrera virtual (que no es según la invención) son más sencillos, el experimento que utiliza este dispositivo requiere más mano de obra y equipos. De la manera más importante, esta cámara requiere una bomba de jeringa dedicada (u otros modos adecuados para suministrar dos o más corrientes que contienen medios y agresión de manera controlada) de tal manera que sólo puede realizarse un experimento con un dispositivo. Puesto que la barrera virtual sólo existe para la perfusión constante de fluidos, la

cantidad de reactivos requeridos para este método puede ser significativa (varios ml), comparable a lo que ocurre para métodos convencionales.

5 En comparación, el diseño de barrera física según la presente invención permite experimentos en un modo paralelo, es decir, pueden prepararse varias cámaras, cargarse con neuronas, y aún puede utilizarse cada cámara para someter a prueba diferentes condiciones experimentales. El principal inconveniente del diseño de barrera física es que la fabricación del molde "maestro" supone un reto más importante y precisa esfuerzos de ingeniería considerables para optimizar el diseño de la cámara para garantizar que las cámaras están aisladas de manera fluidica. Para determinar un diseño óptimo, la cámara de barrera física puede someterse a prueba de manera
10 extensa utilizando colorantes fluorescentes y marcados con isótopos.

Viabilidad de neuronas en el interior del dispositivo microfabricado

15 La viabilidad de neuronas en el dispositivo es importante porque demuestra que las neuronas son sanas y no se ven adversamente afectadas por el microentorno del dispositivo y los materiales que se utilizaron en la fabricación. Cuando se compara la viabilidad de neuronas en el interior del dispositivo microfabricado con un control (placa de cultivo tisular) después de 7 días de cultivo, puede determinarse una estimación en cuanto a la viabilidad. Se evaluó la viabilidad utilizando tinción de células vivas/muertas con homodímero de etidio y calceína AM (Molecular Probes). Se muestran los resultados en la figura 2. La viabilidad en el dispositivo fue aproximadamente 10-20% menor que en los controles de cultivo tisular. La viabilidad de neuronas puede ser muy sensible con respecto a la densidad celular. Para obtener datos de viabilidad exactos, se realizaron pruebas utilizando densidades celulares similares en los dispositivos y controles. Se utilizó una densidad de siembra en placa de 3×10^6 células/ml para los dispositivos y se diluyó esto 1:25 para los controles de cultivo tisular que proporcionaron un promedio de $1,5 \times 10^5$ células/cm² tanto para dispositivos como para controles. Para cada experimento, se utilizaron tres dispositivos y un control. Si se consideró que los tres dispositivos eran equivalentes, se realizó la tinción de células vivas/muertas solamente en una de las muestras. Morfológicamente, las células en los dispositivos eran equivalentes a los controles tal como se muestra en la figura 2A, B. La viabilidad ligeramente menor en el interior de los dispositivos puede deberse a un aumento de la concentración de sal debido a evaporación y un menor intercambio de gases y nutrientes debido al menor volumen total de medios. Además, puede quedarse atrapada una razón aumentada de células muertas en el dispositivo debido a la pequeña altura de compartimento (100 μm).
20
25
30

Aplicación dirigida, aislamiento y caracterización de agresiones

35 El dispositivo neuronal configurado según al menos una forma de realización de la invención permite a los usuarios iniciar agresiones dirigidas aislando la agresión en el compartimento neuronal utilizando presión hidrostática o algún otro modo para minimizar la migración/difusión a otros compartimentos (por ejemplo, el compartimento somático). Para preparar el dispositivo para iniciar tales agresiones, el usuario sella normalmente la parte superior del dispositivo en una placa de cultivo. Por ejemplo, el usuario puede sellar por contacto el PDMS encima de la placa de cultivo tisular recubierta con polilisina. El dispositivo microfabricado puede llenarse entonces con PBS (≈ 200 μl en cada cámara somática y neurítica) y colocarse en un incubador saturado con agua durante 12 h para que se igualen los niveles de fluido. Una vez que se prepara de manera apropiada el dispositivo, puede utilizarse el siguiente procedimiento a título de ejemplo para crear presión hidrostática entre las cámaras: puede añadirse una cantidad de PBS (por ejemplo, aprox. 125 μl) al compartimento somático, dividiendo el volumen entre los dos depósitos. Luego, puede añadirse rápidamente una cantidad (por ejemplo, aproximadamente 100 μl) de fluoresceína (6 μM) en PBS al compartimento neurítico, de nuevo dividiendo el volumen entre los dos depósitos. El volumen ligeramente mayor en el lado somático provoca un flujo neto lento de líquido del compartimento somático al neurítico que actúa en contra de las fugas o la difusión de fluoresceína del compartimento neurítico al somático.
40
45

50 Para determinar la eficacia, pueden tomarse imágenes de fluorescencia cada media hora durante más de 15 h utilizando un tiempo de exposición de 200 ms con un filtro de FITC en tres ubicaciones independientes a cada lado de las cámaras somática y neurítica. Pueden obtenerse mediciones de intensidad registrando la lectura de intensidad promedio de cada imagen. La figura 3 ilustra el aislamiento fluido utilizando mediciones de intensidad de fluorescencia de fluoresceína (400 Da) en los compartimentos somático y neurítico. El lado izquierdo es la cámara somática (300), y el derecho es la cámara neurítica (304). La línea blanca de puntos delinea los límites de la barrera (302). (A) La micrografía de fluorescencia inicial (t = 1 h) muestra que la fluoresceína se aísla en el compartimento neurítico. (B) Una micrografía de fluorescencia de la misma zona después de 15 h muestra que la agresión está todavía aislada en el compartimento neurítico. (C) muestra la intensidad de fluorescencia de fluoresceína en los compartimentos somático y neurítico en función del tiempo (306). La intensidad de fluorescencia en el lado somático a niveles de fondo (por ejemplo, por debajo del 7% de la intensidad máxima (es decir, nivel de ruido)) durante más de 15 h, indicando que no existen fugas de fluoresceína al compartimento somático durante este periodo. La intensidad de fluorescencia de fluoresceína en el compartimento neurítico disminuye hasta el 50% del máximo debido a dilución por el flujo neto de fluido desde el compartimento somático. Se obtuvieron resultados similares para dispositivos con vidrio (datos no representados). El gráfico indica que se aísla la fluoresceína en el lado neurítico en la totalidad del periodo de medición, pero podría sostener tal aislamiento durante periodos de tiempo
55
60
65 más prolongados.

Existen diversos modos de ilustrar la función y la eficacia del dispositivo descrito en la presente memoria. En una forma de realización de la invención, pueden cultivarse neuronas en el dispositivo microfabricado de manera que permite que las neuritas se extiendan por el compartimento neurítico. La figura 4 ilustra una demostración de cultivo neuronal en el interior del dispositivo microfabricado y la eficacia de contención de agresiones neuríticas.

5 Pueden añadirse calceína AM y Texas Red-dextrano (MW) 10 kDa) a la cámara neurítica para una mejor visibilidad antes de tomar las micrografías. Puede configurarse una diferencia de presión hidrostática positiva entre las cámaras somática y neurítica tal como se explica en la figura 3. La figura 4A es una micrografía de contraste de fase de las neuronas en el dispositivo microfabricado después de un periodo de tiempo en cultivo (por ejemplo, 4 días).
 10 Se añadieron Texas Red-dextrano (10 kDa) y calceína AM (1 kDa) al compartimento neurítico 1 h antes de tomar la micrografía de fluorescencia, figura 4B. Se estableció una ligera altura piezométrica, correspondiente a un volumen diferencial de 20 μ l de medio, en el lado somático para garantizar que el dextrano o la calceína AM no migraban del lado neurítico al somático. Se utilizó Texas Red-dextrano para simular la agresión en el compartimento neurítico y se delinea claramente por el límite de la barrera (figura 4B). Puesto que se añadió calceína AM al compartimento
 15 neurítico, solamente se iluminaron las neuronas con procesos que entran en este compartimento. La imagen de contraste de fase muestra neuronas adicionales que no se tiñeron con calceína AM porque no presentaban procesos que se extiendan en el compartimento neurítico; esto ilustra que el compartimento neurítico está aislado de manera fluidica.

20 Obtención de micropatrones en sustratos

Además de simplemente aislar somas de sus procesos, formas de realización de la invención pueden obtener patrones de crecimiento de neuritas en el sustrato en el interior del dispositivo microfabricado. La obtención de
 25 micropatrones de las células y sus procesos facilita la identificación de células y mejora la visualización de resultados. Por ejemplo, si es necesario investigar la perturbación en el transporte de cargas celulares tales como mitocondrias después de lesión hasta procesos neuronales distales, es de ayuda determinar la dirección de transporte identificando la posición relativa de un soma con respecto a sus neuritas. En un cultivo al azar en una placa de cultivo tisular, debido a las neuritas y los axones en redes enmarañadas, esta simple determinación no puede realizarse fácilmente. Si el cuerpo celular está situado en un lado del dispositivo (en el lado somático) y se
 30 guían y se orientan sus procesos en una dirección predeterminada, puede simplificarse enormemente la determinación de transporte anterógrado o retrógrado.

La figura 6 ilustra un esquema de los diferentes enfoques para la obtención de patrones en neuronas. Puede utilizarse fotolitografía (A), micromoldeo en capilares (MIMIC) (B), impresión por microcontacto (C), y cualquier otra
 35 metodología que logre el mismo resultado o uno similar para obtener patrones de proteínas que fomentan la unión y el crecimiento neuronales selectivos y confinan el crecimiento de neuritas.

Cuando se utiliza fotolitografía para generar tales patrones, se reviste un sustrato de vidrio o poliestireno recubierto con poli-lisina o laminina, con una máscara (600) (por ejemplo, fotomáscara de cromo sobre cuarzo) y se ilumina con
 40 luz UV (por ejemplo, una lámpara de mercurio de baja presión). Una fotomáscara (600) que presenta tiras de zonas opacas da como resultado un patrón positivo de tiras de proteínas protegidas. Se expondrá la laminina (602) bajo el área transparente de la fotomáscara a UV y se inactiva (604), perdiendo tanto su actividad de fomento del crecimiento de neuritas como gran parte de su reactividad con anticuerpos antilaminina. La poli-lisina expuesta a UV
 45 también muestra propiedades similares.

El micromoldeo en capilares (MIMIC) representa una alternativa a la fotolitografía que puede producir patrones de proteínas así como otras moléculas biológicas. En MIMIC, se coloca un molde elastomérico (PDMS) sobre el sustrato con una estructura en relieve en el molde que forma una red de canales vacíos. Con la geometría de canal
 50 correcta, una disolución acuosa colocada en un lado de los canales los llenará por acción capilar. Entonces se deja la disolución en los canales durante una cantidad de tiempo fijada para permitir la absorción sobre la superficie.

Otro método a título de ejemplo de obtención de patrones, la impresión por microcontacto, puede utilizarse para crear líneas de poli-L-lisina en el cubreobjetos. La impresión por microcontacto utiliza una estampa elastomérica (PDMS con una estructura en relieve con patrones en su superficie) para imprimir una variante de moléculas con
 55 resolución micrométrica. Puede producirse una estampa elastomérica mediante curado de PDMS frente a un molde maestro microfabricado. La superficie se recubre con las moléculas deseadas (para impresión de proteínas, se expone la estampa de PDMS a plasma de oxígeno para volver su superficie hidrófila) y se pone en contacto conforme con el sustrato. Si se utiliza una estampa con tiras de líneas (regiones elevadas) separadas por espacios (regiones rebajadas) tal como se muestra en la figura, las moléculas/proteínas de la zona elevada se transferirán
 60 sobre el sustrato huésped. La impresión por microcontacto presenta la ventaja de simplicidad y conveniencia: una vez que está disponible la estampa, pueden producirse múltiples copias del patrón de proteína utilizando un método sencillo. La impresión por microcontacto funciona particularmente bien en sustratos de vidrio debido a la superficie lisa del vidrio.

La figura 5 ilustra que cuando se utiliza obtención de micropatrones en sustratos, el dispositivo microfabricado permite el crecimiento orientado de procesos neuronales a lo largo de cámaras aisladas de manera fluidica. La

invención contempla diversos mecanismos para la obtención de patrones en sustratos, sin embargo, en una forma de realización ejemplificativa (véase por ejemplo, la figura 5A) micrografía de fluorescencia de líneas con patrones de polilisina conjugadas con FITC en una placa de cultivo tisular de poliestireno. Puede utilizarse MIMIC para obtener patrones en líneas con anchuras de 25 μm y una separación de 25 μm . Las líneas brillantes indican la zona de polilisina con patrones conjugada con FITC. La figura 5B ilustra micrografía de fluorescencia de líneas de polilisina impresas por microcontacto conjugadas con FITC en un cubreobjetos de vidrio. Puede utilizarse impresión por microcontacto para obtener patrones en líneas con anchuras de 25 μm y una separación de 25 μm . La figura 5C representa una micrografía de fase de neuritas que atraviesan la barrera desde la cámara somática a la neurítica mediante los surcos al tiempo que siguen el patrón de polilisina en una placa de cultivo tisular con patrones mediante MIMIC (por ejemplo, líneas de 25 μm de ancho con una separación de 25 μm).

Tal como se mencionó brevemente anteriormente y se describe a continuación con mayor detalle, formas de realización de la invención utilizan MIMIC para obtener patrones en placas de cultivo tisular con polilisina. MIMIC representa una técnica que puede obtener patrones de proteína y otras moléculas biológicas. En MIMIC, se coloca el molde de PDMS en la superficie del sustrato de plástico y entra en contacto conforme con el sustrato. La estructura en relieve en el molde forma una red de canales vacíos. Es aconsejable utilizar condiciones estériles para crear estos patrones de MIMIC. Cuando se retira el molde de PDMS, permanece un patrón de proteína en el sustrato. La figura 5A representa una micrografía de fluorescencia de FITC, que se conjugó con grupos amina en la polilisina. La impresión por microcontacto (μCP) es un método eficaz para la obtención de patrones de proteínas, polímeros y monocapas autoensambladas (SAM). La impresión por microcontacto utiliza una estampa elastomérica (PDMS con una estructura en relieve con patrones en su superficie) para imprimir una variedad de moléculas con resolución micrométrica. Puede producirse una estampa elastomérica mediante el curado de PDMS frente a un molde maestro microfabricado. La superficie se recubre con las moléculas deseadas (para imprimir proteínas, se expondrá la estampa de PDMS a un plasma de oxígeno para volver su superficie hidrófila) y se pone en contacto conforme en con el sustrato. Si se utiliza una estampa con tiras de zonas elevadas separadas por zonas rebajadas, las moléculas/ proteínas de la zona elevada se transfieren sobre el sustrato huésped. La figura 5B representa el patrón de polilisina conjugada con FITC en vidrio utilizando impresión por microcontacto. La figura 5C representa el crecimiento de neuritas a lo largo de la barrera, mediante los surcos, a lo largo de líneas de polilisina con patrones. Puede formarse el patrón de polilisina en una forma de realización de la invención en una placa de cultivo tisular utilizando MIMIC. La obtención de patrones de los sustratos con polilisina antes del ensamblaje con un dispositivo de PDMS se simplifica debido a que el patrón de polilisina puede secarse e incluso esterilizarse con etanol. Esta figura ilustra que los métodos de obtención de patrones en sustratos (por ejemplo, impresión por microcontacto y MIMIC) pueden combinarse con un dispositivo microfabricado para dirigir los sitios de unión neuronal y la orientación de crecimiento de neuritas. Combinado con compartimentos aislados de manera fluidica, este enfoque ofrece ventajas significativas con respecto a métodos de cultivo abierto habituales y otros métodos convencionales para manipular distintos microentornos neuronales.

Generador de gradientes microfluídicos

Los generadores de gradientes microfluídicos están fuera del alcance de la presente invención, pero se describe para ilustración.

La figura 7 ilustra un diagrama esquemático de una red microfluídica y un generador microfluídico representativo. Los dos canales entrantes (A y B) se conectan a fuentes de fluido (por ejemplo, disoluciones de colorante). A medida que las corrientes de colorantes se desplazan por la red, se dividen repetidamente en los nodos, se combinan con corrientes vecinas y se permite que se mezclen por difusión en los canales de serpentín. Cuando se combinan las corrientes en un solo canal ancho después de varias generaciones de canales de ramificación, se forma un gradiente en la concentración del colorante a lo largo del canal en perpendicular a la dirección de flujo.

La generación de gradientes utilizando una red de canales microfluídicos se basa en el mezclado controlado de fluidos de flujo laminar mediante división repetida, mezclado y recombinación de corrientes de fluido. Puesto que el intercambio de moléculas entre corrientes laminares se produce exclusivamente por difusión, es importante que los canales sean estrechos (20-50 μm) y el intervalo de tiempo que dos corrientes de flujo laminar pasan fluyendo una al lado de otra en el canal de serpentín sea lo suficientemente largo como para que los fluidos se mezclen por completo (la longitud de la zona de mezclado de serpentín era de 10 mm, y las velocidades de flujo eran de entre 0,1-1 mm/s).

Una molécula pequeña (por ejemplo, fluoresceína) difunde aproximadamente 55 μm en el plazo de un segundo (utilizando $D = 5,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ para fluoresceína). Al final del canal amplio, se recoge el fluido en un depósito de desechos. El perfil de concentración en una sección particular a lo largo de los pequeños canales de la red o el canal amplio es constante a lo largo del tiempo (es decir, las concentraciones dentro del canal están en estado estacionario), porque las disoluciones se añaden y se retiran continuamente del sistema.

La figura 8 ilustra micrografías de fluorescencia que muestran gradientes de fluoresceína (b) lineales y (c, d) parabólicos en disolución. La red microfluídica utilizada para generar estos gradientes presentaba 3 entradas y 9

salidas (a). La concentración de las disoluciones introducidas en cada entrada de la red microfluídica se indica encima de las micrografías. Las representaciones gráficas por encima de las micrografías muestran el perfil de intensidad de fluorescencia correspondiente (línea verde) a lo largo del canal amplio (900 μm de ancho) 500 μm aguas abajo (L, línea de puntos blanca) desde la unión. Los perfiles de concentración de fluoresceína calculados teóricamente se muestran como puntos redondos negros. Los puntos y las líneas grises en las gráficas muestran la contribución calculada de las entradas individuales al perfil global. La velocidad de flujo en el canal amplio es de 1 mm/s. Utilizar una red de canales microfluídicos se basa en el mezclado controlado de fluidos de flujo laminar mediante la división repetida, el mezclado y la recombinación de corrientes de fluido. La figura 8 muestra tres perfiles de concentración distintos generados utilizando una red que presenta tres entradas y nueve salidas; los gradientes se obtuvieron permutando el orden en las entradas de tres disoluciones diferentes que contenían fluoresceína al 100, al 50 y al 0% (fluoresceína en tampón NaHCO_3 100 mM, pH 8,3). El propósito de este tipo de dispositivo microfluídico es dividir, combinar y mezclar las disoluciones introducidas en la entrada de modo controlado. Al tiempo que se mantiene bajo el número de entradas, la división en la red piramidal aumenta el número de corrientes que portan diferentes concentraciones y que se juntan en el canal amplio. Como resultado, pueden aproximarse gradientes complejos con gradientes escalonados compuestos por un gran número de pequeños escalones. La variedad de formas de gradiente que pueden producirse utilizando este método incluye lineales, parabólicas, periódicas, y otras.

La figura 9 ilustra micrografías de fluorescencia de gradientes complejos posibles con el enfoque microfluídico. (A) Micrografías de dos gradientes periódicos diferentes que consisten en partes lineales (en diente de sierra) y partes parabólicas (en forma de joroba). (B) Micrografía de gradientes periódicos, solapantes en diente de sierra de fluoresceína (verde) y rodamina (rojo). Las representaciones gráficas por debajo de las micrografías muestran el perfil de intensidad de fluorescencia correspondiente a lo largo de los canales. Los gradientes calculados (puntos redondos) y experimentales mostraron una buena concordancia en todos los experimentos. La figura 9 muestra tres ejemplos de gradientes de concentración complejos utilizando este enfoque. Los gradientes en diente de sierra y en forma de silla de montar pueden producirse fácilmente. La principal ventaja de generar gradientes químicos utilizando el sistema microfluídico es que pueden configurarse gradientes precisos (a escala micrométrica, relevantes para la biología celular) y mantenerse durante varias horas. Además, pueden crearse formas complejas y gradientes solapantes.

Para demostrar la factibilidad de utilizar la cámara microfluídica de generador de gradientes para estudiar células vivas, se utilizó este dispositivo microfluídico para observar satisfactoriamente la quimiotaxia de los neutrófilos en un gradiente de quimiocina. La demostración satisfactoria de la migración de neutrófilos en un gradiente de IL-8 utilizando la cámara de quimiotaxia microfluídica ilustra su enorme potencial en la investigación del comportamiento de las neuronas en un entorno microfluídico controlado y el guiado del crecimiento de neuritas en un gradiente de neurotrofinas o moléculas de guiado axonal. El dispositivo microfluídico puede colocarse en un microscopio durante el experimento y tomarse micrografías de transcurso temporal a intervalos de 15 s. Se utiliza una bomba de jeringa controlada por ordenador para infundir los medios y quimiocina en el dispositivo. Se colocaron las células en una banda estrecha (figuras 10A y B) a lo largo del borde izquierdo del canal al comienzo del experimento y se permitió que migrasen a lo largo del canal durante 90 minutos. El efecto de disminuir linealmente la concentración de IL-8 sobre la migración de neutrófilos se muestra en la figura 10A. Se colocaron inicialmente las células en el lado con la mayor concentración de IL-8 y se permitió que migrasen. Después de 90 minutos, las células permanecieron en el lado izquierdo del canal. En contraste nítido, la figura 10B muestra el efecto de revertir el gradiente lineal establecido en el experimento anterior. Se colocaron inicialmente las células en el lado izquierdo con la menor concentración de IL-8. Noventa minutos después de la introducción del gradiente, la mayor parte de las células se movieron a lo largo del dispositivo hacia el lado con la mayor concentración. En la figura 10C, los neutrófilos se distribuyeron inicialmente al azar en la totalidad del canal y se aplicó un gradiente lineal de IL-8. Después de 90 minutos, la mayor parte de los neutrófilos se han movido hacia el lado con la mayor concentración de IL-8. Además, los datos de migración cuantitativa obtenidos a partir de estos experimentos preliminares con neutrófilos (es decir, velocidad de migración) concuerdan bien con los valores notificados en la bibliografía. Las células de cáncer humano producen quimiotaxia de manera similar cuando se exponen a gradientes de una variedad de factores de crecimiento (datos no representados). La demostración satisfactoria de la migración de neutrófilos en un gradiente de IL-8 utilizando la cámara de quimiotaxia microfluídica ilustra su enorme potencial en la investigación del comportamiento de las neuronas en un entorno microfluídico controlado.

Conclusión

Las formas de realización de la invención se refieren a un dispositivo de cultivo neuronal microfabricado que permite el crecimiento dirigido de neuritas y el aislamiento de neuritas de sus cuerpos celulares. El dispositivo puede utilizar presión hidrostática para aislar agresiones en un compartimento y, por tanto, exponer áreas localizadas de neuronas a las agresiones. Debido a la alta resistencia de los microsurcos para el transporte de fluidos, se contienen las agresiones en el compartimento neurítico sin fugas apreciables al compartimento somático durante un determinado periodo de tiempo (por ejemplo, más de 15 h). Una forma de realización de la invención utiliza la obtención de patrones de polilisina en combinación con el dispositivo microfabricado para facilitar la identificación y visualización de neuronas. La capacidad para dirigir los sitios de unión neuronal y la orientación de crecimiento de neuritas mediante técnicas de obtención de micropatrones, combinadas con compartimentos aislados de manera fluidica

dentro del área de cultivo, ofrece ventajas significativas con respecto a métodos de cultivo abierto habituales y otros métodos convencionales para manipular distintos microentornos neuronales.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para cultivo neural microfluídico de compartimentos múltiples que comprende:
- 5 por lo menos dos compartimentos independientes separados por una zona de barrera y formados dentro de un polímero transparente ópticamente, presentando la zona de barrera una longitud entre dichos por lo menos dos compartimentos independientes desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 μm ;
- 10 una pluralidad de canales de tamaño micrométrico en dicha zona de barrera, siendo los canales tanto estrechos como delgados en la anchura de canal y la altura de canal con unas dimensiones de aproximadamente 10 μm o menos, y presentando una longitud de canal igual a la longitud de la zona de barrera;
- 15 una pluralidad de orificios para servir como entradas de carga y depósitos de medio celular para el intercambio de gases y nutrientes para cada uno de dichos compartimentos independientes; y
- un sustrato para sellar dicho polímero transparente ópticamente con dichos por lo menos dos compartimentos independientes y dicha zona de barrera.
2. Dispositivo neural microfluídico de compartimentos múltiples según la reivindicación 1, en el que dichos compartimentos independientes están dispuestos paralelos entre sí y acoplados con dicha zona de barrera.
3. Dispositivo neural microfluídico de compartimentos múltiples según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho sustrato es poliestireno.
- 25 4. Dispositivo neural microfluídico de compartimentos múltiples según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas anchura de canal, altura de canal y longitud de canal de cada uno de dicha pluralidad de canales de tamaño micrométrico es de aproximadamente 10 μm , aproximadamente 3 μm y aproximadamente 150 μm , respectivamente.
- 30 5. Dispositivo neural microfluídico de compartimentos múltiples según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sustrato es vidrio plano.
6. Dispositivo neural microfluídico de compartimentos múltiples según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho polímero transparente ópticamente es el polidimetilsiloxano (PDMS).
- 35 7. Dispositivo neural microfluídico de compartimentos múltiples según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los canales en dicha pluralidad de canales de tamaño micrométrico están separados aproximadamente 50 μm .
- 40 8. Dispositivo neural microfluídico de compartimentos múltiples según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha zona de barrera presenta una anchura establecida de manera óptima para permitir que crezcan las neuritas a lo largo de dicha zona de barrera desde un primero de dichos compartimentos independientes hasta un segundo de dichos compartimentos independientes en aproximadamente 3-4 días.
- 45 9. Dispositivo para cultivo neural microfluídico de compartimentos múltiples que comprende:
- por lo menos dos compartimentos independientes separados por una zona de barrera y formados dentro de polidimetilsiloxano (PDMS), presentando la zona de barrera una longitud entre dichos por lo menos dos compartimentos independientes desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 μm ;
- 50 una pluralidad de canales de tamaño micrométrico en dicha zona de barrera, siendo los canales tanto estrechos como delgados con dimensiones inferiores a 10 μm , y presentando una longitud de canal igual a la longitud de la zona de barrera;
- 55 una pluralidad de orificios para servir como entradas de carga y depósitos de medio celular para el intercambio de gases y nutrientes para cada uno de dichos por lo menos dos compartimentos independientes; y
- un sustrato para sellar dicho PDMS con dichos por lo menos dos compartimentos independientes y dicha zona de barrera.

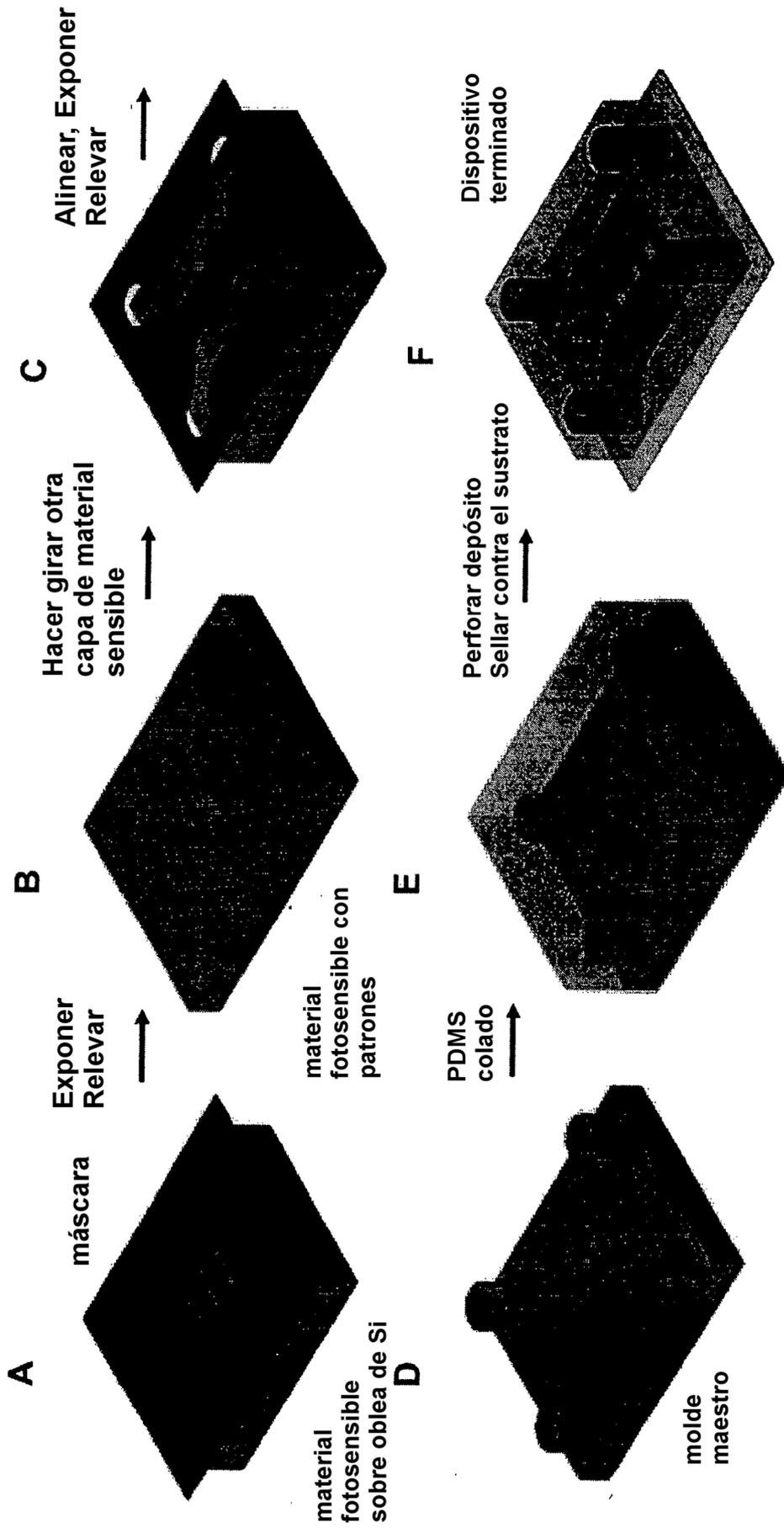


Figura 1

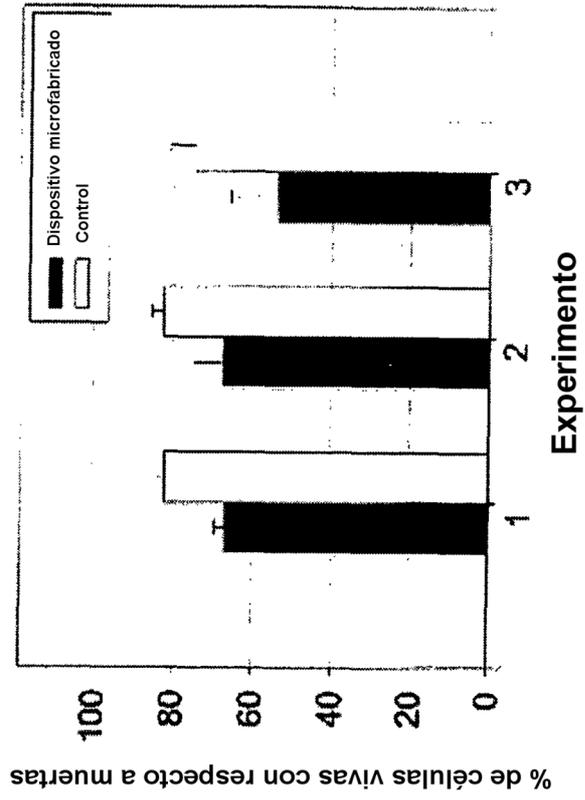
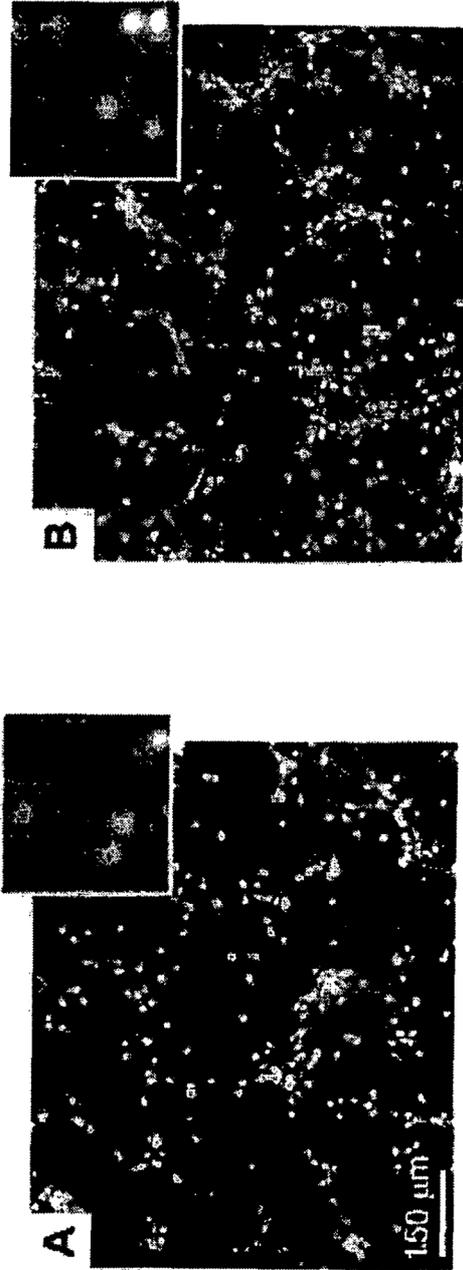


Figura 2

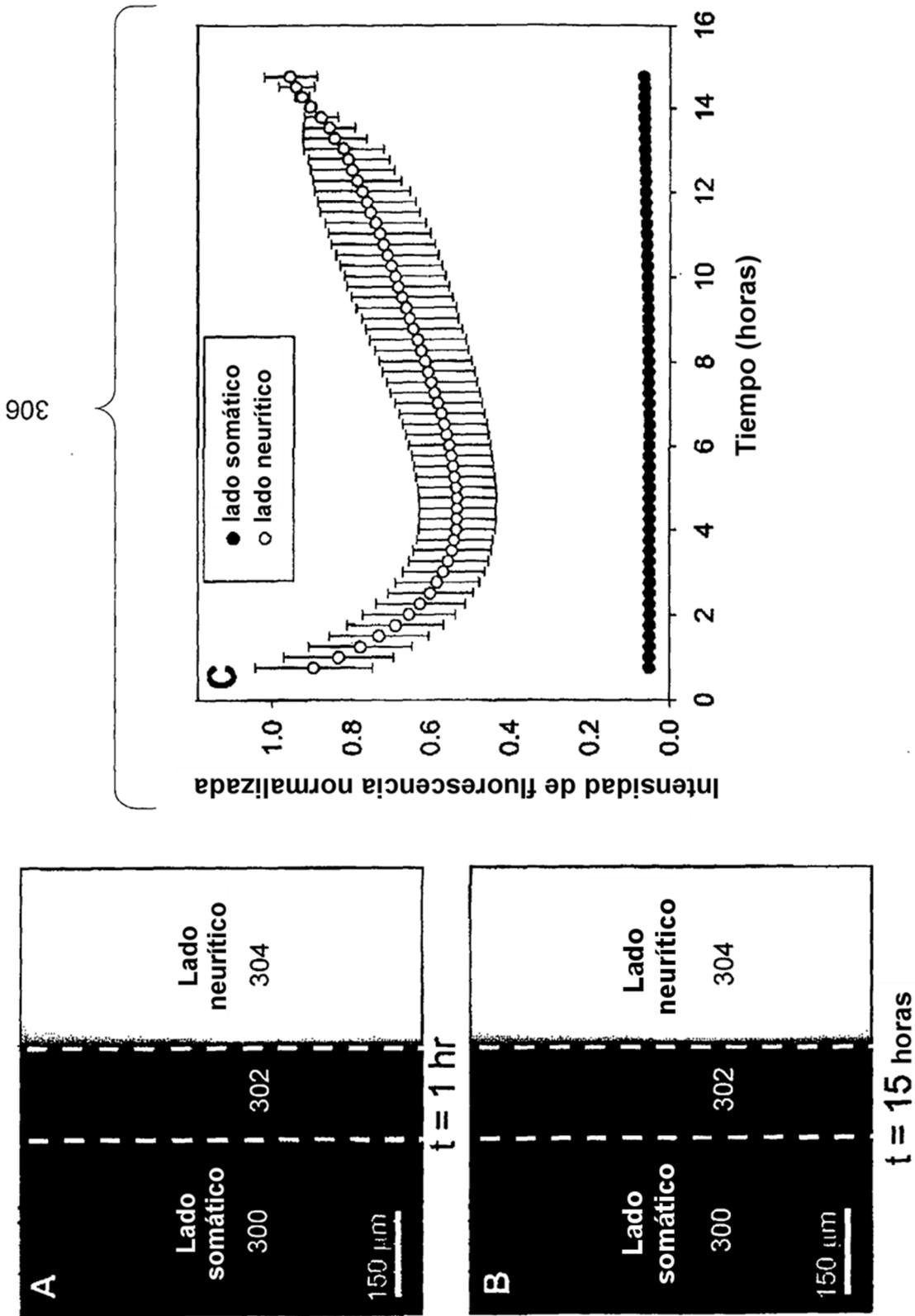


Figura 3

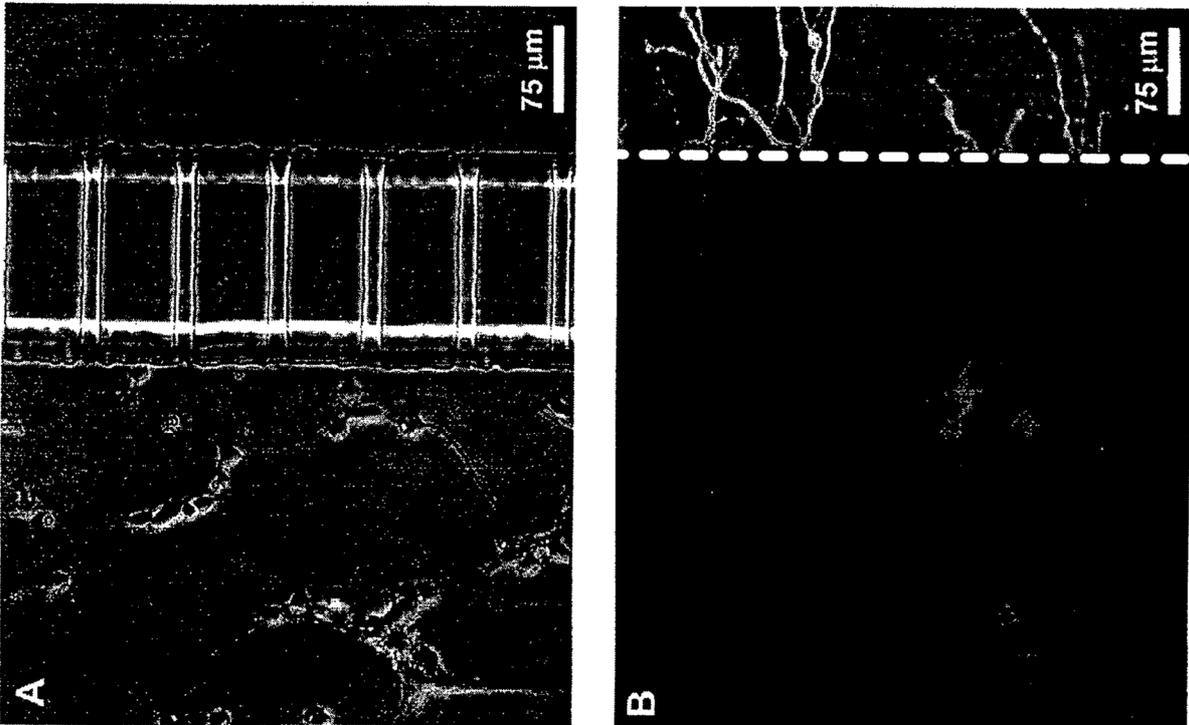


Figura 4

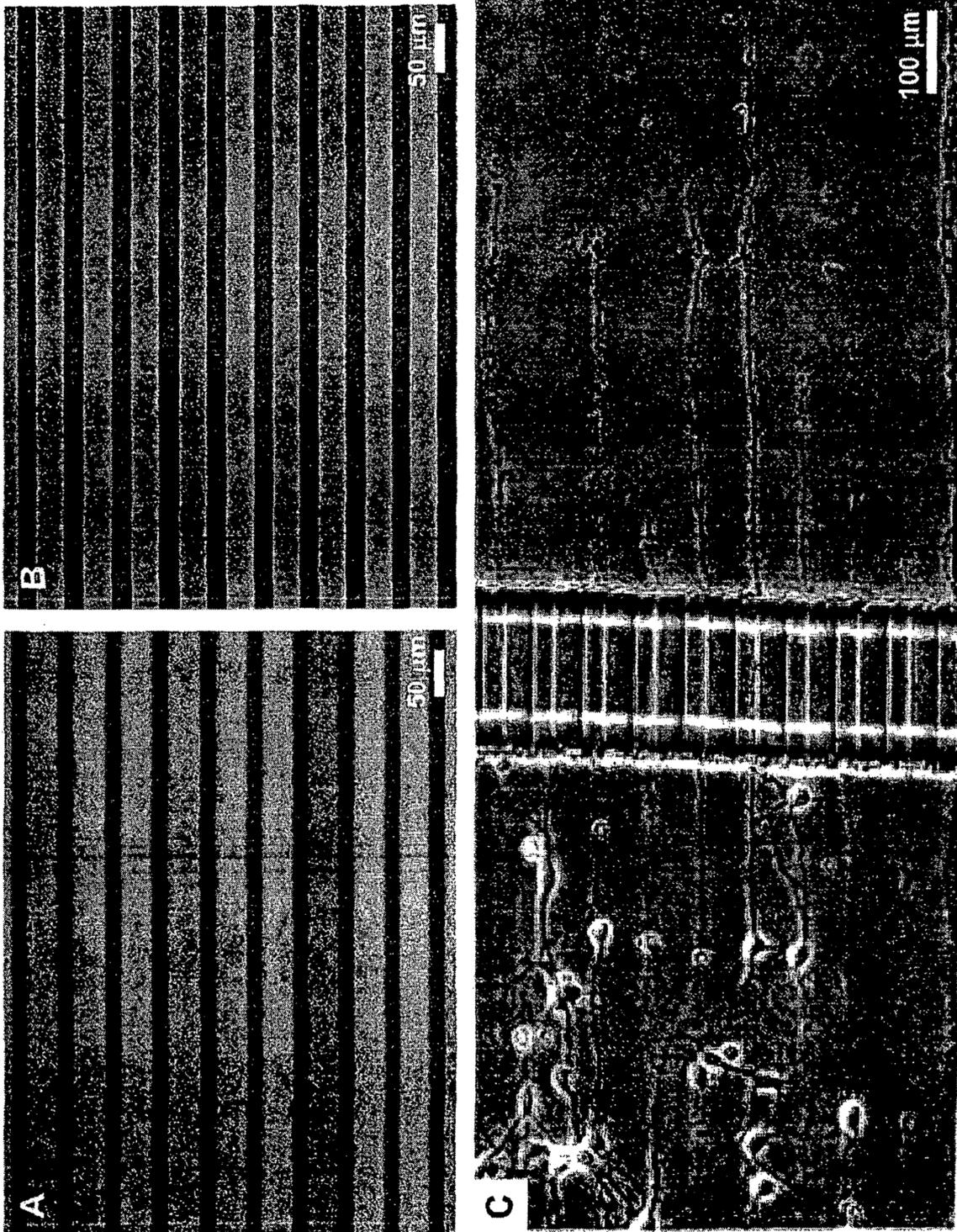


Figura 5

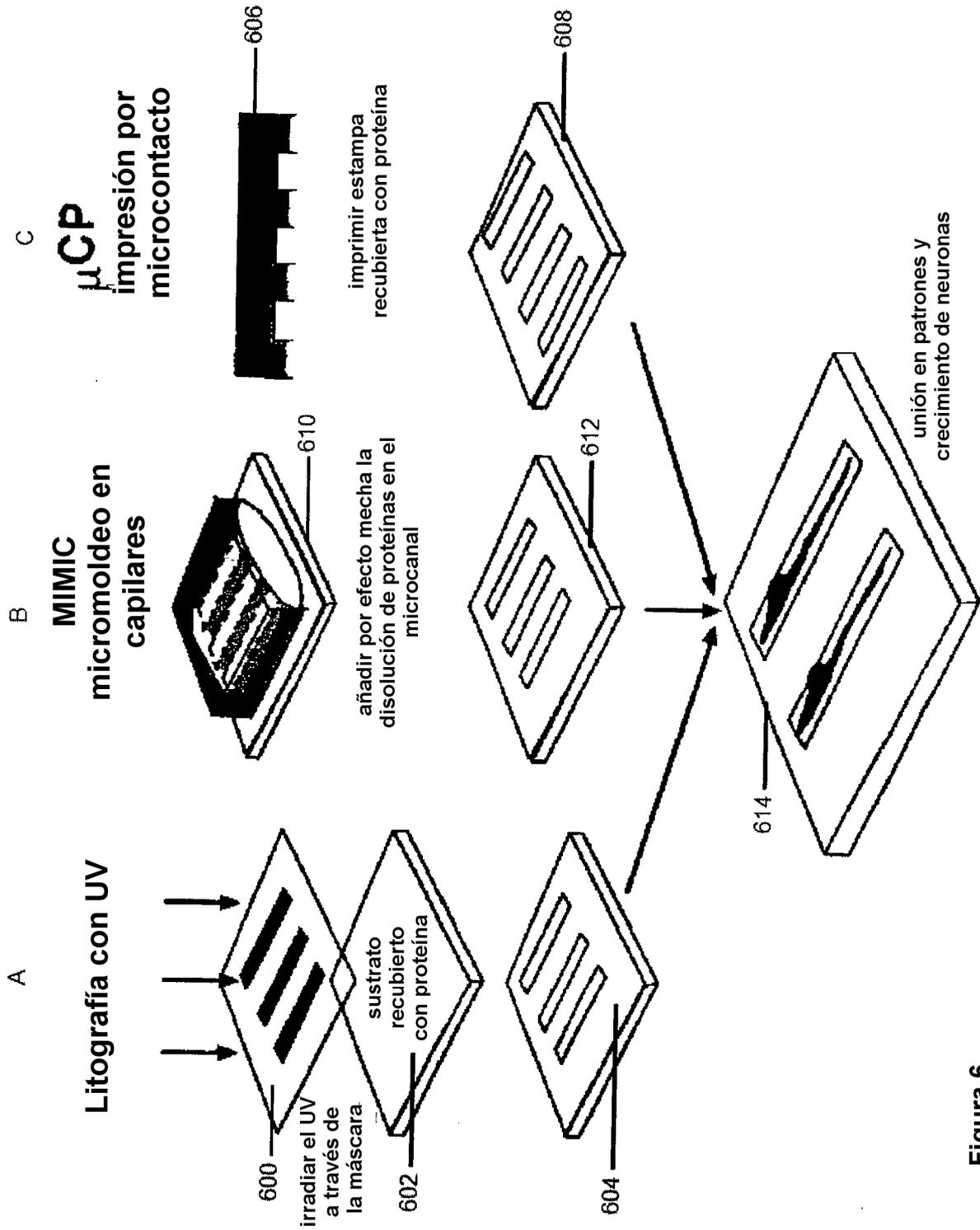


Figura 6

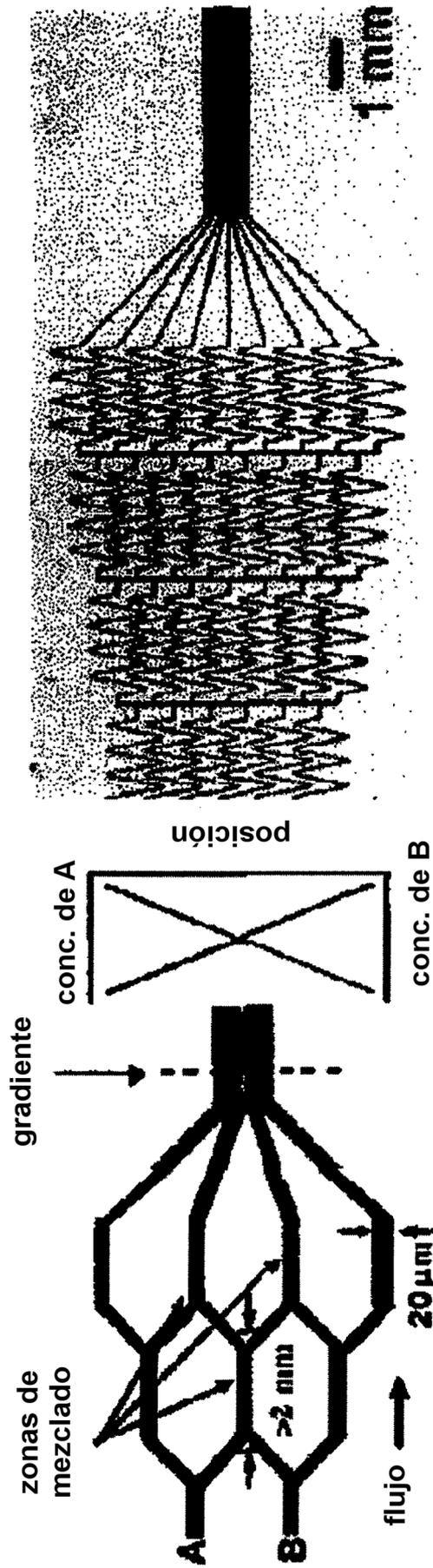


Figura 7

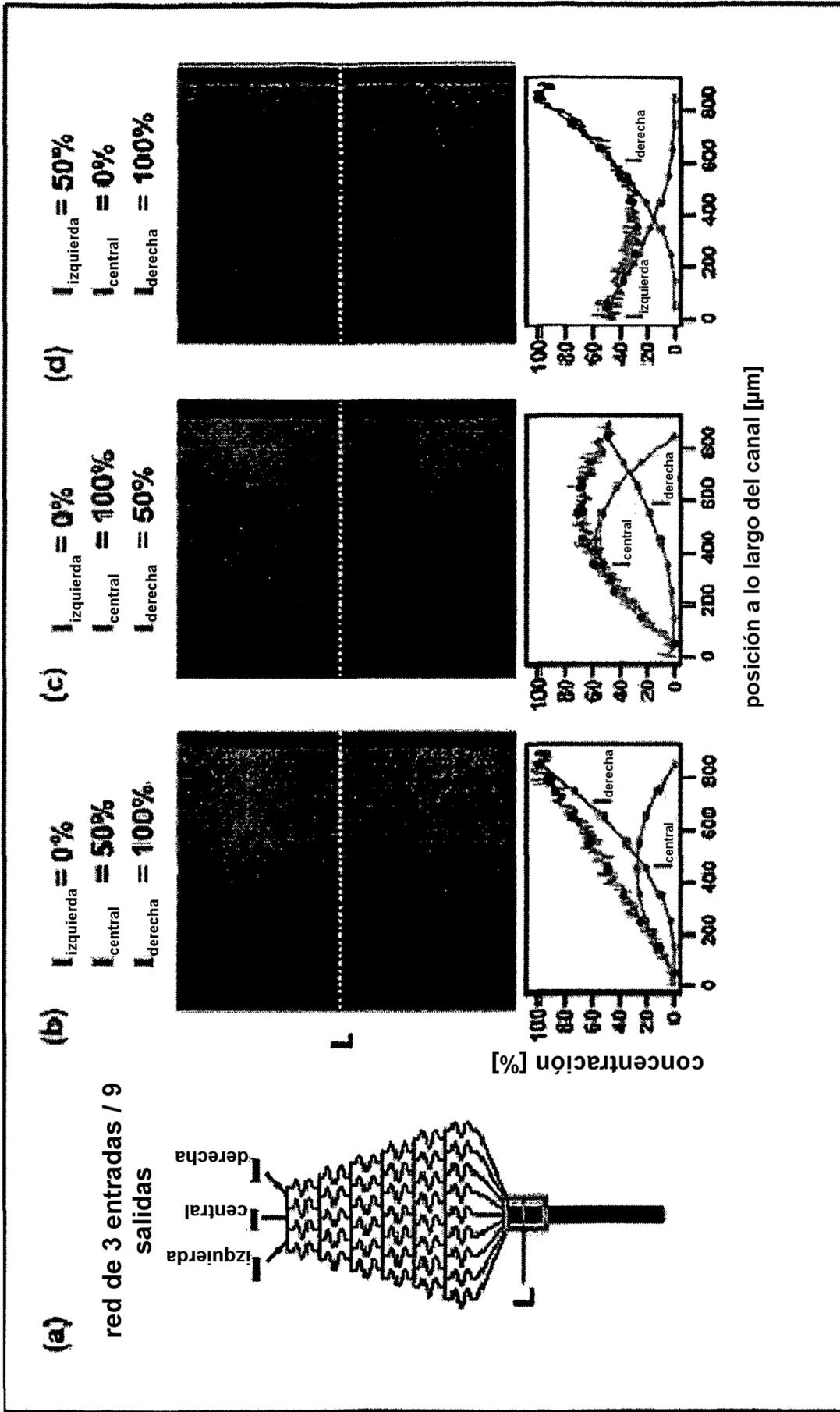


Figura 8

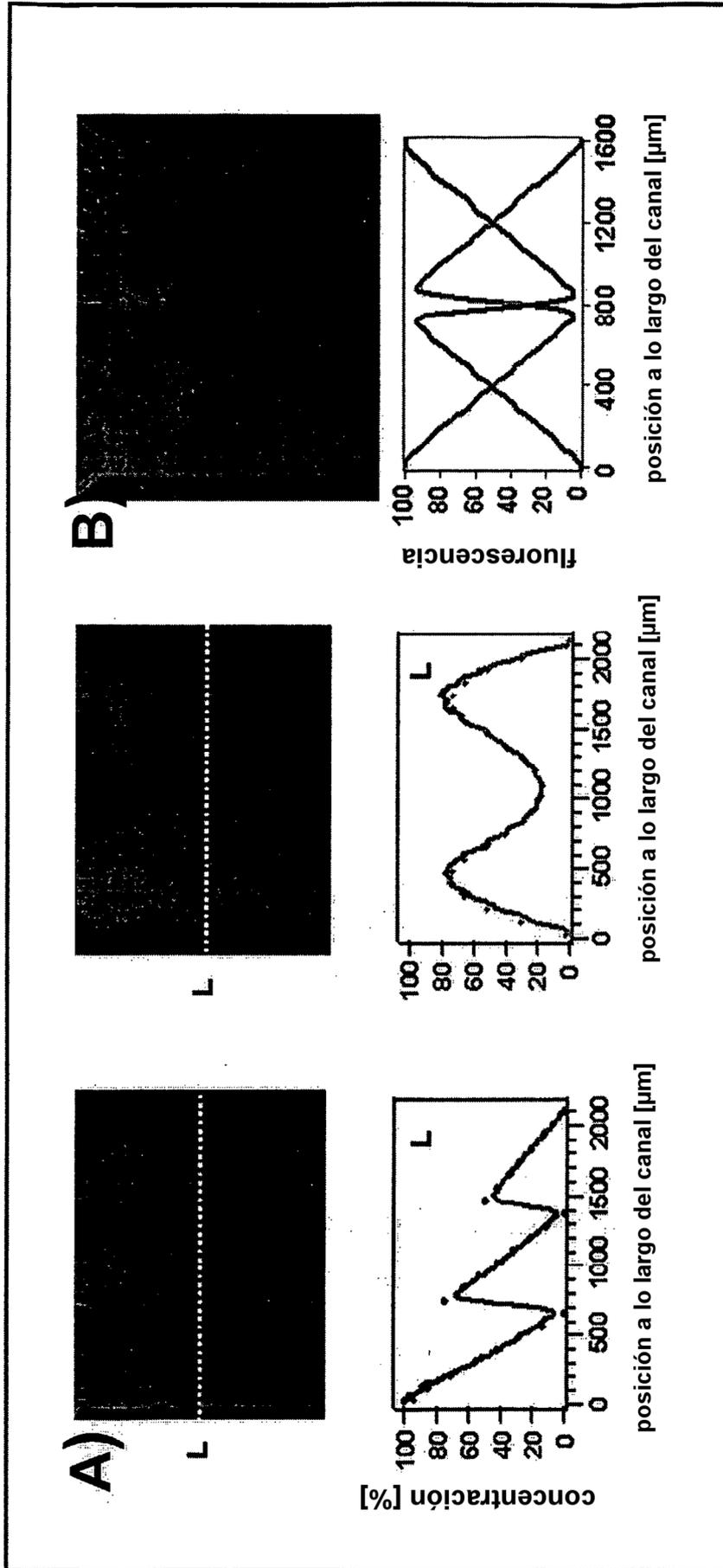


Figura 9

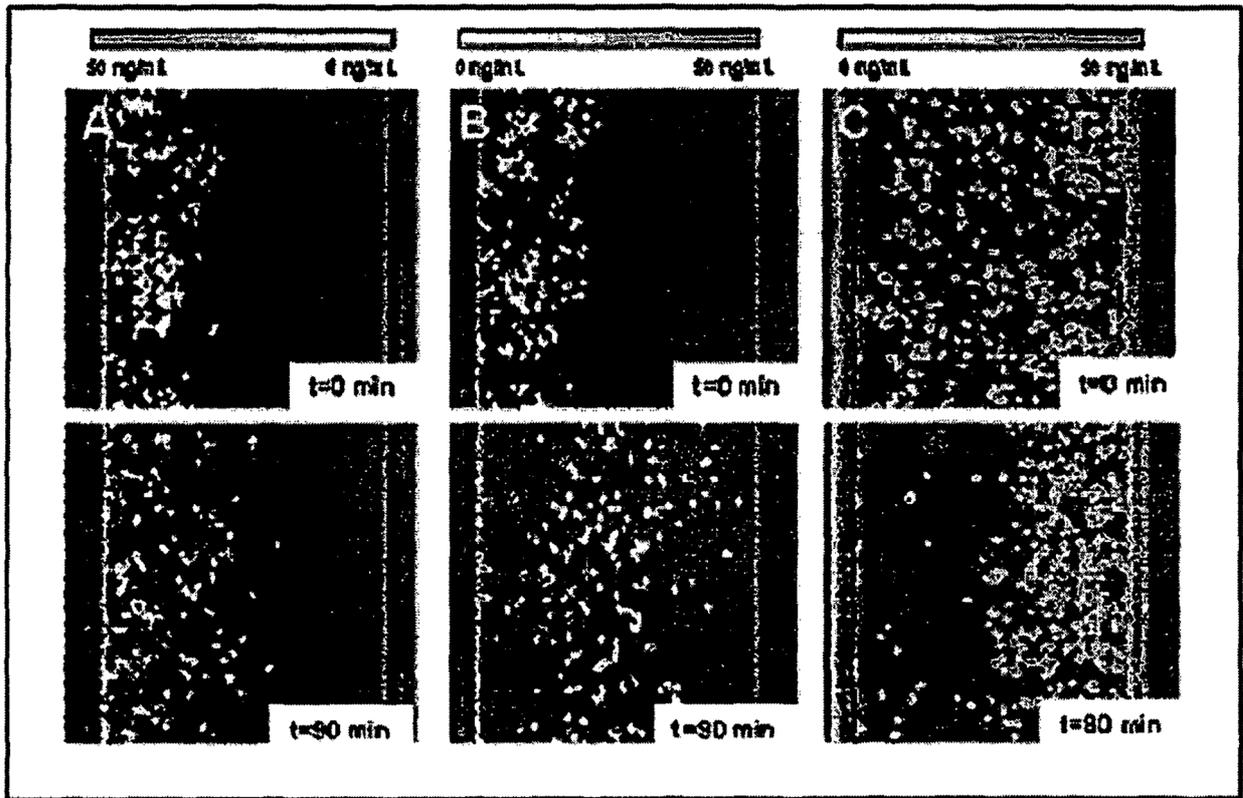


Figura 10

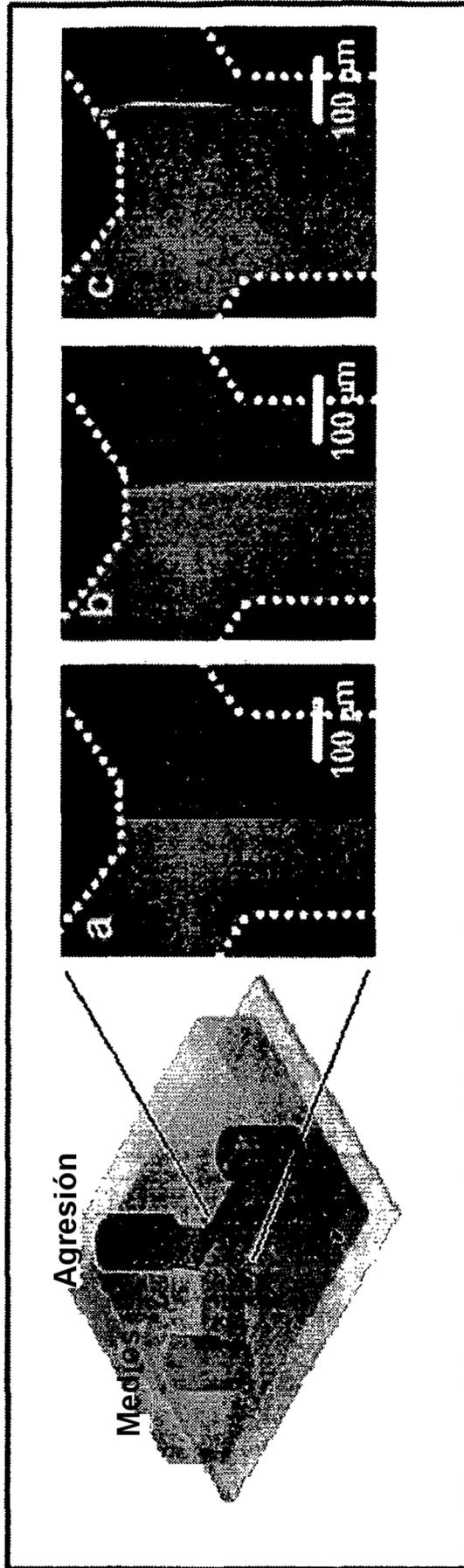


Figura 11

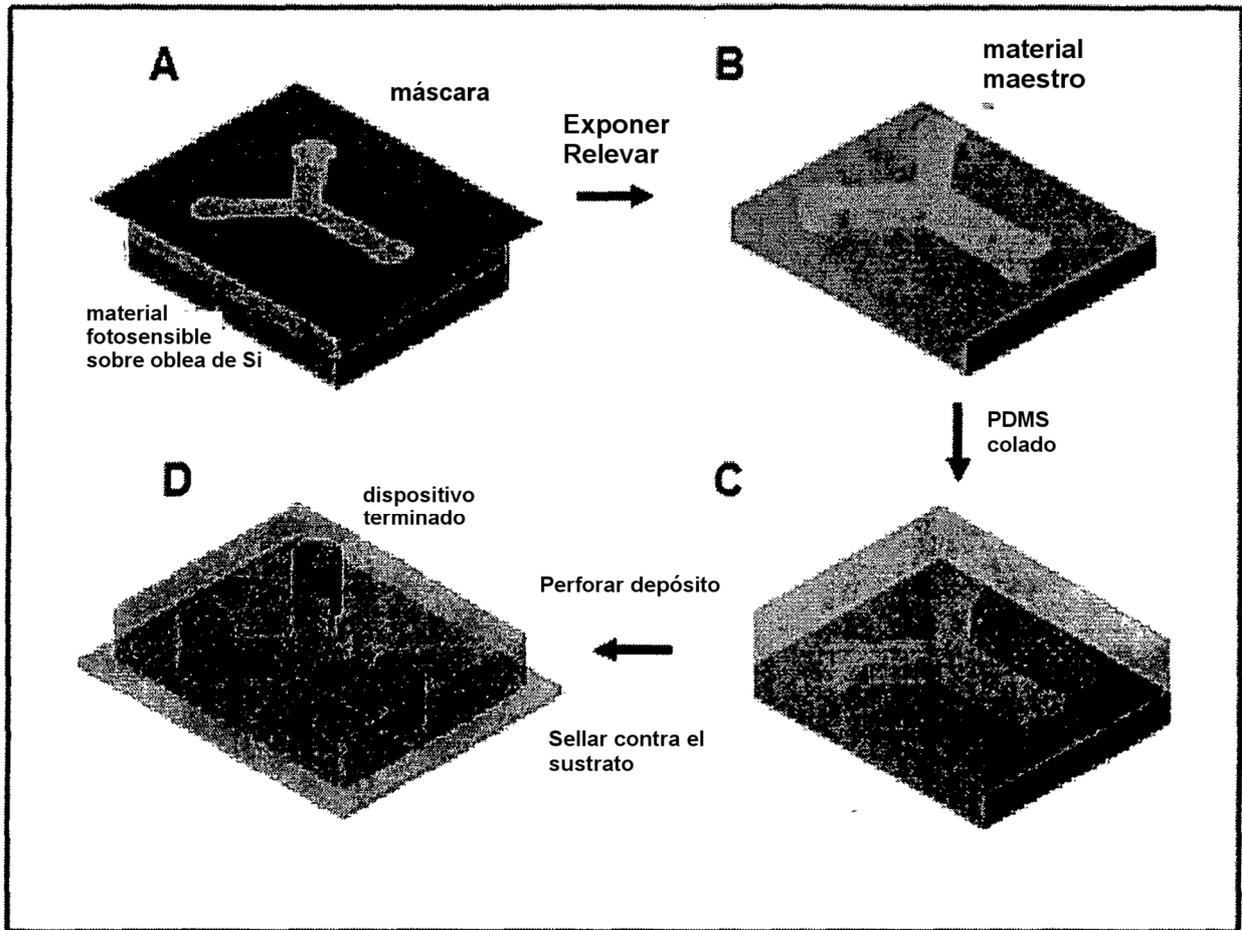


Figura 12