

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 201**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2009 PCT/US2009/050830**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10009307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2009 E 09790529 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2313487**

54 Título: **Dispositivo de imitación de órganos con microcanales y métodos de uso**

30 Prioridad:

16.07.2008 US 81080 P

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

13.06.2018

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.0%)**

**55 Shattuck Street
Boston, Massachusetts 02115 , US**

72 Inventor/es:

**INGBER, DONALD, E. y
HUH, DONGEUN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 672 201 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 de imitación de órganos con microcanales y métodos de uso

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere, en general, a un dispositivo de imitación de órganos con microcanales y métodos de uso y de fabricación del mismo.

Antecedentes

Las fuerzas mecánicas, empujes, tracciones, tensiones, compresiones, son importantes reguladores del desarrollo y comportamiento de una célula. La tensegridad proporciona la estructura que determina cómo están distribuidas estas fuerzas físicas dentro de una célula o tejido, y como y donde ejercen su influencia.

10 En el cuerpo humano, la mayoría de las células están sujetas constantemente a fuerzas mecánicas, tales como tensión o compresión. La aplicación de una tensión mecánica a las células en cultivo simula el ambiente in vivo, provocando cambios morfológicos dramáticos y respuestas biomecánicas de la celda. Hay tanto a corto como a largo plazo cambios que suceden cuando las células están cargadas mecánicamente en cultivo, tal como alteraciones en la velocidad y cantidad de síntesis o degradación de ADN o ARN, la expresión y la secreción de proteínas, la velocidad de división y alineación celular, cambios en el metabolismo energético, cambios en la velocidad de síntesis o degradación macromolecular, y otros cambios en bioquímica y bioenergética.

15 Cada célula tiene un andamiaje interno, o citoesqueleto, un entramado formado por "puntales y alambres" moleculares. Los "alambres" son una red entrecruzada de cables finos, conocidos como microfilamentos, que se extienden desde la membrana celular hasta el núcleo, ejerciendo una tracción hacia el interior. En oposición a la tracción se encuentran los microtúbulos, los "puntales" más gruesos que soportan la compresión del citoesqueleto y las moléculas receptoras especializadas en la membrana externa de la célula que anclan la célula a la matriz extracelular, la sustancia fibrosa que mantiene unidos a los grupos de células juntas. Este equilibrio de fuerzas es el signo característico de la tensegridad.

20 Los tejidos se construyen a partir de grupos de células, como huevos asentados en el "cartón de huevos" de la matriz extracelular. Las moléculas receptoras que anclan las células a la matriz, conocidas como integrinas, conectan las células con el resto del mundo. La fuerza mecánica en un tejido es sentida primero por las integrinas en estos puntos de anclaje, y luego es llevada por el citoesqueleto a regiones profundas dentro de cada célula. Dentro de la célula, la fuerza puede vibrar o cambiar la forma de una molécula de proteína, desencadenando una reacción bioquímica, o tirar de un cromosoma en el núcleo, activando un gen.

25 También se puede decir que las células tienen "tono", al igual que los músculos, debido a la tracción constante de los filamentos citoesqueléticos. Al igual que una cuerda de violín estirada produce diferentes sonidos cuando se aplica fuerza en diferentes puntos a lo largo de su longitud, la célula procesa señales químicas de manera diferente dependiendo de cuánto se distorsiona.

30 Un factor de crecimiento tendrá diferentes efectos dependiendo de cuánto se estire la célula. Las células que se estiran y aplastan, como las que se encuentran en la superficie de las heridas, tienden a crecer y multiplicarse, mientras que las células redondeadas, apretadas por condiciones de hacinamiento excesivo, activan un programa de "suicidio" y mueren. Por el contrario, células que no se estiran ni se retraen continúan con sus funciones.

35 Otro principio de la tensegridad celular es que la ubicación física es importante. Cuando las moléculas reguladoras flotan sueltas dentro de la célula, sus actividades se ven poco afectadas por las fuerzas mecánicas que actúan sobre la célula en su conjunto. Pero cuando se adhieren al citoesqueleto, pasan a formar parte de una red más amplia y están en condiciones de influir en la toma de decisiones celulares. Muchas moléculas reguladoras y señalizadoras están ancladas en el citoesqueleto en la membrana de la superficie de la célula, en puntos conocidos como sitios de adhesión, donde las integrinas se agrupan. Estas ubicaciones principales son centros de procesamiento de señales clave, como nodos en una red de ordenadores, donde las moléculas vecinas pueden recibir información mecánica del mundo exterior e intercambiar señales.

40 Por lo tanto, la evaluación de los efectos completos de los fármacos, los vehículos de administración de fármacos, los nanodiagnósticos o las terapias o los factores estresantes ambientales, tales como partículas, gases y toxinas, en un entorno fisiológico requieren no sólo un estudio de las interacciones célula-célula y célula-química, sino también un estudio de cómo estas interacciones se ven afectadas por las fuerzas mecánicas fisiológicas tanto en los tejidos sanos como en los tejidos afectados por enfermedades.

45 Los métodos para alterar el ambiente mecánico o la respuesta de las células en cultivo han incluido herir las células raspando una monocapa, aplicar campos magnéticos o eléctricos, o aplicar tensión o compresión estática o cíclica con un dispositivo de tornillo, una presión hidráulica, o pesos directamente a las células cultivadas. La tensión de cizallamiento también ha sido inducida al someter las células a un flujo de fluido. Sin embargo, pocos de estos procedimientos han permitido la cuantificación de las tensiones aplicadas o proporcionado regulación para lograr un

amplio rango reproducible de deformaciones cíclicas dentro de un microambiente de cultivo que mantiene interacciones fisiológicamente relevantes tejido-tejido.

5 Los órganos vivos son estructuras vascularizadas tridimensionales compuestas de dos o más tejidos estrechamente apuestos que funcionan colectivamente y transportan materiales, células e información a través de interfaces tejido-tejido en presencia de fuerzas mecánicas dinámicas, como el cizallamiento de fluidos y la tensión mecánica. La creación de microdispositivos que contengan células vivas que recreen estas interfaces fisiológicas tejido-tejido y permitan el flujo de fluidos y la distorsión mecánica dinámica tendría gran valor para el estudio de funciones orgánicas complejas, por ejemplo, el tráfico de células inmunes, la absorción de nutrientes, la infección, el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono, etcétera., y para la detección de drogas, la toxicología, el diagnóstico y la terapéutica.

10 La unidad alveolar-capilar juega un papel vital en el mantenimiento de la función fisiológica normal del pulmón, así como en la patogénesis y progresión de varias enfermedades pulmonares. Debido a la arquitectura compleja del pulmón, el pequeño tamaño de los alvéolos pulmonares y sus microvasos circundantes, y los movimientos mecánicos dinámicos de este órgano, es difícil estudiar esta estructura en la microescala.

15 El pulmón tiene una estructura anatómicamente única que tiene una red de derivación jerárquica de tubos conductores que permiten el transporte convectivo de gas desde y hacia los compartimentos alveolares microscópicos donde se produce el intercambio gaseoso. El alvéolo es la unidad funcional más importante del pulmón para la respiración normal, y es más relevante clínicamente en el sentido de que es la barrera sangre-gas o interfaz, así como el sitio donde los tensioactivos actúan para permitir la entrada de aire y donde las células inmunitarias, los patógenos y los fluidos se acumulan en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o infecciones, tal como la neumonía.

20 La barrera sangre-gas o interfaz tejido-tejido entre los capilares pulmonares y el lumen alveolar está compuesta de una sola capa de epitelio alveolar estrechamente yuxtapuesta a una sola capa de endotelio capilar separada por una fina matriz extracelular (MEC), que se forma a través del auto-ensamblaje celular y molecular en el embrión. Prácticamente todos los análisis de la función de la unidad alveolar-capilar se han llevado a cabo en estudios con animales enteros porque no ha sido posible regenerar esta estructura a nivel de órgano in vitro.

25 Un gran desafío radica en la falta de herramientas experimentales que puedan promover el ensamblaje de estructuras orgánicas multicelulares y multitejidas que exhiban la organización estructural clave, las funciones fisiológicas y la actividad mecánica fisiológica o patológica de la unidad alveolar-capilar pulmonar, que normalmente sufre expansión y contracción repetida durante cada ciclo respiratorio. Esta limitación podría superarse si fuera posible regenerar esta estructura a nivel de órgano y recrear in vitro su microambiente mecánico fisiológico. Sin embargo, esto no se ha logrado completamente.

30 El documento US 2006/154361 se refiere a un biorreactor con capacidad de inyección de sustancias. El biorreactor comprende una barrera porosa que divide una cámara, para las células receptoras y un medio líquido, en una primera subcámara y una segunda subcámara. Cambiando la presión dentro de la segunda subcámara, la barrera porosa puede moverse en una dirección transversal al plano de la barrera.

35 Lo que se necesita es un dispositivo de imitación de órganos que pueda utilizarse in vitro o in vivo el cual realiza funciones tejido-tejido relacionadas y que también permite que las células se organicen naturalmente en el dispositivo en respuesta no sólo a las fuerzas químicas sino también a las mecánicas y permite el estudio del comportamiento celular a través de una membrana que imita la fisiología tejido-tejido.

40 Resumen

En un primer aspecto, la invención se refiere a un dispositivo organomimético que comprende:

un cuerpo que tiene un microcanal central en el mismo; y

45 una membrana al menos parcialmente porosa y al menos parcialmente flexible situada dentro del microcanal central y a lo largo de un plano, la membrana configurada para separar el microcanal central para formar un primer microcanal central y un segundo microcanal central, en donde se aplica un primer fluido a través del primer microcanal central y un segundo fluido a través del segundo microcanal central, la membrana recubierta con al menos una molécula de unión que soporta la adhesión de una pluralidad de células vivas; y

50 un primer canal de funcionamiento separado del primer y segundo microcanales centrales por una primera pared de microcanal, en donde la membrana se monta en la primera pared de microcanal, y cuando se aplica presión al primer canal de funcionamiento, hace que la membrana se flexione en la primera dirección deseada para expandirse o contraerse a lo largo del plano dentro del primer y segundo microcanales centrales.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método que comprende:

proporcionar un dispositivo organomimético dotado de un cuerpo, el cuerpo que incluye una membrana al menos parcialmente porosa y al menos parcialmente elástica situada a lo largo de un plano dentro de un microcanal central

para separar el microcanal central en un primer microcanal central y un segundo microcanal central, la membrana recubierta de al menos una molécula de unión que soporta la adhesión de una pluralidad de células vivas, y al menos un canal de servicio separado del primero y del segundo microcanales centrales por una pared de microcanal, en la que la membrana está montada en la pared del microcanal;

5 aplicar un primer fluido, opcionalmente compuesto de glóbulos blancos, a través del primer microcanal central;

aplicar un segundo fluido a través del segundo microcanal central;

aplicar una presión al menos a un canal de servicio para hacer que la membrana se flexione en la dirección deseada para expandirse o contraerse a lo largo del plano dentro del primer y segundo microcanales; y

10 monitorizar el comportamiento de las células con respecto a la membrana entre el primer y segundo microcanales centrales.

También se describe un sistema y método que comprenden un cuerpo con un microcanal central separado por una o más membranas porosas. Las membranas están configuradas para dividir el microcanal central en dos o más microcanales centrales paralelos estrechamente apuestos, en donde uno o más primeros fluidos se aplican a través del primer microcanal central y uno o más segundos fluidos se aplican a través del segundo o más microcanales centrales. Las superficies de cada membrana porosa pueden ser recubiertas con moléculas adhesivas celulares para apoyar la unión de las células y promover su organización en tejidos en la superficie superior e inferior de cada membrana, creando por tanto una o más interfaces tejido-tejido separadas por membranas porosas entre los canales de fluidos paralelos adyacentes. La membrana puede ser porosa, flexible, elástica, o una combinación de las mismas con poros lo suficientemente grandes como para permitir el intercambio de gases y productos químicos pequeños, o lo suficientemente grandes como para permitir la migración y el paso a través del canal de proteínas grandes, así como células vivas enteras. La presión del fluido, las características de flujo y la geometría del canal también pueden variar para aplicar un esfuerzo de cizallamiento de fluido deseado a una o ambas capas de tejido.

25 Tal y como se ha descrito, se puede aplicar una presión positiva o negativa a los canales de servicio adyacentes al canal central que crea un diferencial de presión que hace que la membrana se expande y se retraiga de forma selectiva en respuesta a la presión, por tanto simulando más fisiológicamente una fuerza mecánica de un una interfaz tejido-tejido viviente.

También tal y como se describe, tres o más microcanales paralelos pueden ser separados por una pluralidad de membranas porosas paralelas que están alineadas mediante un tipo de tejido común en el canal central y dos tipos de tejido diferentes en los lados opuestos de las membranas en los dos canales exteriores. Un ejemplo sería un dispositivo imitador del cáncer en el que las células cancerosas se hacen crecer en el microcanal central y en las superficies internas de ambas membranas porosas, mientras que el endotelio capilar se hace crecer en la superficie opuesta de una membrana porosa y el endotelio linfático se hace crecer en la superficie opuesta de la segunda membrana porosa. Esto recrea la microarquitectura del tumor y permite el estudio del suministro de oxígeno, nutrientes, fármacos y células inmunitarias a través del conducto vascular, así como la salida de las células tumorales y la metástasis a través del microcanal linfático.

35 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y forman parte de esta memoria descriptiva, ilustran uno o más ejemplos de modos de realización y, junto con la descripción de los modos de realización de ejemplo, sirven para explicar los principios y las implementaciones de los modos de realización. En los dibujos:

40 La figura 1 ilustra un diagrama de bloques de un sistema que emplea un dispositivo de imitación de órgano de ejemplo de acuerdo con un modo de realización.

La figura 2A ilustra una vista en perspectiva de un dispositivo de imitación de órgano de acuerdo con un modo de realización.

La figura 2B ilustra una vista despiezada del dispositivo de imitación de órgano de acuerdo con un modo de realización.

45 Las figuras 2C-2D ilustran vistas en perspectiva de las regiones de interfaz tejido-tejido del dispositivo de acuerdo con un modo de realización.

Las figuras 2E-2G ilustran vistas transversales de arriba hacia abajo de las regiones de interfaz tejido-tejido del dispositivo de acuerdo con uno o más modos de realización.

50 Las figuras 3A-3B ilustran vistas en perspectiva de las regiones de interfaz tejido-tejido del dispositivo de acuerdo con un modo de realización.

Las figuras 3C-3E ilustran vistas en perspectiva de la membrana de acuerdo con uno o más modos de realización.

Las figuras 4A-4C ilustran vistas en perspectiva de la formación de la membrana de un dispositivo de dos canales de acuerdo con un modo de realización.

La figura 4D ilustra una vista lateral de la membrana del dispositivo de interfaz tejido-tejido de acuerdo con un modo de realización.

- 5 Las Figuras 5A-5E ilustran vistas en perspectiva de la formación del dispositivo de imitación de órgano de acuerdo con un modo de realización.

La figura 6 ilustra un diagrama de sistema que emplea un dispositivo de imitación de órgano con múltiples canales de acuerdo con un modo de realización.

- 10 Las figuras 7A-7B ilustran vistas en perspectiva del dispositivo de imitación de órgano de acuerdo con un modo de realización.

La figura 7C ilustra una vista lateral de la membrana del dispositivo de imitación de órgano de acuerdo con un modo de realización.

Las figuras 8 y 9 ilustran la generación de ROS a lo largo del tiempo de acuerdo con un experimento realizado con el presente dispositivo.

- 15 Descripción de modos de realización de ejemplo

Se describen modos de realización en el presente documento en el contexto de un dispositivo que simula órganos y métodos de uso y fabricación del mismo. Los expertos en la técnica se darán cuenta de que la siguiente descripción es sólo ilustrativa y no pretende ser de ninguna manera limitativa. Otros modos de realización se sugerirán fácilmente a dichos expertos en la técnica que tienen el beneficio de esta divulgación. A continuación se hará referencia en detalle a las implementaciones de los modos de realización de ejemplo tal y como se ilustra en los dibujos adjuntos. Los mismos indicadores de referencia se utilizarán a lo largo de los dibujos y la siguiente descripción para referirse a los mismos artículos o similares. Se entiende que la frase "un modo de realización" abarca más de un modo de realización y por lo tanto no se limita a un solo modo de realización en aras de la brevedad.

- 20 De acuerdo con esta divulgación, el dispositivo de imitación de órgano (también referido como el "presente dispositivo") es de forma preferible utilizado en un sistema general que incorpora sensores, ordenadores, pantallas y otros equipos informáticos que utilizan software, componentes de datos, etapas de proceso y/o estructuras de datos. Los componentes, etapas de proceso, y/o estructuras de datos descritas en el presente documento con respecto al sistema informático con el cual se emplea el dispositivo de imitación de órgano puede ser implementado utilizando diversos tipos de sistemas operativos, plataformas informáticas, programas informáticos, y/o máquinas de propósito general. Además, los expertos en la técnica reconocerán que dispositivos de una naturaleza de propósito general, tal como dispositivos de conexión permanente, matrices de puertas programables por campo (FPGA), circuitos integrados de aplicación específica (ASIC), o similares, también pueden ser utilizados sin alejarse del alcance de los conceptos inventivos divulgados en el presente documento.

- 25 Donde un método que comprende una serie de etapas de proceso se implementa mediante un ordenador o en una máquina con el uso y el dispositivo de imitación de órganos descrito más abajo y las etapas de proceso se puede almacenar como una serie de instrucciones legibles por la máquina, son almacenadas en un medio tangible tal como un dispositivo de memoria informático (por ejemplo, una ROM (Memoria de sólo lectura), una PROM (Memoria de sólo lectura programable), una EEPROM (Memoria de sólo lectura programable por borrado eléctrico), una memoria FLASH, una unidad Jump, y similares), un medio de almacenamiento magnético (por ejemplo, cinta, unidad de disco magnético, y similares), un medio de almacenamiento óptico (por ejemplo, CD-ROM, DVD-ROM, tarjeta de papel, cinta de papel y similares) y otros tipos de memoria de programas.

- 30 Modos de realización del presente dispositivo pueden aplicarse en numerosos campos, entre los que se incluyen las ciencias biológicas básicas, la investigación en ciencias de la vida, el descubrimiento y desarrollo de fármacos, las pruebas de seguridad de fármacos, los ensayos químicos y biológicos, así como la ingeniería de tejidos y órganos. En un modo de realización, el dispositivo de imitación de órganos puede utilizarse como estructura de red microvascular para la investigación básica en biología cardiovascular, del cáncer y de enfermedades específicas de órganos. Además, uno o más modos de realización del dispositivo encuentran aplicación en dispositivos de ayuda de órganos para hígado, riñón, pulmón, intestino, médula ósea, y otros órganos y tejidos, así como en estructuras de reemplazo de órganos.

- 35 Las respuestas celulares a las diferentes señales ambientales pueden ser monitorizadas usando varios sistemas que pueden ser combinados con el dispositivo actual. Se pueden monitorizar los cambios en el pH usando sensores bien conocidos. También se pueden tomar muestras de células, de forma continua o periódica, para medir los cambios en la transcripción de genes o los cambios en la bioquímica celular o en la organización estructural. Por ejemplo, se pueden medir especies reactivas de oxígeno (ROI) que son un signo de estrés celular. También se puede someter el "tejido" que se hace crecer en la membrana porosa a un análisis microscópico, a un análisis inmunohistoquímico, a un análisis de hibridación in situ o a un análisis patológico típico mediante tinción, como la tinción con hematoxilina y

eosina. Las muestras para estos análisis pueden realizarse en tiempo real, o tomarse después de un experimento o tomando pequeñas biopsias en diferentes etapas durante un estudio o un experimento.

5 Se pueden someter las células cultivadas en la membrana a otras células, como células del sistema inmunológico o células bacterianas, a anticuerpos o células dirigidas por anticuerpos, por ejemplo, a receptores celulares específicos. Se pueden exponer las células a virus u otras partículas. Para ayudar en la detección del movimiento de sustancias suministradas externamente, tales como células, virus, partículas o proteínas, se puede naturalmente etiquetarlas usando medios típicos tales como etiquetas radioactivas o fluorescentes.

10 Las células se pueden hacer crecer, cultivar y analizar utilizando el dispositivo actual durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, entre al menos 1-2 semanas, e incluso más de 2 semanas. Por ejemplo, tal como se discute más adelante, se ha demostrado que el co-cultivo de células epiteliales alveolares con células endoteliales microvasculares pulmonares en una membrana porosa delgada en un modo de realización del dispositivo descrito podría hacerse crecer durante más de dos semanas sin pérdida de viabilidad de las células.

15 El dispositivo imitador de órganos descrito en el presente documento tiene muchas aplicaciones diferentes, pero no limitadas a, la identificación de marcadores de enfermedad, la evaluación de la eficacia de la terapéutica anticancerosa, el ensayo de vectores de terapia génica, el desarrollo de fármacos, la detección, los estudios de células, especialmente células madre y células de médula ósea, los estudios sobre biotransformación, absorción, eliminación, metabolismo y activación de xenobióticos, y los estudios sobre biodisponibilidad y transporte de agentes químicos o biológicos a través de capas epiteliales o endoteliales; estudios sobre el transporte de agentes biológicos o químicos a través de la barrera hematoencefálica; estudios sobre el transporte de agentes biológicos o químicos a través de la barrera epitelial intestinal; estudios sobre la toxicidad basal aguda de los agentes químicos; estudios sobre la toxicidad organoespecífica aguda local o aguda de los agentes químicos; estudios sobre la toxicidad basal crónica de los agentes químicos; estudios sobre la toxicidad organoespecífica crónica local o crónica de los agentes químicos; estudios sobre la teratogenicidad de los agentes químicos; estudios sobre la genotoxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de los agentes químicos; detección de agentes biológicos infecciosos y armas biológicas; detección de agentes químicos nocivos y armas químicas; estudios sobre enfermedades infecciosas; estudios sobre la eficacia de los agentes químicos o biológicos para el tratamiento de enfermedades; estudios sobre la gama de dosis óptima de agentes para el tratamiento de enfermedades; predicción de la respuesta de órganos in vivo a los agentes biológicos; predicción de la farmacocinética de los agentes químicos o biológicos; predicción de la farmacodinámica de los agentes químicos o biológicos; estudios sobre el impacto del contenido genético en la respuesta a los agentes; estudios sobre la transcripción de genes en respuesta a agentes químicos o biológicos; estudios sobre la expresión de proteínas en respuesta a agentes químicos o biológicos; estudios sobre los cambios en el metabolismo en respuesta a agentes químicos o biológicos. El dispositivo de imitación de órganos también puede ser usado para detectar las células, para un efecto de las células en los materiales (por ejemplo, de una manera equivalente al metabolismo tisular de un medicamento).

35 El presente dispositivo se puede utilizar para simular el entorno de carga mecánica de caminar, correr, respirar, peristalsis, flujo de flujo u orina, o el latido de un corazón, a las células cultivadas de tejidos mecánicamente activos, tales como el corazón, pulmón, músculo esquelético, hueso, ligamento, tendón, cartílago, células musculares lisas, intestino, riñón, células endoteliales y células de otros tejidos. En lugar de probar las respuestas biológicas o bioquímicas de una célula en un ambiente estático, el investigador puede aplicar un rango de frecuencias, amplitudes y duración de esfuerzos mecánicos, incluyendo tensión, compresión y cizallamiento, a las células cultivadas.

40 Un experto puede implantar varios tipos de células en las superficies de la membrana. Las células incluyen cualquier tipo de célula de una estructura multicelular, incluyendo nematodos, amebas, hasta mamíferos como los humanos. Los tipos de células implantadas en el dispositivo dependen del tipo de órgano o de la función del órgano que se desea imitar, y de los tejidos que comprenden esos órganos. Más detalles de los diversos tipos de células implantables en la membrana del presente dispositivo se discuten a continuación.

45 También se pueden co-cultivar varias células madre, como células madre de médula ósea, células madre adultas inducidas, células madre embrionarias o células madre aisladas de tejidos adultos en uno o ambos lados de la membrana porosa. Usando diferentes medios de cultivo en las cámaras que alimentan cada capa de células, se puede permitir que diferentes señales de diferenciación lleguen a las capas de células madre, diferenciando así las células de diferentes tipos de células. También se pueden mezclar tipos de células en el mismo lado de la membrana para crear co-cultivos de diferentes células sin separación de membrana.

50 Utilizando el dispositivo de imitación de órganos descrito en el presente documento, se puede estudiar la biotransformación, la absorción, la eliminación, el metabolismo y la activación de xenobióticos, así como la administración de fármacos. La biodisponibilidad y el transporte de agentes químicos y biológicos a través de las capas epiteliales como en el intestino, las capas endoteliales como en los vasos sanguíneos, y a través de la barrera hematoencefálica también pueden ser estudiados. También puede estudiarse la toxicidad basal aguda, la toxicidad local aguda o la toxicidad aguda específica de órganos, la teratogenicidad, la genotoxicidad, la carcinogenicidad y la mutagenicidad de los agentes químicos. Los efectos de los agentes biológicos infecciosos, las armas biológicas, los agentes químicos nocivos y las armas químicas también pueden ser detectados y estudiados. Las enfermedades infecciosas y la eficacia de los agentes químicos y biológicos para tratar estas enfermedades, así como los rangos de

5 dosis óptimos para estos agentes, pueden ser estudiados. La respuesta de los órganos in vivo a los agentes químicos y biológicos y la farmacocinética y farmacodinámica de estos agentes pueden detectarse y estudiarse utilizando el presente dispositivo. Se puede estudiar el impacto del contenido genético en la respuesta a los agentes. Se puede determinar la cantidad de proteína y la expresión génica en respuesta a agentes químicos o biológicos. También se pueden estudiar los cambios en el metabolismo en respuesta a agentes químicos o biológicos utilizando el dispositivo actual.

10 Las ventajas del dispositivo de imitación de órganos, en comparación con los cultivos celulares o cultivos de tejidos convencionales, son numerosas. Por ejemplo, cuando las células se colocan en el dispositivo de imitación de órganos, puede ocurrir una diferenciación de fibroblastos, SMC (célula del músculo liso) y EC (célula endotelial) que reestablece una relación definida de tejido-tejido arquitectónico tridimensional que está cerca de la situación in vivo, y se pueden investigar las funciones de las células y las respuestas a agentes farmacológicos o sustancias o productos activos pueden ser investigados a nivel de tejidos y órganos.

15 Además, muchas actividades celulares o tisulares son susceptibles de ser detectadas en el dispositivo de imitación de órganos, incluyendo, pero sin limitarse a, la velocidad de difusión de los medicamentos hacia y a través de los tejidos en capas en el canal de flujo transportado; morfología celular, cambios de diferenciación y secreción en diferentes capas; locomoción celular, crecimiento, apoptosis y similares. Además, se puede evaluar fácilmente el efecto de varios fármacos sobre diferentes tipos de células ubicadas en diferentes capas del sistema.

20 Para el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, puede haber dos ventajas en el uso del dispositivo de imitación de órganos descrito en el presente documento: (1) el dispositivo de imitación de órganos es más capaz de imitar la arquitectura en capas in vivo de los tejidos y por lo tanto permite estudiar el efecto del fármaco a nivel de órgano además de a nivel celular y tisular; y (2) el dispositivo de imitación de órganos disminuye el uso de modelos de tejidos in vivo y el uso de animales para la selección de fármacos y estudios toxicológicos.

25 Además del descubrimiento y desarrollo de fármacos, el dispositivo de imitación de órganos descrito en el presente documento también puede ser útil en la investigación básica y clínica. Por ejemplo, el dispositivo de imitación de órganos puede utilizarse para investigar el mecanismo de la tumorigénesis. Está bien establecido que la progresión del cáncer in vivo está modulada por el huésped y el microambiente tumoral, incluyendo las células del estroma y la matriz extracelular (MEC). Por ejemplo, se ha encontrado que las células estromales podían convertir células epiteliales benignas en células malignas, por lo que se ha encontrado que la MEC afecta a la formación del tumor. Cada vez hay más pruebas de que las células que crecen en una arquitectura definida son más resistentes a los agentes citotóxicos que las células en monocapas. Por lo tanto, un dispositivo de imitación de órganos es un medio mejor para simular las características de crecimiento originales de las células cancerosas y, por lo tanto, refleja mejor la sensibilidad real del fármaco a los tumores in vivo.

35 El dispositivo imitador de órganos puede ser empleado en la ingeniería de una variedad de tejidos incluyendo, pero no limitado a, el sistema cardiovascular, pulmón, intestino, riñón, cerebro, médula ósea, huesos, dientes y piel. Si el dispositivo se fabrica con un material biocompatible y/o biodegradable adecuado, como el ácido poliláctido-co-glicólico (PLGA, por sus siglas en inglés), el dispositivo de imitación de órganos puede utilizarse para trasplantes o implantaciones in vivo; además, la capacidad de localizar y controlar espacialmente las interacciones de varios tipos de células presenta una oportunidad para realizar ingeniería jerárquica y crear tejidos y análogos de órganos más correctos desde el punto de vista fisiológico. La disposición de múltiples tipos de células en una disposición definida tiene efectos beneficiosos sobre la diferenciación celular, el mantenimiento y la longevidad funcional.

40 El dispositivo imitador de órganos también puede permitir que diferentes factores de crecimiento, productos químicos, gases y nutrientes se añadan a diferentes tipos de células de acuerdo a las necesidades de las células y su existencia in vivo. El control de la ubicación de esos factores o proteínas puede dirigir el proceso de remodelación celular específica y el funcionamiento, y también puede proporcionar las señales moleculares a todo el sistema, lo que resulta en desarrollos beneficiosos como el neotejido, remodelación celular, aumento de la secreción, y similares.

45 En otro aspecto más, el dispositivo de imitación de órganos puede ser utilizado como micromatrices celulares de tipo multicelular, tales como dispositivos microfluídicos. Utilizando el dispositivo de imitación de órganos, se puede mantener la integridad del patrón de las matrices celulares. Estas micromatrices celulares pueden constituir el futuro "laboratorio en un chip", particularmente cuando están multiplexados y automatizados. Estos cultivos miniaturizados de tipo multicelular facilitarán la observación de la dinámica celular con ensayos más rápidos y menos ruidosos, teniendo una complejidad incorporada que permitirá que las células muestren respuestas similares in vivo a la matriz.

55 En otro aspecto más, el dispositivo de imitación de órganos puede ser utilizado como sensores biológicos. Los biosensores basados en células pueden proporcionar más información que otros biosensores porque las células a menudo tienen respuestas fisiológicas multifacéticas a los estímulos, así como mecanismos novedosos para amplificar estas respuestas. Todos los tipos de células del dispositivo de imitación de órganos pueden utilizarse para monitorizar diferentes aspectos de un analito al mismo tiempo; diferentes tipos de células del dispositivo de imitación de órganos pueden utilizarse para monitorizar diferentes analitos al mismo tiempo; o una mezcla de ambos tipos de monitorización. Células que van desde la E.coli hasta células de líneas de mamíferos han sido usadas como sensores para aplicaciones en monitorización ambiental, detección de toxinas y monitorización fisiológica.

En otro aspecto más, el dispositivo de imitación de órganos se puede utilizar para comprender los procesos fundamentales de la biología celular y las interacciones célula-MEC. El proceso de remodelado in vivo es un proceso complicado, dinámico y recíproco entre células y MEC. El dispositivo de imitación de órganos sería capaz de capturar la complejidad de estos sistemas biológicos, haciendo que estos sistemas sean susceptibles de investigación y manipulación beneficiosa. Además, junto con herramientas de imagen como la microscopía de fluorescencia, la microfluorimetría o la tomografía de coherencia óptica (TCO), se espera un análisis en tiempo real del comportamiento celular en los tejidos multicapas utilizando el dispositivo. Ejemplos de estudios de células y tejidos susceptibles de análisis en tiempo real incluyen la secreción y señalización celular, las interacciones célula-célula, las interacciones tejido-tejido, la construcción y monitorización de tejido por ingeniería dinámica, las investigaciones estructura-función en ingeniería tisular y el proceso de matrices de remodelación celular in vitro.

Otro ejemplo del uso de este dispositivo es inducir la formación de interfaces tejido-tejido y estructuras orgánicas complejas dentro del dispositivo implantándolas in vivo en el cuerpo de un animal vivo, y permitiendo que las células y los tejidos impregnen el dispositivo y establezcan interfaces tejido-tejido normales. Luego, se extrae quirúrgicamente todo el dispositivo y las células y tejidos contenidos mientras se perfunde a través de uno o más de los canales de fluidos con el medio y los gases necesarios para la supervivencia celular. Esta imitación de órgano complejo puede entonces mantenerse viable in vitro a través de la perfusión 3D y utilizarse para estudiar funciones celulares y tisulares altamente complejas en su contexto tridimensional normal con un nivel de complejidad que no es posible utilizando un sistema de modelo in vitro existente.

En particular, un dispositivo de microcanal puede implantarse subcutáneamente in vivo en un animal en el que el dispositivo contenga materiales inductores de hueso, como polvo óseo desmineralizado o proteínas morfogénicas óseas (BMP), en un canal que tenga uno o más puertos correspondientes abiertos al espacio tisular circundante. El segundo canal se cerraría durante la implantación cerrando sus puertos finales o llenándolos con un material sólido removible, como una varilla sólida. Como resultado de la cicatrización de la herida, los tejidos conectivos que contienen microcapilares y células madre mesenquimales crecerían en los canales abiertos del dispositivo y, debido a la presencia del material inductor de hueso, formarían hueso con espacios que enganchan células precursoras hematopoyéticas circulantes para formar una médula ósea completamente funcional, tal como se ha demostrado en estudios anteriores.

Una vez completado este proceso, el sitio quirúrgico se reabrirá, y el segundo canal se reabrirá quitando la varilla o tapones y luego se conectará con catéteres conectados a un depósito de fluido para que el medio de cultivo que contiene nutrientes y gases necesarios para la supervivencia celular pueda ser bombeado a través del segundo canal y pasado a través de los poros de la membrana al primer canal que contiene la médula ósea formada. El dispositivo de microcanal entero podría entonces ser cortado libre del tejido circundante, y con el medio fluyendo continuamente en el dispositivo, sería retirado del animal y pasado a una incubadora de cultivo de tejido y mantenido en cultivo con flujo de fluido continuo a través del segundo canal, y el flujo adicional puede ser añadido al primer canal también si se desea conectando a sus puertos de entrada y de salida. El dispositivo de microcanal se utilizaría entonces para estudiar el funcionamiento intacto de la médula ósea in vitro en un ambiente controlado.

Se pueden utilizar tanto materiales biocompatibles y biodegradables en el presente dispositivo para facilitar la implantación in vivo del presente dispositivo. También se pueden utilizar recubrimientos biocompatibles y biodegradables. Por ejemplo, se pueden utilizar recubrimientos cerámicos sobre un sustrato metálico. Pero cualquier tipo de material de recubrimiento y el recubrimiento pueden estar hechos de diferentes tipos de materiales: metales, cerámicas, polímeros, hidrogeles o una combinación de cualquiera de estos materiales.

Los materiales biocompatibles incluyen, pero no están limitados a, un óxido, un fosfato, un carbonato, un nitrato o un carbonitrato. Entre los óxidos se prefieren los siguientes: óxido de tantalio, óxido de aluminio, óxido de iridio, óxido de circonio u óxido de titanio. En algunos casos el recubrimiento también puede estar hecho de un material biodegradable que se disolverá con el tiempo y puede ser reemplazado por el tejido vivo. Los sustratos están hechos de materiales tales como metales, cerámica, polímeros o una combinación de cualquiera de estos. Metales como el acero inoxidable, titanio, titanio, aleaciones de titanio o aluminio y cerámicas como zirconia, alúmina o fosfato de calcio son de particular interés.

El material biocompatible también puede ser biodegradable, ya que se disuelve con el tiempo y puede ser reemplazado por el tejido vivo. Tales materiales biodegradables incluyen, pero no se limitan a, ácido poli(ácido láctico-co-glicólico), ácido poliláctico, ácido poliglicólico (PGA), colágeno u otras moléculas MEC, otras proteínas del tejido conectivo, aleaciones de magnesio, policaprolactona, ácido hialúrico, proteínas adhesivas, polímeros biodegradables, material sintético, biocompatible y biodegradable, tal como biopolímeros, biovidrios, biocerámicas, sulfato de calcio, fosfato de calcio tal como, por ejemplo, fosfato monocálcico monohidrato, fosfato monocálcico anhidro, fosfato dicálcico dihidrato, fosfato dicálcico anhidro, fosfato tetracálcico, fosfato de ortofosfato de calcio, pirofosfato de calcio, fosfato tricálcico alfa, fosfato beta tricálcico, apatito tal como la hidroxiapatita, o polímeros tal como, por ejemplo, poli(alfa-hidroxiésteres), poli(ésteres de orto), poli(ésteres de éter), polianhídridos, poli(fosfacenos), poli(fumatos de propileno), poli(amidas de ésteres), poli(fumaratos de etileno), poli(aminoácidos), polisacáridos, polipéptidos, poli(hidroxi-butiratos), poli(hidroxi-valeratos), poliuretanos, poli(ácido málico), poliláctidos, poliglicolidos, policaprolactonas, poli(carbonatos de glicólido-co-trimetileno), polidioxanonas o copolímeros, terpolímeros de los mismos o mezclas de los mismos, o una combinación de materiales biocompatibles y biodegradables. También se puede utilizar vidrio

biodegradable y compuestos bioactivos auto-reforzados y bioabsorbibles de ultra-alta resistencia de vidrio, ensamblados a partir de polímeros parcialmente cristalinos bioabsorbibles, como poliglicólidos, poliláctidos y/o copolímeros glicólidos/láctidos.

5 Estos materiales tienen de forma preferible una alta resistencia inicial, un módulo adecuado y un tiempo de retención
de resistencia de 4 semanas a 1 año in vivo, dependiendo de la geometría del implante. Elementos de refuerzo tales
como fibras de polímeros cristalinos, fibras de carbono en resinas poliméricas y rellenos de partículas, por
ejemplo, hidroxiapatita, también pueden utilizarse para proporcionar la estabilidad dimensional y las propiedades
10 mecánicas de los dispositivos biodegradables. El uso de redes de interpenetración (IPN) en la construcción de
materiales biodegradables ha sido demostrado como un medio para mejorar la resistencia mecánica. Para mejorar
aún más las propiedades mecánicas de los materiales biodegradables reforzados con IPN, el presente dispositivo
puede prepararse como redes semi-interpenetrantes (SIPN) de fumarato de polipropileno entrecruzado dentro de una
matriz de poli(láctido-co-glicólido) 85:15 (PLGA) o poli(1- láctido-co-d,1- láctido) 70:30 (PLA) utilizando diferentes
agentes reticulantes. También se pueden utilizar membranas de copoliéster de poli(hidroxibutirato de cinc-9%
15 hidroxivalerato) natural, tal y como se describe en Charles-Hilaire Rivard y otros (Journal of Applied Biomaterials,
Volumen 6 número 1, páginas 65 - 68, 1 Sept 2004). Un experto también podrá seleccionar otros materiales
biodegradables adecuados para cualquier propósito específico y tipos de células y tejidos según las aplicaciones en
las que se utilice el dispositivo.

20 El dispositivo tal y como se describe también puede ser utilizado en dispositivos terapéuticos, cuando se colocan in
vivo. Se pueden recrear imitaciones de órganos, como médula ósea o ganglios linfáticos, colocando los dispositivos
en, por ejemplo, un modelo animal que permite que el dispositivo sea habitado por células y tejidos vivos, y luego
retirando todo el dispositivo con células vivas mientras se perfunde el canal vascular con el medio. El dispositivo puede
entonces ser retirado y mantenido vivo ex vivo para estudios in vitro o ex vivo. En particular, la membrana puede estar
recubierta con una o más capas de células en al menos un lado de la membrana in vitro. En un modo de realización,
la membrana está recubierta con una o más capas de células en al menos un lado de la membrana in vivo. Se puede
25 tratar un lado de la membrana in vitro y el otro in vivo. También se puede tener uno o ambos lados recubiertos
inicialmente con un tipo de célula in vitro y luego implantar el dispositivo para atraer capas de células adicionales in
vivo.

30 En general, la presente divulgación está dirigida a un dispositivo y un método de uso en el cual el dispositivo incluye
un cuerpo que tiene un microcanal central separado por una o más membranas porosas. La(s) membrana(s) está(n)
configurada(s) para dividir el microcanal central en dos o más microcanales centrales paralelos estrechamente
apuestos, en donde uno o más primeros fluidos se aplican a través del primer microcanal central y uno o más segundos
fluidos se aplican a través del segundo o más microcanales centrales. Las superficies de cada membrana porosa
pueden ser recubiertas con moléculas adhesivas celulares para apoyar la unión de las células y promover su
organización en tejidos en la superficie superior e inferior de la membrana, creando así una interfaz tejido-tejido
35 separada por una membrana porosa entre los canales de fluidos paralelos adyacentes. La membrana puede ser
porosa, flexible, elástica o una combinación de los mismos con poros lo suficientemente grandes como para permitir
el intercambio de gases y productos químicos pequeños, o lo suficientemente grandes como para permitir la migración
y el paso a través del canal de proteínas grandes y células vivas enteras. La presión de fluido, el flujo y la geometría
del canal también se pueden variar para aplicar un esfuerzo de cizallamiento deseado a una o ambas capas de tejido.

40 En un ejemplo no limitativo, el dispositivo está configurado para imitar el funcionamiento de un pulmón, donde las
células del epitelio pulmonar se auto-ensamblan en una superficie de la membrana MEC y las células capilares del
endotelio pulmonar se auto-ensamblan en la cara opuesta de la misma membrana porosa. De este modo, el dispositivo
permite la simulación de la estructura y función de una unidad alveolar-capilar funcional que puede estar expuesta a
la tensión mecánica fisiológica para simular la respiración o a estímulos químicos, moleculares, de partículas y
45 celulares, tanto transmitidos por el aire como por la sangre, para investigar el intercambio de sustancias químicas,
moléculas y células a través de esta interfaz tejido-tejido a través de los poros de la membrana. El dispositivo tiene un
impacto en el desarrollo de modelos de pulmón in vitro que imitan las respuestas a nivel de órgano que pueden ser
analizadas bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Este sistema puede ser utilizado en varias aplicaciones
incluyendo, pero no limitadas a, detección de medicamentos, administración de medicamentos, administración de
50 vacunas, biodetección, toxicología, fisiología y aplicaciones de ingeniería de órganos/tejidos.

La figura 1 ilustra un diagrama de bloques del sistema global que emplea el dispositivo inventivo de acuerdo con un
modo de realización. Tal y como se muestra en la figura 1, el sistema 100 incluye un dispositivo 102 de imitación de
órgano, una o más fuentes 104, 104_N de fluido acopladas al dispositivo 102, una o más bombas 106 opcionales
acopladas a la fuente 104 de fluido y al dispositivo 102. Una o más CPU 110 están acopladas a la bomba 106 y de
55 forma preferible controlan el flujo de fluido que entra y sale del dispositivo 102. La CPU de forma preferible incluye uno
o procesadores 112 y una o más memorias 114 de almacenamiento local/remoto. Una pantalla 116 se acopla a la CPU
110, y una o más fuentes 118 de presión se acoplan a la CPU 110 y al dispositivo 102. La CPU 110 controla de forma
preferible el flujo y la velocidad del fluido presurizado hacia el dispositivo. Se ha de señalar que a pesar de que un
dispositivo 102 de interfaz es mostrado y descrito en el presente documento, se contempla que una pluralidad de
60 dispositivos 102 de interfaz pueda ser probada y analizada dentro del sistema 100 tal y como se discute más abajo.

Tal y como será discutido con más detalle, el dispositivo 102 de imitación de órganos de forma preferible incluye dos o más puertos que colocan los microcanales del dispositivo 102 en comunicación con los componentes externos del sistema, tal como el fluido y fuentes de presión. En particular, el dispositivo 102 es acoplado a la una o más fuentes 104_N de fluido en las cuales la fuente de fluido puede contener aire, sangre, agua, células, compuestos, partículas, y/o cualquier otro medio que va a ser entregado al dispositivo 102. En un modo de realización, la fuente 104 de fluido proporciona fluido a uno o más microcanales del dispositivo 102 y también de forma preferible recibe el fluido que sale del dispositivo 102. Se contempla que el fluido que sale del dispositivo 102 puede ser adicionalmente o alternativamente recogido en un colector de fluido o depósito 108 separado de la fuente 104 de fluido. Por lo tanto, es posible que las fuentes de fluido 104, 104_N separadas respectivamente proporcionen fluido a y eliminen fluido del dispositivo 102.

El fluido que sale del dispositivo 102 puede ser reutilizado y reintroducido en el mismo o diferente puerto de entrada a través del cual entró previamente. Por ejemplo, el dispositivo 102 puede configurarse de tal manera que el fluido que pasa a través de un determinado microcanal central se recircula de nuevo al dispositivo y vuelve a pasar por el mismo microcanal central. Esto podría utilizarse, por ejemplo, para aumentar la concentración de un analito en el fluido a medida que se recircula el dispositivo. En otro ejemplo, el dispositivo 102 puede configurarse de manera que el fluido pase a través del dispositivo y se recircule de nuevo en el dispositivo y luego pase a través de otro microcanal central. Esto podría usarse para cambiar la concentración o composición del fluido a medida que circula a través de otro microcanal.

Una o más bombas 106 son de forma preferible utilizadas para bombear el fluido al dispositivo 102, aunque las bombas en general son opcionales en el sistema. Las bombas de fluido son bien conocidas en la técnica y no son discutidas en detalle en el presente documento. Tal y como se discutirá con más detalle más abajo, cada porción de microcanal está de forma preferible en comunicación con su respectivo puerto de entrada y/o salida, por lo que cada porción de microcanal de flujo permitido fluye a través del mismo.

Cada microcanal en el dispositivo de forma preferible tiene puertos de entrada y salida dedicados que están conectados a las respectivas fuentes de fluido y/o colectores de fluido dedicados para permitir que los caudales, los contenidos de flujo, las presiones, las temperaturas y otras características de los medios sean controlados independientemente a través de cada microcanal central. Por lo tanto, también se pueden monitorizar los efectos de varios estímulos en cada una de las capas de células o tejidos por separado mediante el muestreo de los canales de fluidos separados para el marcador celular deseado, tales como cambios en la expresión génica a nivel de ARN o proteína.

El componente inyector/extractor 108 de células se muestra en comunicación con el dispositivo 102, por lo que el inyector/extractor 108 está configurado para inyectar, extraer y/o manipular células, tales como células epiteliales y endoteliales, pero sin limitarse a ellas, en una o más superficies de la membrana de interfaz dentro del dispositivo 102, independientemente de las células introducidas en el dispositivo a través del(de los) puerto(s) 210, 218 de entrada. Por ejemplo, la sangre que contiene partículas magnéticas que arrastran células patógenas puede cultivarse en un dispositivo separado por el cual puede introducirse posteriormente la mezcla en el sistema a través del inyector en el momento deseado sin tener que hacer pasar la mezcla a través de la fuente 104 de fluido. El inyector/extractor 108 de células se controla de forma independiente, aunque el inyector/extractor 108 puede ser controlado por la CPU 110 tal y como se muestra en la figura 1. El inyector/extractor 108 de células es un componente opcional y no es necesario.

Aunque no se requiere, se puede aplicar presión desde una o más fuentes 118 de presión para crear un diferencial de presión que cause movimientos mecánicos dentro del dispositivo 102. En un modo de realización en el cual las presiones son utilizadas con el dispositivo, la fuente 118 de presión está controlada por la CPU 110 para aplicar un diferencial de presión dentro del dispositivo para causar de forma eficaz que una o más membranas (figuras 3A-3B) dentro del dispositivo se expandan y/o contraigan en respuesta al diferencial de presión aplicado. La presión aplicada al dispositivo 100 por la fuente 118 de presión es una presión positiva, dependiendo de la configuración o aplicación del dispositivo. Adicionalmente o alternativamente, la presión aplicada por la fuente 118 de presión es una presión negativa, tal como vacío o succión, dependiendo de la configuración o aplicación del dispositivo. La fuente 118 de presión es de forma preferible controlada por la CPU 110 para aplicar presión en intervalos o frecuencias programadas en el dispositivo 102, por lo que los intervalos de tiempo pueden ser ajustados para ser uniformes o no uniformes. La fuente 118 de presión puede ser controlada para aplicar una presión uniforme en los intervalos de tiempo o puede aplicar diferentes presiones en diferentes intervalos. Por ejemplo, la presión aplicada por la fuente 118 de presión puede tener una gran magnitud y/o ser ajustada a una frecuencia deseada para imitar a una persona que corre o se sufre un esfuerzo. La fuente 118 de presión también puede aplicar patrones lentos e irregulares, como simular que una persona duerme. La CPU 110 acciona la fuente 118 de presión para variar aleatoriamente los intervalos de aplicación de presión para causar patrones cíclicos de estiramiento para simular irregularidades en la frecuencia respiratoria y los volúmenes tidales durante la respiración natural.

Uno o más sensores 120 pueden ser acoplados al dispositivo 102 para monitorizar una o más áreas dentro del dispositivo 102, por lo que los sensores 120 proporcionan datos de monitorización a la CPU 110. Un tipo de sensor 120 es de forma preferible un sensor de presión que proporciona datos referentes a la cantidad de presión en uno o más microcanales de servicio o centrales del dispositivo 102. Los datos de presión de los lados opuestos de las paredes de los microcanales pueden utilizarse para calcular la información diferencial de presión en tiempo real entre

los microcanales central y de servicio. Los datos de monitorización serían utilizados por la CPU 110 para proporcionar información sobre las condiciones operativas del dispositivo, así como sobre cómo se están comportando las células dentro del dispositivo 102 en entornos particulares en tiempo real. El sensor 120 puede ser un electrodo, tener capacidades infrarrojas, ópticas (por ejemplo, cámara, LED) o magnéticas, o utilizar cualquier otro tipo de tecnología apropiada para proporcionar los datos de monitorización. Por ejemplo, el sensor puede ser uno o más microelectrodos que analizan las características eléctricas a través de la membrana (por ejemplo, diferencia de potencial, resistencia y corriente de cortocircuito) para confirmar la formación de una barrera organizada, así como su función de transporte de fluido/ion a través de la membrana. Debería señalarse que el sensor 120 puede ser externo al dispositivo 102 o estar integrado en el dispositivo 102. Se contempla que la CPU 110 controla el funcionamiento del sensor 120, aunque no es necesario. Los datos se muestran de forma preferible en la pantalla 116.

La figura 2A ilustra una vista en perspectiva del dispositivo de interfaz tisular de acuerdo con un modo de realización. En particular, tal y como se muestra en la figura 2A, el dispositivo 200 (también referido al número de referencia 102) de forma preferible incluye un cuerpo 202 que tiene un diseño 203 de microcanal ramificado de acuerdo con un modo de realización. El cuerpo puede estar hecho de un material flexible, aunque se contempla que el cuerpo esté hecho alternativamente de un material no flexible. Debería señalarse que el diseño 203 del microcanal es sólo a modo de ejemplo y no se limita a la configuración mostrada en la figura 2A. El cuerpo 202 está de forma preferible hecho de un polímero biocompatible flexible, incluyendo pero no limitado a, polidimetil siloxano (PDMS), o poliimida. También se contempla que el cuerpo 202 pueda estar hecho de materiales no flexibles como vidrio, silicona, plástico duro y similares. Aunque es preferible que la membrana de interfaz esté hecha del mismo material que el cuerpo 202, se contempla que la membrana de interfaz esté hecha de un material diferente al cuerpo del dispositivo.

El dispositivo en la figura 2A incluye una pluralidad de puertos 205 que se describirán con más detalle a continuación. Además, la configuración 203 ramificada incluye una región de simulación de interfaz tejido-tejido (membrana 208 en la figura 2B) donde se monitoriza el comportamiento celular y/o el paso de gases, químicos, moléculas, partículas y células. La figura 2B ilustra una vista despiezada del dispositivo de imitación de órganos de acuerdo con un modo de realización. En particular, el cuerpo 202 exterior del dispositivo 200 está de forma preferible comprendido de una primera porción 204 de cuerpo exterior, una segunda porción 206 de cuerpo exterior y una membrana 208 porosa intermediaria configurada para ser montada entre las primeras y segundas porciones 204, 206 de cuerpo exteriores cuando las porciones 204, 206 están montadas entre sí para formar el cuerpo completo.

La figura 2B ilustra una vista en explosión del dispositivo de acuerdo con un modo de realización. Tal y como se muestra en la figura 2B, la primera porción 204 exterior del cuerpo incluye uno o más puertos 210 de fluido de entrada de forma preferible en comunicación con una o más aberturas 211 de entrada correspondientes ubicadas en una superficie exterior del cuerpo 202. El dispositivo 100 está de forma preferible conectado a la fuente 104 de fluido a través de la abertura 211 de entrada en la cual el fluido se desplaza de la fuente 104 de fluido al dispositivo 100 a través del puerto 210 de fluido de entrada.

Además, la primera porción 204 exterior del cuerpo incluye uno o más puertos 212 de fluido de salida de forma preferible en comunicación con una o más aberturas 215 de salida correspondientes en la superficie exterior del cuerpo 202. En particular, el fluido que pasa a través del dispositivo 100 sale del dispositivo 100 hacia un colector 108 de fluido u otro componente apropiado a través de la correspondiente abertura 215 de salida. Debería señalarse que el dispositivo 200 puede configurarse de forma que el puerto 210 de fluido sea una salida y el puerto 212 de fluido sea una entrada. Aunque las aberturas 211, 215 de entrada y salida se muestran en la superficie superior del cuerpo 202, una o más de las aberturas pueden estar ubicadas en uno o más lados del cuerpo.

El puerto 210 de entrada de fluido y el puerto 212 de salida de fluido están en comunicación con el primer microcanal 250A central (véase la figura 3A) de tal manera que el fluido puede desplazarse dinámicamente desde el puerto 210 de entrada de fluido al puerto 212 de salida de fluido a través del primer microcanal 250A central, independientemente del segundo microcanal 250B central (véase la figura 3A).

También se contempla que el fluido que pasa entre los puertos de entrada y salida de fluido puede ser compartido entre las secciones 250A y 250B centrales. En cualquier modo de realización, características del flujo de fluido, tal como el caudal y similares, que pasa a través del microcanal 250A central se puede controlar independientemente de las características del flujo de fluido a través del microcanal 250B central y viceversa.

Además, la primera porción 204 incluye uno o más puertos 214 de entrada de presión y uno o más puertos 216 de salida de presión en los cuales los puertos 214 de entrada están en comunicación con las correspondientes aberturas 217 ubicadas en la superficie externa del dispositivo 100. Aunque las aberturas de entrada y salida se muestran en la superficie superior del cuerpo 202, una o más de las aberturas pueden ubicarse alternativamente en uno o más lados del cuerpo.

Durante el funcionamiento, uno o varios tubos de presión (no mostrados) conectados a la fuente 118 de presión (figura 1) proporcionan presión positiva o negativa al dispositivo a través de las aberturas 217. Además, los tubos de presión (no mostrados) están conectados al dispositivo 100 para eliminar el fluido presurizado del puerto 216 de salida a través de las aberturas 223. Hay que tener en cuenta que el dispositivo 200 puede configurarse de forma que el puerto 214 de presión sea una salida y el puerto 216 de presión sea una entrada. Debería señalarse que aunque las aberturas

217, 223 de presión se muestran en la superficie superior del cuerpo 202, se contempla que una o más de las aberturas 217, 223 de presión puedan estar ubicadas en una o más superficies laterales del cuerpo 202.

5 Con referencia a la figura 2B, la segunda parte 206 exterior del cuerpo incluye de forma preferible uno o más puertos 218 de fluido de entrada y uno o más puertos 220 de fluido de salida. Se prefiere que el puerto 218 de fluido de entrada esté en comunicación con la abertura 219 y el puerto 220 de fluido de salida esté en comunicación con la abertura 221, por lo que las aberturas 219 y 221 están de forma preferible ubicadas en la superficie exterior de la segunda porción 206 de cuerpo exterior. Aunque las aberturas de entrada y salida se muestran en la superficie del cuerpo 202, una o más de las aberturas pueden ubicarse alternativamente en uno o más lados del cuerpo.

10 Al igual que con la primera porción 204 exterior del cuerpo descrita anteriormente, uno o más tubos de fluido conectados a la fuente 104 de fluido (figura 1) están de forma preferible acoplados a la abertura 219 para proporcionar fluido al dispositivo 100 a través del puerto 218. Además, el fluido sale del dispositivo 100 a través del puerto 220 de salida y una abertura 221 de salida hacia un depósito/colector 108 de fluido u otro componente. Debería señalarse que el dispositivo 200 puede configurarse de forma que el puerto 218 de fluido sea una salida y el puerto 220 de fluido sea una entrada.

15 Además, es preferible que la segunda porción 206 exterior del cuerpo incluya uno o más puertos 222 de entrada de presión y uno o más puertos 224 de salida de presión. En particular, es preferible que los puertos 222 de entrada de presión estén en comunicación con las aberturas 227 y los puertos 224 de salida de presión estén en comunicación con las aberturas 229, por lo que las aberturas 227 y 229 se ubican de forma preferible en la superficie exterior de la segunda porción 206. Aunque las aberturas de entrada y salida se muestran en la superficie inferior del cuerpo 202, una o más de las aberturas pueden ubicarse alternativamente en uno o más lados del cuerpo. Los tubos de presión conectados a la fuente 118 de presión ("figura 1") se conectan de forma preferible con los puertos 222 y 224 a través de las aberturas 227 y 229 correspondientes. Debería señalarse que el dispositivo 200 puede configurarse de forma que el puerto 222 de presión sea una salida y el puerto 224 de fluido sea una entrada.

25 La membrana 208 se monta entre la primera porción 204 y la segunda porción 206, por lo que la membrana 208 se ubica dentro del cuerpo 202 del dispositivo 200 (véase la figura 5E). En un modo de realización, la membrana 208 está hecha de un material que tiene una pluralidad de poros o aberturas a través de la misma, por lo que moléculas, células, fluido o cualquier medio son capaces de pasar a través de la membrana 208 a través de uno o más poros en la membrana 208. Tal y como se discutió más detalladamente abajo, está contemplado en un modo de realización que la membrana 208 porosa puede estar hecha de un material que permite a la membrana 208 sufrir un estrés y/o una tensión en respuesta a un diferencial de presión presente entre los microcanales 250A, 250B centrales y los microcanales de servicio. Alternativamente, la membrana 208 porosa es relativamente inelástica ya que la membrana 208 sufre un movimiento mínimo o nulo mientras que el medio pasa a través de uno o más de los microcanales 250A, 250B centrales y las células se organizan y se mueven entre los microcanales 250A, 250B centrales a través de la membrana porosa.

35 Con referencia a la figura 2C, ilustra una vista en perspectiva de la región de la interfaz tejido-tejido de la primera porción 204 externa del cuerpo tomada en la línea C-C (de la figura 2B). Tal y como se muestra en la figura 2C, la parte superior de la región 207A de interfaz tejido-tejido está dentro del cuerpo de la primera porción 204 e incluye una porción superior de un microcanal 230 central y uno o más porciones superiores de los microcanales 232 de servicio laterales ubicados adyacentes al microcanal 230 central. Las paredes del microcanal 234 separan de forma preferible el microcanal 230 central de los microcanales 232 de servicio, de modo que el fluido que se desplaza por el microcanal 230 central no pasa a los microcanales 232 de servicio. Asimismo, las paredes 234 de canal evitan que el fluido presurizado que pasa a lo largo de los microcanales 232 de servicio entre en el microcanal 230 central. Debería señalarse que un par de microcanales 232 de servicio se muestran en los lados opuestos del microcanal 230 central en las figuras 2C y 3A, sin embargo, se contempla que el dispositivo puede incorporar más de dos microcanales 232 de servicio. También se contempla que el dispositivo 200 puede incluir sólo un microcanal 232 de servicio adyacente al microcanal 230 central.

50 La figura 2D ilustra una vista en perspectiva de la región de la interfaz tisular tomada en la línea D-D de la segunda porción 206 externa del cuerpo. Tal y como se muestra en la figura 2D, la región de interfaz tisular incluye una porción inferior del microcanal 240 central y al menos dos porciones inferiores de los microcanales 242 de servicio ubicados junto a la porción del microcanal central 240. Un par de paredes 234 de canal de forma preferible separan el microcanal central 240 de los microcanales 232 de servicio de tal manera que el fluido que viaja a través del microcanal central 230 no pasa a los microcanales 232 de servicio. Asimismo, las paredes 234 del canal evitan que el fluido presurizado que pasa a lo largo de los microcanales 232 de servicio entre en el microcanal central 230.

55 Tal y como se muestra en las figuras 2C y 2D, las porciones 230 y 240 superior e inferior del microcanal central tienen cada una un rango de dimensiones de ancho (mostrado como B) de entre 50 y 1000 micrones, y de forma preferible alrededor de 400 micrones. Debería señalarse que se contemplan otras dimensiones de anchura dependiendo del tipo de sistema fisiológico que se esté imitando en el dispositivo. Además, las porciones superior e inferior de los microcanales 232 y 242 de servicio tienen cada una, una dimensión de ancho (mostrada como A) de entre 25 y 800 micrones, y de forma preferible alrededor de 200 micrones, aunque se contemplan otras dimensiones de ancho. Las dimensiones de altura de los microcanales centrales y/o de servicio oscilan entre 50 micrones y varios centímetros, y

de forma preferible alrededor de 200 micrones. Las paredes 234, 244 de microcanal de forma preferible tienen una gama de espesor de entre 5 micrones a 50 micrones, aunque están contempladas otras dimensiones de anchura dependiendo del material utilizado para las paredes, la aplicación en la que se utilice el dispositivo y similares.

5 La figura 3A ilustra una vista en perspectiva de la región de la interfaz tisular dentro del cuerpo de acuerdo con un modo de realización. En particular, la figura 3A ilustra la primera porción 207A y la segunda porción 207B acopladas entre sí, por lo que las paredes 228 y 238 laterales, así como las paredes 234 y 244 del canal forman el microcanal 250 central general y los microcanales 252 de servicio. Como se ha indicado anteriormente, es preferible que el microcanal 250 central y los microcanales 252 de servicio estén separados por las paredes 234, 244 de tal manera que el fluido no sea capaz de pasar entre los canales 250, 252.

10 La membrana 208 está situada de forma preferible en el centro del microcanal 250 central y está orientada a lo largo de un plano paralelo al plano x-y mostrado en la figura 3A. Debería señalarse que aunque una membrana 208 se muestra en el microcanal 250 central, más de una membrana 208 puede estar configurada dentro del microcanal 250 central, tal y como se discute en más detalle a continuación. Además de estar colocada dentro del microcanal 250 central, la membrana 208 se intercalan su lugar mediante las paredes 234, 244 del canal durante la formación del dispositivo.

15 La membrana 208 de forma preferible separa el microcanal 250 central general en dos o más microcanales 250A y 250B centrales distintos. Debería señalarse que, aunque la membrana 208 se muestra a mitad de camino a través del microcanal 250 central, la membrana 208 puede colocarse alternativamente verticalmente descentrada dentro del microcanal 250 central, lo que hace que una de las secciones 250A, 250B del microcanal central sea más grande en volumen o sección transversal que la otra sección de microcanal.

20 Tal y como se discute más detalladamente más abajo, la membrana puede tener al menos una porción porosa para permitir que las células o moléculas pasen a través de ella. Adicionalmente o alternativamente, al menos una porción de la membrana 208 puede tener propiedades elásticas o dúctiles que permiten que la membrana 208 sea manipulada para expandirse/contraerse a lo largo de uno o más ejes planos. Por tanto, se contempla que una o más porciones de la membrana 208 puedan ser porosas y elásticas o porosas, pero inelásticas.

25 Con respecto a la membrana porosa y elástica, se puede aplicar un diferencial de presión dentro del dispositivo para causar la expansión y contracción continua relativa de la membrana 208 a lo largo del plano x-y. En particular, tal y como indicó anteriormente, una o más fuentes de presión aplican de forma preferible fluido presurizado (por ejemplo, aire) a lo largo de uno o más microcanales 252 de servicio, por lo que el fluido presurizado en los microcanales 252 crea un diferencial de presión en las paredes 234, 244 de microcanal. La membrana 208 puede tener una elasticidad dependiendo del tipo de material con el que esté fabricada. Si la membrana 208 está hecha de más de un material, la relación de peso de los respectivos materiales que componen la membrana es un factor para determinar la elasticidad. Por ejemplo, en el modo de realización en el que la membrana 208 está hecha de PDMS, los valores de módulo de Young están en los rangos de 12kPa-20MPa, aunque se contemplan otros valores de elasticidad.

30 En los modos de realización mostrados en las figuras 3A y 3B, el fluido presurizado es una fuerza de vacío o de succión que se aplica sólo a través de los microcanales 252 de servicio. La diferencia de presión causada por la fuerza de succión contra las paredes 234, 244 de microcanal hace que las paredes 234, 244 se doblen o se abomben hacia afuera, hacia los lados del dispositivo 228, 238 (véase la figura 3B). Considerando que la membrana 208 está montada e interpuesta entre las paredes 234, 244, el movimiento relativo de las paredes 234, 244 por tanto hace que los extremos opuestos de la membrana se muevan junto con las paredes para estirarse (mostrado como 208' en la figura 3B) a lo largo del plano de la membrana. Este estiramiento imita las fuerzas mecánicas experimentadas por una interfaz tejido-tejido, por ejemplo, en el alvéolo pulmonar durante la respiración, y por lo tanto proporciona una importante regulación para el auto-ensamblaje celular en las estructuras tisulares y el comportamiento celular.

35 Cuando ya no se aplica presión negativa (y/o se aplica presión positiva en los canales de servicio), la diferencia de presión entre los canales 252 de servicio y el canal 250 central disminuye y las paredes 234, 244 del canal se retraen elásticamente hacia su posición neutra (como en la figura 3A). Durante el funcionamiento, la presión negativa se aplica alternativamente en intervalos de tiempo al dispositivo 200 para causar expansión y contracción continua de la membrana 208 a lo largo de su plano, imitando así el funcionamiento de la interfaz tejido-tejido del órgano vivo dentro de un ambiente controlado in vitro. Tal y como se discutirá más adelante, este funcionamiento de órgano imitado dentro del ambiente controlado permite monitorizar el comportamiento celular en los tejidos, así como el paso de moléculas, productos químicos, partículas y células con respecto a la membrana y al primer y segundo microcanales 250A, 250B asociados.

40 Debería señalarse que el término de diferencial de presión en la presente memoria descriptiva se refiere a una diferencia de presión en lados opuestos de una pared particular entre el microcanal central y el canal de servicio exterior. Se contempla que el diferencial de presión puede crearse de varias maneras para lograr el objetivo de expansión y/o contracción de la membrana 208. Tal y como se indicó anteriormente, se puede aplicar una presión negativa (es decir, succión o vacío) a uno o más de los canales de servicio. Alternativamente, se contempla que la membrana 208 está precargada o pretensada para estar en un estado expandido por defecto de tal manera que las paredes 234, 244 ya están en la configuración doblada, tal y como se muestra en la figura 3B. En este modo de

realización, la presión positiva aplicada al canal 252 de servicio creará el diferencial de presión que hace que las paredes 234, 244 se muevan hacia adentro hacia el microcanal central (véase en la figura 3A) para contraer la membrana 208.

5 También se contempla que una combinación de presión positiva y negativa sea aplicada a uno o más microcanales 252 de servicio para causar movimiento de la membrana 208 a lo largo de su plano en el microcanal central. En cualquiera de los modos de realización anteriores, se desea que la presión del fluido en el uno o más canales 252 de servicio sea tal que de hecho se crea un diferencial de presión con respecto a la presión del(de los) fluido(s) en uno o más del microcanal(s) 250A, 250B central(es) para causar la expansión/contracción relativa de la membrana 208. Por ejemplo, el fluido puede tener una cierta presión que puede estar aplicada dentro del microcanal 250A central superior, mientras que el fluido en el microcanal 250B central inferior puede tener una presión diferente. En este ejemplo, la presión aplicada a uno o más canales 252 de servicio debe tener en cuenta la presión del fluido en uno o ambos microcanales 250A, 250B centrales para asegurar la expansión/contracción deseada de la membrana 208.

15 Es posible que exista una diferencia de presión entre los microcanales 250A, 250B superior e inferior para causar que al menos una porción de la membrana 208 se expanda y/o contraiga verticalmente en la dirección z además de la expansión/contracción a lo largo del plano x-y.

20 En un modo de realización, la expansión y retracción de la membrana 208 aplica de forma preferible fuerzas mecánicas a las células adheridas y a la MEC que imitan señales mecánicas fisiológicas que pueden influir en el transporte de productos químicos, partículas de moléculas y/o fluidos o gases a través de la interfaz tejido-tejido, y alterar la fisiología celular. Debería señalarse que aunque los diferenciales de presión creados en el dispositivo, de forma preferible, causan una expansión/contracción de la membrana, se contempla que medios mecánicos, tales como micromotores o actuadores, pueden ser empleados para asistir o sustituir la presión diferencial para causar una expansión/contracción de las células en la membrana para modular la fisiología de la célula.

25 Las figuras 3E y 4C ilustran vistas en perspectiva de la membrana 208 que incluye una pluralidad de aberturas 302 que se extienden a través de la misma de acuerdo con un modo de realización. En particular, la membrana mostrada en las figuras 3E y 4C incluye uno o más poros o aberturas 302 integrados que se extienden entre una superficie 304 superior y una superficie 306 inferior de la membrana 208.

30 La membrana está configurada para permitir la migración de células, partículas, productos químicos y/o medios entre las porciones del microcanal 250A, 250B central a través de la membrana 208 desde una sección del microcanal central a la otra o viceversa. En las figuras 4A-4C se muestra que las aberturas de los poros tienen una forma de sección transversal pentagonal, aunque se contempla cualquier otra forma de sección transversal, incluyendo pero no limitándose a, una forma circular 302, hexagonal 308, cuadrada, elíptica 310 y similares. Los poros 302, 308, 310 (generalmente referidos como el número de referencia 302) de forma preferible se extienden verticalmente entre las superficies 304, 306 superior e inferior, aunque se contempla que puedan extenderse lateralmente tanto entre las superficies superior e inferior, como con el poro 312. También debería señalarse que las poros pueden incorporar adicionalmente/alternativamente rendijas u otras aberturas con forma a lo largo de al menos una porción de la membrana 208 que permiten el paso de células, partículas, productos químicos y/o fluidos a través de la membrana 208 de una sección del microcanal central a la otra.

40 La dimensión de anchura de los poros está de forma preferible en el rango de 0,5 micrones y 20 micrones, aunque es preferible que la dimensión de anchura sea de aproximadamente 10 micrones. Se contempla, sin embargo, que la dimensión de anchura esté fuera del rango provisto arriba. En algunos modos de realización, la membrana 208 tiene poros o aberturas mayores que los dispositivos de filtración molecular/química tradicionales, que permiten que tanto las células como las moléculas migren a través de la membrana 208 de una sección de microcanal (por ejemplo, 250A) a la otra sección de microcanal (por ejemplo, 250B) o viceversa. Esto puede ser útil en el cultivo de células que se polarizan en los canales centrales superior e inferior centrales en respuesta a estar en el entorno de microcanal proporcionado por el dispositivo, por lo que el(los) fluido(s) y las células pasan dinámicamente a través de poros que conectan estos microcanales 250A, 250B.

50 Tal y como se muestra en la figura 4B, el espesor de la membrana 208 puede estar entre 70 nanómetros y 50 micrones, aunque un rango preferido de espesor estaría entre 5 y 15 micrones. También se contempla que la membrana 208 esté diseñada para incluir regiones que tengan menor o mayor espesor que otras regiones de la membrana 208. Tal y como se muestra en la figura 3C, se muestra que la membrana 208 tiene una o más áreas 209 de espesor reducido en relación con las otras áreas de la membrana 208. La(s) área(s) de espesor reducido(s) 209 puede(n) discurrir a lo largo de todo el largo o ancho de la membrana 208 o alternativamente puede(n) estar localizada(s) sólo en ciertas localizaciones de la membrana 208. Debería señalarse que aunque el área 209 de disminución de espesor se muestra a lo largo de la superficie inferior de la membrana 208 (es decir, frente al microcanal 250B), se contempla que el(las) área(s) 209 de disminución de espesor puede estar adicionalmente/alternativamente en la superficie opuesta de la membrana 208 (es decir, frente al microcanal 250A). También debería señalarse que por lo menos porciones de la membrana 208 pueden tener una o más áreas 209' de mayor espesor en relación con el resto de la membrana, tal y como se muestra en la figura 3D y capaces de tener las mismas alternativas que las áreas de espesor reducido descritas anteriormente.

La membrana 208 porosa puede diseñarse o estamparse en la superficie para incluir patrones micro y/o nanoscópicos en la misma, tales como surcos y crestas, por medio de los cuales cualquier parámetro o característica de los patrones puede diseñarse a tamaños, formas, espesores, materiales de relleno y similares deseados.

5 La membrana 208 está hecha de polidimetilsiloxano (PDMS) o de cualquier otro compuesto o material polimérico, aunque esto no es necesario. Por ejemplo, la membrana 208 puede estar hecha de poliimida, poliéster, policarbonato, copolímero de ciclicolefina, polimetilmetacrilato, nylon, poliisopreno, polibutadieno, policlorofeno, polisobutileno, poli(estireno-butadieno-estireno), nitrilos, poliuretanos y polisiliconas. GE RTV 615, se puede utilizar un elastómero de silicona entrecruzado (tipo) de vinil-silano (familia). Las membranas de Polidimetilsiloxano (PDMS) están disponibles
10 en las membranas HT-6135 y HT-6240 de Bisco Silicons (Elk Grove, Illinois) y son útiles en aplicaciones seleccionadas. La elección de los materiales depende típicamente de las propiedades particulares del material (por ejemplo, resistencia a los disolventes, rigidez, permeabilidad a los gases y/o estabilidad a la temperatura) requeridas para la aplicación que se está llevando a cabo. Materiales elastoméricos adicionales que pueden utilizarse en la fabricación de los componentes de los dispositivos microfluidicos descritos en Unger y otros (2000 Science 288:113-116). Algunos elastómeros de los dispositivos actuales se utilizan como diafragmas y además de sus propiedades de
15 estiramiento y relajación, también se seleccionan por su porosidad, impermeabilidad, resistencia química y sus características de humectación y pasivación. Otros elastómeros se seleccionan por su conductividad térmica. El material Thermagap de Parker Chomerics 61-02-0404-F574 (0,020" de espesor) es un elastómero blando (<5Shore A) que sólo necesita una presión de 5 a 10 psi para proporcionar una conductividad térmica de 1,6 W/m²·K. En el dispositivo microfluidico también se pueden utilizar láminas deformables y poco elásticas. También se puede utilizar
20 seda, geles MEC con o sin reticulación como otros materiales adecuados para hacer los dispositivos y membranas como se ha descrito.

Debería señalarse que, aunque se ha mostrado que los microcanales 250, 252 centrales y de servicio tienen secciones transversales sustancialmente cuadradas o rectangulares, se contemplan otras formas de sección transversal tales como circular, ovalada, hexagonal y similares. También se contempla que el dispositivo 200 puede tener más o menos
25 de dos canales 252 de servicio y/o más o menos de dos microcanales 250A, 250B centrales de acuerdo con un modo de realización.

Se ha contemplado que el microcanal central tenga una dimensión B de anchura no uniforme a lo largo de al menos una porción de su longitud en el dispositivo. La figura 2E ilustra una vista transversal de arriba hacia abajo de la región de interfaz 400 de tejido de acuerdo con un modo de realización. Tal y como se muestra en la figura 2E, la interfaz
30 400 incluye el microcanal 402 central junto con los canales 406 de servicio adyacentes separados por paredes 404 de microcanal. En el modo de realización de la figura 2E, se muestra que el microcanal 402 central tiene un ancho que aumenta gradualmente desde la dimensión C de anchura (en el extremo 408) hasta la dimensión D de anchura (en el extremo 410). En la figura 2E, los canales 406 de servicio tienen una dimensión de anchura decreciente (desde la dimensión E de anchura en el extremo 408 a la dimensión F de anchura en el extremo 410). Tal y como se muestra
35 en la figura 2F, los canales 406' de servicio tienen una dimensión F de anchura sustancialmente uniforme en los extremos 408 y 410. Se contempla que la membrana (no mostrada) se coloque sobre el microcanal 402 central y se monte sobre la superficie superior de las paredes 404, por lo que la membrana tiene una forma cónica similar al microcanal 402 central. De este modo, la membrana cónica sufriría un estiramiento no uniforme en la dirección de las flechas cuando se aplica el diferencial de presión entre los 406 microcanales de servicio y el microcanal 402 central.

40 El microcanal central puede tener una porción que tiene una forma seccional transversal parcialmente circular, tal y como se muestra en la figura 2G. En particular al modo de realización en la figura 2G, un diferencial de presión creado entre el microcanal 502 central y los microcanales 504 de servicio adyacentes causará que las paredes 506 de microcanal se muevan en la dirección representada por las flechas. Con respecto a la porción 508 circular del microcanal 502 central, el movimiento equiaxial hacia afuera de las paredes (tal y como se muestra mediante las flechas) en la porción 508 central produce un estiramiento equiaxial de la membrana (no mostrado) montada encima
45 de las paredes 506.

El dispositivo 200 descrito en el presente documento tiene potencial para varias aplicaciones. Por ejemplo, en una aplicación, la membrana 208 puede estar sujeta a una tensión mecánica fisiológica generada por el estiramiento cíclico de la membrana 208 y/o el flujo de fluidos biológicos (por ejemplo, aire, moco, sangre) para recapitular el microambiente nativo de los alvéolos y los capilares pulmonares subyacentes. En un modo de realización, las condiciones de cultivo de las células sobre la membrana 208 pueden ser optimizadas bajo un recubrimiento de matriz extracelular (MEC), perfusión de medios, o tensión mecánica cíclica para mantener las características morfológicas y funcionales de las células co-cultivadas y permitir su interacción celular directa a través de la membrana 208. El dispositivo 200 permitiría por tanto el cultivo celular a largo plazo y el estiramiento mecánico dinámico de una monocapa adyacente de células epiteliales o endoteliales de pulmón que crecen en la membrana al mismo tiempo.
55

Al utilizar la membrana 208 para simular la interfaz tejido-tejido entre el epitelio alveolar y el endotelio pulmonar en el pulmón, un método puede consistir en aplicar células epiteliales alveolares tipo I al lado de la membrana 208 que mira hacia la primera sección 250A (de aquí en adelante, el lado superior de la membrana) para imitar la capa epitelial. Sin embargo, es posible mezclar células epiteliales alveolares tipo I y tipo II en una proporción de aproximadamente 7:13
60 para reconstruir la composición celular in vivo del epitelio alveolar. En el método de ejemplo, células endoteliales microvasculares pulmonares se cultivan en el lado opuesto de la membrana 208 dirigidas a la segunda sección 250B

(en adelante, el lado inferior de la membrana). En el método del ejemplo, la presión negativa se aplica cíclicamente al dispositivo 200 para hacer que la membrana 208 se expanda y contraiga continuamente a lo largo de su plano.

5 Durante dicho funcionamiento, una unidad alveolar-capilar fisiológica puede ser formada en la membrana 208 ya que estructuras típicas de unión pueden formarse en la membrana 207 y fluidos así como iones pueden ser transportados a través de la membrana 208 entre la primera y segunda secciones 250A, 250B. La formación de uniones apretadas en la membrana 208 puede evaluarse utilizando la detección inmunohistoquímica en el chip de proteínas de uniones apretadas tales como ZO-1 y ocludina. Adicionalmente o alternativamente, la exclusión de moléculas grandes marcadas fluorescentemente (por ejemplo, dextranos de diferente peso) puede ser cuantificada para determinar la permeabilidad de la membrana y optimizar la formación de la barrera de la membrana epitelial al variar las condiciones de cultivo. Además, pueden emplearse técnicas histológicas, bioquímicas y microfluorimétricas para demostrar la formación de una unidad alveolar-capilar funcional que reproduzca la organización estructural clave de su homóloga in vivo en la membrana 208.

15 La función de intercambio gaseoso de la interfaz tejido-tejido autoensamblada en la membrana 208 puede determinarse inyectando diferentes fluidos, cada uno con su propia presión parcial de oxígeno y sangre, en las respectivas primera y segunda secciones 250A, 250B, por lo que la primera sección 250A actúa como el compartimento alveolar y la segunda sección 250B actúa como el compartimento microvascular. Un dispositivo de medición sangre-gas de forma preferible dentro del dispositivo 200 se utiliza para medir el nivel de oxígeno en la sangre en las secciones 250A, 250B respectivas antes y después del paso de la sangre a través del dispositivo. Por ejemplo, la sangre puede fluir a través del canal 250B mientras se inyecta aire en el canal superior 250A, por lo que el aire que sale se recoge y se mide para determinar el nivel de oxígeno utilizando un oxímetro. Los oxímetros pueden integrarse con el sistema existente o como una unidad separada conectada al puerto de salida de uno o más microcanales centrales. En un modo de realización, aire u otro medio con aerosoles que contienen fármacos o partículas puede fluir a través del dispositivo, por lo que es entonces medido el transporte de estos fármacos o partículas a la sangre a través de la membrana. También se contempla la adición de patógenos o citoquinas al aire o al medio gaseoso y luego se mide la adhesión de las células inmunitarias al endotelio capilar cercano y su paso junto con el fluido de edema desde el lado sanguíneo al lado de las vías respiratorias, así como la entrada de patógenos a la sangre.

25 Dado que la funcionalidad de un epitelio requiere la polarización de las células constituyentes, la estructura de la membrana puede ser visualizada usando microscopía electrónica de transmisión, inmunohistoquímica, microscopía confocal, u otros medios apropiados para monitorizar la polarización de la parte de la membrana 208 correspondiente a la célula epitelial alveolar. En un modo de realización de imitación pulmonar, se puede aplicar un tinte fluorescente al primer y/o segundo microcanales 250A, 250B para determinar la producción de tensioactivo pulmonar por el epitelio de las vías respiratorias en la membrana 208. En particular, células epiteliales alveolares en la membrana 208 pueden ser monitorizadas midiendo la fluorescencia resultante de la captación celular del tinte de fluorescencia que específicamente etiqueta el almacenamiento intracelular del tensioactivo pulmonar (por ejemplo, quinacrina) o usando anticuerpos específicos.

30 Una de las capacidades únicas del dispositivo 200 de interfaz tisular permite el desarrollo de modelos in vitro que simulan las respuestas inflamatorias del pulmón a nivel de órgano para permitir el estudio de cómo las células inmunitarias migran desde la sangre, a través del endotelio y hacia el compartimento alveolar. Una forma de lograrlo es mediante la administración microfluídica controlada y programable de factores proinflamatorios (por ejemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-8, micro y nanopartículas de sílice, patógenos) a la primera sección 250A, así como al flujo de sangre humana completa o medio que contiene células inmunitarias circulantes en la segunda sección 250B. Se puede monitorizar la resistencia eléctrica y la corriente de cortocircuito a través de la membrana para estudiar los cambios en la permeabilidad vascular, la extravasación del fluido y el paso celular al espacio alveolar durante las respuestas inflamatorias. La microscopía de fluorescencia puede utilizarse para visualizar el comportamiento dinámico de la célula móvil durante la respuesta de extravasación.

40 El dispositivo 200 de interfaz tisular también puede utilizarse para examinar cómo se comportan los nanomateriales con respecto a la interfaz tejido-tejido pulmonar. En particular, los nanomateriales (por ejemplo, las nanopartículas de sílice, las nanopartículas superparamagnéticas, las nanopartículas de oro y los nanotubos de carbono de una sola pared) pueden aplicarse a la superficie de las vías respiratorias de la membrana 208 para investigar los posibles efectos tóxicos de los nanomateriales en las vías respiratorias o en las células endoteliales cultivadas en la membrana 208, así como su paso del canal de la vía respiratoria al canal sanguíneo. Por ejemplo, los sensores 120 pueden utilizarse para monitorizar la trans migración de nanomateriales a través de las barreras tisulares formadas en la membrana 208 y los cambios inducidos por los nanomateriales en las funciones de barrera, como el intercambio de gases y el transporte de fluidos/ion.

55 El dispositivo 200 de interfaz tisular permite el análisis directo de una variedad de áreas importantes de la biología y fisiología pulmonar, incluyendo, pero no limitadas a, el intercambio gaseoso, el transporte de fluido/ion, la inflamación, la infección, el edema/síndrome de dificultad respiratoria, el desarrollo de cáncer y metástasis, la infección por hongos, la administración de fármacos, así como la detección de fármacos, la biodetección y la mecanotransducción pulmonar. Además, el dispositivo 200 permite modelar con precisión las interfaces tejido-tejido biológicas que se encuentran en otros sistemas fisiológicos tal como la barrera hematoencefálica, el intestino, la médula ósea, el glomérulo y el

microambiente tumoral canceroso. Tal y como se ha indicado anteriormente, se puede multiplexar y automatizar más de un dispositivo de interfaz tisular para proporcionar un análisis de alto rendimiento de las respuestas de las células y los tejidos a fármacos, productos químicos, partículas, toxinas, patógenos u otros estímulos ambientales para la detección de fármacos, toxinas y vacunas, así como para aplicaciones de toxicología y biodetección. El dispositivo puede utilizarse para el estudio in vitro de la fisiología de tejidos complejos y órganos, así como para la ingeniería de tejidos y órganos con dispositivos biocompatibles o biodegradables.

El dispositivo 200 de interfaz tisular puede utilizarse para producir capas de tejido artificial en el mismo. En el modo de realización, dos o más tipos diferentes de células se aplican sobre superficies opuestas de la membrana 208 y crecen bajo condiciones que imitan los ambientes fisiológicos apropiados. Adicionalmente o alternativamente, se puede aplicar una diferencia de presión entre el microcanal central y al menos uno de los microcanales de servicio, lo que hace que las paredes del microcanal se muevan y, por lo tanto, que la membrana 208 sufra expansión/contracción a lo largo de su plano.

El dispositivo 200 utiliza la membrana 208 porosa, mediante la cual se cultivan células pulmonares en un lado de la membrana 208 y se mantienen células endoteliales en el otro lado de la membrana 208. Durante el funcionamiento del dispositivo 200, estas dos capas de células se comunican entre sí a través del paso de señales químicas y moleculares a través de los poros de la membrana 208. Esta comunicación puede ser monitorizada y analizada para entender cómo las células funcionan de manera diferente como interfaz tejido-tejido, con o sin simulación mecánica fisiológica, y comparada con cuando se hacen crecer como tipos de tejido individuales en forma aislada como en sistemas de cultivo de tejidos estándar. Mediante el seguimiento de los cambios en la fisiología de las células y los tejidos, así como del paso de sustancias químicas, moléculas, partículas y células a través de esta interfaz tejido-tejido, se obtiene información que puede utilizarse para producir fármacos o terapias más eficaces, para identificar toxicidades desconocidas hasta ahora y para acortar significativamente la escala de tiempo de estos procesos de desarrollo. En particular, el comportamiento de las células en un entorno tan controlado permite a los investigadores estudiar una variedad de fenómenos fisiológicos que tienen lugar en los sistemas mencionados anteriormente y que no pueden recrearse utilizando técnicas de cultivo in vitro convencionales. En otras palabras, el dispositivo 200 funciona para crear una barrera de aire sanguíneo artificial que se puede monitorizar fuera del cuerpo del paciente y en un ambiente controlable que todavía retiene las funciones fisiológicas clave y las estructuras del pulmón. Debería señalarse que, aunque el dispositivo descrito anteriormente se describe en términos de imitar la función pulmonar, el dispositivo puede configurarse fácilmente para imitar otros sistemas fisiológicos como la peristalsis y la absorción en el tracto gastrointestinal que contienen poblaciones microbianas vivas, la perfusión y la producción de orina en el riñón, la función de la barrera hematoencefálica, los efectos de la deformación mecánica en el envejecimiento de la piel, la interfaz médula ósea-microvaso con el nicho de células madre hematopoyéticas, y similares.

Los detalles del tratamiento superficial de la membrana y los tipos de medios que pueden ser aplicados a la membrana y/o a través de los microcanales 250A, 250B centrales durante el funcionamiento del dispositivo serán discutidos a continuación. La membrana, incluyendo la membrana porosa, puede estar recubierta de sustancias tales como diversas sustancias promotoras de la adhesión celular o proteínas MEC, tales como fibronectina, laminina o diversos tipos de colágeno o combinaciones de los mismos, tal y como se muestra en la figura 4D. En general, tal y como se muestra en la figura 4D, una o más sustancias 608 se muestra en una superficie de la membrana 604, mientras que otra sustancia 610 se aplica a la superficie opuesta de la membrana 604, o ambas superficies pueden ser recubiertas con la misma sustancia. En algunos modos de realización, los MEC, que pueden ser MEC producidos por células, como células primarias o células madre embrionarias, y otras composiciones de materia, se producen en un entorno libre de suero.

Se recubre la membrana con una combinación de un factor de adhesión celular y una molécula cargada positivamente que se unen a la membrana para mejorar la adhesión celular y estabilizar el crecimiento celular. La molécula cargada positivamente puede ser seleccionada del grupo que consiste en, polilisina, quitosano, poli(etilenoimina) o acrílicos polimerizados de acrilamida o metacrilamida e incorporando grupos cargados positivamente en forma de aminas, primarias, secundarias o terciarias, o sales cuaternarias. El factor de adhesión celular puede ser añadido a la membrana y es de forma preferible fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina o tenascina, o fragmentos o análogos que tienen un dominio de unión celular del mismo. La molécula cargada positivamente y el factor de adhesión celular pueden unirse covalentemente a la membrana. En otro modo de realización, la molécula cargada positivamente y el factor de adhesión de la célula son ligados de forma covalente entre sí y cualquier la molécula cargada positivamente o el factor de adhesión de la célula es ligado de forma covalente a la membrana. También, la molécula cargada positivamente o el factor de adhesión celular o ambos pueden ser proporcionados en la forma de un recubrimiento estable ligado de forma no covalente a la membrana.

Las sustancias que promueven la adhesión celular, las formulaciones que forman la matriz y otras composiciones de materia se esterilizan para evitar la contaminación no deseada. La esterilización puede realizarse, por ejemplo, con luz ultravioleta, filtración o calor. También pueden añadirse antibióticos, especialmente durante la incubación, para prevenir el crecimiento de bacterias, hongos y otros microorganismos no deseados. Tales antibióticos incluyen, mediante un ejemplo o limitativo, gentamicina, estreptomina, penicilina, anfotericina y ciprofloxacina.

En otro modo de realización, la membrana está recubierta de cultivos celulares, incluidos sin limitación, cultivos celulares primarios, líneas celulares establecidas o cultivos de células madre, como ESC, unidos a sustancias MEC que comprenden o consisten esencialmente en fibronectina o colágeno.

5 Las células primarias o líneas celulares unidas a la membrana pueden ser células alveolares, células endoteliales, células intestinales, queratinocitos, que incluyen, sin limitación, queratinocitos dérmicos humanos, o cualquier otro tipo de célula enumerada en otra parte de esta memoria descriptiva o bien conocida por un experto en la técnica. En otros modos de realización, las células primarias pueden ser células de fibroblastos, que incluyen, sin limitación, células de fibroblastos fetales humanos. En algunos modos de realización, células madre de los cultivos de células madre son células madre embrionarias. La fuente de células madre embrionarias puede incluir, sin limitación, mamíferos, incluidos primates no humanos y seres humanos. Ejemplos no limitativos de células madre embrionarias humanas incluyen las líneas BG01, BG02, BG03, BG01v, CHA-hES-1, CHA-hES-2, FCNCBS1, FCNCBS2, FCNCBS3, H1, H7, H9, H13, H14, HSF-1, H9.1, H9.2, HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6, hES-1-2, hES-3-0, hES-4-0, hES-5-1, hES-8-1, hES-8-2, hES-9-1, hES-9-2, HES-101, hICM8, hICM9, hICM40, hICM41, hICM42, hICM43, HSF-6, HUES-1, HUES-2, HUES-3, HUES-4, HUES-5, HUES-6, HUES-7, HUES-8, HUES-9, HUES-10, HUES-11, HUES-12, HUES-13, HUES-14, HUES-15, HUES-16, HUES-17, 13, 14, 16, 13.2, 13.3, 16.2, J3, J3.2, MB01, MB02, MB03, Miz-hES1, RCM-1, RLS ES 05, RLS ES 07, RLS ES 10, RLS ES 13, RLS ES 15, RLS ES 20, RLS ES 21, SA01, SA02 y SA03. En un modo de realización, las células madre de los cultivos de células madre son células madre pluripotentes inducidas.

20 Los cultivos celulares pueden ser cultivos celulares, como los cultivos celulares primarios o los cultivos de células madre libres de suero. En algunos de estos modos de realización, se utiliza un MEC de células primarias libre de suero junto con un medio libre de suero de células primarias (MFS). El SFM adecuado incluye sin limitación (a) medio de cultivo de suero libre EPILIFE® complementado con suplemento de crecimiento definido EPILIFE® y (b) Queratinocito-SFM definido complementado con suplemento de crecimiento de Queratinocito-SFM definido, todos disponibles en el mercado a través de Gibco/Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU.). En algunos de estos modos de realización, se utiliza un MEC de células madre sin suero junto con el MFS de células madre. El SFM adecuado incluye, sin limitación, medio libre de suero hESC (SFM) STEMPRO® complementado con factor de crecimiento básico de fibroblastos y .beta.-mercaptoetanol, KNOCKOUT® D-MEM complementado con KNOCKOUT® Reemplazo de suero (SR), STEMPRO®. MSC SFM y STEMPRO®. NSC SFM, todos disponibles comercialmente en Gibco/Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU.).

30 Las composiciones también pueden estar libres de xeno. Se dice que una composición de materia está "libre de xeno" cuando está desprovista de sustancias de cualquier animal que no sea la especie animal de la que se derivan las células. En un modo de realización, los cultivos de célula que pueden ser cultivos de célula tales como cultivos de célula primarios o cultivos de célula de vástago están libres de xeno. En estos modos de realización, un MEC libre de xeno que puede ser un MEC tal como un MEC de célula primaria o un MEC diseñado específicamente para apoyar crecimiento de célula madre o diferenciación. Estas matrices pueden diseñarse específicamente para que estén libres de xeno.

Los cultivos celulares son células primarias o células madre cultivadas en un medio de cultivo acondicionado. En otros modos de realización, el medio de cultivo es un medio de cultivo no acondicionado.

40 Las condiciones del cultivo celular pueden estar completamente definidas. En estos modos de realización, se utiliza un medio de cultivo celular completamente definido en las cámaras de fluido. Los medios adecuados incluyen sin limitación, para células primarias, EPILIFE®. Medio de cultivo libre de suero suplementado con EPILIFE®. Suplemento de crecimiento definido, y, para las células madre, STEMPRO®. hESC SFM, todos disponibles comercialmente en Gibco/Invitrogen, Carlsbad, Calif., Estados Unidos.

45 Para estudiar los efectos de productos farmacéuticos, estresantes ambientales, patógenos, toxinas, etcétera., se pueden añadir en el medio de cultivo celular deseado adecuado para el crecimiento de las células unidas a la membrana porosa en el canal. Por tanto, se pueden introducir patógenos, como bacterias, virus, aerosoles, diversos tipos de nanopartículas, toxinas, sustancias gaseosas, etcétera., en el medio de cultivo que fluye en las cámaras para alimentar las células.

50 Un experto también será capaz de controlar el equilibrio de pH del medio de acuerdo a la actividad metabólica de las células para mantener el pH en un nivel adecuado para cualquier tipo de célula o tejido en cuestión. Se pueden insertar en el dispositivo monitores y sistemas de ajuste para monitorizar y ajustar el pH.

55 La membrana está de forma preferible recubierta en uno o ambos lados con células, moléculas u otra materia, por lo que el dispositivo proporciona un entorno controlado para controlar el comportamiento celular a lo largo de y/o entre los microcanales a través de la membrana. Se puede utilizar cualquier célula de un organismo multicelular en el dispositivo. Por ejemplo, el cuerpo humano comprende al menos 210 tipos conocidos de células. Un experto puede construir fácilmente combinaciones útiles de las células en el dispositivo. Tipos de células (por ejemplo, humanas) que pueden utilizarse en los dispositivos incluyen, pero no están limitadas a, células del sistema integumentario, entre las que se incluyen las células epiteliales queratinizantes, el queratinocito epidérmico (célula epidérmica diferenciadora), la célula basal epidérmica (célula madre), el queratinocito de las uñas de las manos y de los pies, la célula basal del

lecho ungueal (célula madre), la célula del tallo medular, la célula del tallo cortical, la célula del tallo cuticular, la célula de la vaina de la raíz del cabello cuticular, la célula de la vaina de la raíz del cabello de la capa de Huxley, la célula de la vaina de la raíz del cabello de la capa de Henle, la célula de la vaina de la raíz del cabello externa, la célula de la matriz del cabello (célula madre); células epiteliales de barrera estratificadas húmedas, como la célula epitelial de superficie del epitelio escamoso estratificado de la córnea, la lengua, la cavidad oral, el esófago, el canal anal, la uretra y la vagina distales, la célula basal (célula madre) de la epitelia de la córnea, la lengua, la cavidad oral, el esófago, el canal anal, la uretra y la vagina distales, la célula epitelial del epitelio urinario (revestimiento de la vejiga urinaria y los conductos urinarios); células epiteliales secretoras exocrinas, como la célula mucosa de la glándula salival (secreción rica en polisacáridos), la célula serosa de la glándula salival (secreción rica en enzimas glicoproteicas), la célula de la glándula de Von Ebner en la lengua (lava las papilas gustativas), la célula de la glándula mamaria (secreción de leche), la célula de la glándula lagrimal (secreción de lágrimas), la célula de la glándula ceruminosa en el oído (secreción de cera), la célula oscura de la glándula sudorípara ecrina (secreción de glicoproteínas), la célula clara de la glándula sudorípara ecrina (secreción de moléculas pequeñas), la célula de la glándula sudorípara apocrina (secreción odorífera, sensible a hormonas sexuales), glándula de la célula Moll en el párpado (glándula sudorípara especializada), la célula de la glándula sebácea (secreción sebácea rica en lípidos), la célula de la glándula de Bowman en la nariz (lava el epitelio olfativo), la célula de la glándula de Brunner en el duodeno (enzimas y moco alcalino), la célula vesicular seminal (secreta los componentes del fluido seminal, incluyendo la fructosa para que naden los espermatozoides), la célula de la glándula de la próstata (secreta componentes del fluido seminal), la célula de la glándula bulbouretral (secreción de moco), la célula de la glándula de Bartholin (secreción de lubricante vaginal), la glándula de la célula Littre (secreción de moco), la célula endometrial del útero (secreción de carbohidratos), la célula caliciforme aislada de las vías respiratoria y digestiva (secreción de moco), la célula mucosa que reviste el estómago (secreción de moco), la célula zimógena de la glándula gástrica (secreción de pepsinógeno), la célula oxíntica de la glándula gástrica (secreción de ácido clorhídrico), la célula acinar pancreática (secreción de bicarbonato y enzimas digestivas), las células endocrinas pancreáticas, la célula pancreática del intestino delgado (secreción de lisozima), células epiteliales intestinales, neumocitos tipo I y II del pulmón (secreción de tensoactivo), y/o célula de Clara del pulmón.

También se puede recubrir la membrana con células secretoras de hormonas, tales como las células endocrinas del islote de Langerhans del páncreas, células pituitarias anteriores, somatotropos, lactotropos, tirotropos, gonadotropos, corticotropicos, la célula pituitaria intermedia, la secreción de la hormona estimulante de melanocitos; y las células magnocelulares neurosecretoras que secretan oxitocina o vasopresina; las células del tracto intestinal y respiratorio que secretan serotonina, endorfina, somatostatina, gastrina, secretina, colecistoquinina, insulina, glucagón, bombesina; células de la glándula tiroideas como la célula epitelial de la tiroideas, la célula parafolicular, células de la glándula paratiroides, la célula principal de la paratiroides, la célula oxífila, células de la glándula suprarrenal, células cromafines que segregan hormonas esteroides (mineralocorticoides y glucocorticoides), la célula Leydig de los testículos que segrega testosterona, la célula de teca interna del folículo ovárico que secreta estrógeno, la célula del cuerpo lúteo del folículo ovárico roto que secreta progesterona, células de luteína de la granulosa, células de luteína de teca, la célula yuxtglomerular (secreción de renina), la célula de mácula densa del riñón, la célula peripolar del riñón, y/o la célula mesangial del riñón.

Adicionalmente o alternativamente, se puede tratar por lo menos un lado de la membrana con metabolismo y células de almacenamiento como hepatocito (célula del hígado), la célula de grasa blanca, la célula de grasa marrón, el lipocito de hígado. También se pueden utilizar células de función de barrera (pulmón, intestino, glándulas exocrinas y tracto urogenital) o células renales como la célula parietal del glomérulo renal, el podocito del glomérulo renal, la célula del borde en cepillo tubular proximal del riñón, la célula de segmento delgado del asa de Henle, la célula tubular distal del riñón o la célula del conducto colector de riñón.

Otras células que se pueden utilizar en el dispositivo incluyen el neumocito tipo I (espacio de aire en el revestimiento del pulmón), la célula del conducto pancreático (célula centroacinar), la célula del conducto no estriado (de la glándula sudorípara, la glándula salival, la glándula mamaria, etcétera.), la célula principal, la célula intercalada, la célula del conducto (de la vesícula seminal, de la próstata, etcétera.), la célula del borde en cepillo intestinal (con microvellosidades), la célula del conducto estriado de la glándula exocrina, la célula epitelial de la vesícula biliar, la célula no cilial de conducto eferente, la célula principal del epidídimo, y/o célula basal del epidídimo.

También se pueden utilizar células epiteliales que revisten las cavidades internas cerradas del cuerpo, como las células fenestradas endoteliales vasculares linfáticas y de vasos sanguíneos, células continuas endoteliales vasculares linfáticas y de vasos sanguíneos, células esplénicas endoteliales vasculares linfáticas y de vasos sanguíneos, la célula sinovial (revestimiento de las cavidades articulares, en secreción de ácido hialurónico), la célula serosal (revestimiento de las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica), la célula escamosa (revestimiento del espacio perilinfático de recubrimiento del oído), la célula escamosa (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula columnar del saco endolinfático con microvellosidades (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula columnar del saco endolinfático sin microvellosidades (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula oscura (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula de la membrana vestibular (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula basal de la stria vascularis (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula marginal de la stria vascularis (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula de Claudius (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula de Boettcher (revestimiento del espacio endolinfático del oído), la célula del plexo coroideo (secreción del fluido cefalorraquídeo), la célula escamosa pia-aracnoidea, la célula epitelial cilial pigmentada del ojo, la célula epitelial cilial no pigmentada del ojo, y/o la célula endotelial de la córnea.

Las siguientes células pueden utilizarse en el dispositivo añadiéndolas a la superficie de la membrana en medio de cultivo. Estas células incluyen células como las células ciliadas con función propulsora, tal como la célula ciliada del tracto respiratorio, la célula ciliada del oviducto (en la mujer), la célula ciliada del endometrio uterino (en la mujer), la célula ciliada de la red testicular (en el hombre), la célula ciliada del conducto eferente (en el hombre), y/o la célula

5
 10
 15
 También se pueden colocar en la placa células que segregan MEC especializadas, tal como las células epiteliales de ameloblasto (secreción del esmalte dental), células epiteliales de planum semilunatum del aparato vestibular del oído (secreción de proteoglicanos), órgano de la célula epitelial interdental de Corti (secreción de membrana tectoria que cubre las células ciliadas), fibroblastos de tejido conectivo suelto, fibroblastos corneales (queratocitos corneales), fibroblastos de tendón, fibroblastos de tejido reticular de médula ósea, otros fibroblastos no epiteliales, pericito, la célula del núcleo pulposo del disco intervertebral, cementoblasto/cementocito (secreción de cemento parecido al hueso de la raíz del diente), odontoblasto/odontocito (secreción de dentina del diente), condrocito del cartílago hialino, condrocito del fibrocartílago, condrocito de cartílago elástico, osteoblasto/osteocito, la célula osteoprogenitora (célula madre de osteoblastos), hialocito del cuerpo vítreo del ojo, la célula estrellada del espacio perilinfático del oído, la célula estrellada hepática (célula Ito), y/o la célula estrellada pancreática.

Además o alternativamente, células contráctiles, tales como las células del músculo esquelético, células del músculo esquelético rojo (lento), células del músculo esquelético blanco (rápido), células del músculo esquelético intermedio, la célula de la bolsa nuclear del huso muscular, la célula de la cadena nuclear del huso muscular, la célula satélite (célula madre), células del músculo cardíaco, la célula del músculo cardíaco ordinario, la célula del músculo cardíaco nodal, la célula de la fibra de Purkinje, la célula del músculo liso (varios tipos), la célula mioepitelial del iris, la célula mioepitelial de las glándulas exocrinas se pueden utilizar en el dispositivo actual.

Las siguientes células también se pueden utilizar en el dispositivo actual: células de la sangre y del sistema inmunológico, como eritrocitos (glóbulo rojo), megacariocitos (precursor plaquetario), monocitos, macrófagos del tejido conectivo (varios tipos), la célula epidérmica de Langerhans, osteoclastos (en el hueso), la célula dendrítica (en los tejidos linfoides), la célula microgliales (en el sistema nervioso central), el granulocito de neutrófilo, el granulocito de eosinófilo, el granulocito de basófilo, el granulocito de basófilo, el mastocito, la célula T auxiliar, la célula T supresora, la célula T citotóxica, la célula T asesina natural, la célula B, la célula asesina natural, el reticulocito, células madre y progenitores comprometidos para la sangre y el sistema inmunológico (varios tipos). Se pueden utilizar estas células como tipos de células individuales o en mezclas para determinar los efectos de las células inmunitarias en el sistema de cultivo de tejidos.

También se pueden tratar las membranas con una o más células del sistema nervioso, células transductoras sensoriales como la célula ciliada interna auditiva del órgano de Corti, la célula ciliada externa auditiva del órgano de Corti, la célula basal del epitelio olfativo (célula madre de las neuronas olfativas), las neuronas sensoriales primarias sensibles al frío, las neuronas sensoriales primarias sensibles al calor, la célula de Merkel de la epidermis (sensor táctil), la neurona receptora olfativa, las neuronas sensoriales primarias sensibles al dolor (varios tipos); Células fotorreceptoras de la retina en el ojo, incluyendo las células de varilla fotorreceptoras, la célula cónica fotorreceptora sensible al azul del ojo, la célula cónica fotorreceptora sensible al verde del ojo, la célula cónica fotorreceptora sensible al rojo del ojo, las neuronas sensoriales primarias propioceptivas (varios tipos); las neuronas sensoriales primarias sensibles al tacto (varios tipos); la célula carotídea tipo I (sensor de pH de la sangre); la célula carotídea tipo II (sensor de pH de la sangre); la célula ciliada tipo I del aparato vestibular del oído (aceleración y gravedad); la célula ciliada tipo II del aparato vestibular del oído (aceleración y gravedad); y/o la célula de papila gustativa tipo I.

Se pueden utilizar células neurales autónomas como la célula neural colinérgica (varios tipos), la célula neural adrenérgica (varios tipos), la célula neural peptidérgica (varios tipos) en el dispositivo actual. Además, también se pueden utilizar células de soporte de órganos sensoriales y neuronas periféricas. Estos incluyen, por ejemplo, la célula de pilar interna del órgano de Corti, la célula de pilar externa del órgano de Corti, la célula de falange interna del órgano de Corti, la célula de falange externa del órgano de Corti, la célula fronteriza del órgano de Corti, la célula de Hensen del órgano de Corti, la célula de soporte del aparato vestibular, la célula de soporte de la papila gustativa tipo I, la célula de soporte del epitelio olfativo, la célula de Schwann, la célula satélite (encapsulando cuerpos de células nerviosas periféricas) y/o la célula glial entérica. En algunos modos de realización, también se pueden utilizar neuronas del sistema nervioso central y células gliales como el astrocito (varios tipos), células neurales (gran variedad de tipos, aún mal clasificadas), oligodendrocitos y la neurona fusiforme.

Las células de lente como la célula epitelial de lente anterior y la célula de fibra de lente que contiene el cristalino también se pueden utilizar en el dispositivo actual. Además, se pueden utilizar células pigmentarias como los melanocitos y las células epiteliales pigmentadas de la retina; y células germinales como el oogonio/ovocito, la espermatida, el espermatozoido, la célula espermatogonia (célula madre para el espermatozoido) y el espermatozoo.

En algunos modos de realización se puede añadir a la membrana células enfermeras de la célula folicular ovárica, la célula de Sertoli (en los testículos), la célula epitelial del timo. También se pueden utilizar células intersticiales, como las células renales intersticiales.

- 5 En un modo de realización, se puede recubrir al menos un lado de la membrana con células epiteliales. El epitelio es un tejido compuesto de células que recubren las cavidades y superficies de las estructuras de todo el cuerpo. Muchas glándulas también se forman a partir del tejido epitelial. Se encuentra en la parte superior del tejido conectivo, y las dos capas están separadas por una membrana basal. En los seres humanos, el epitelio se clasifica como tejido corporal primario, siendo los otros un tejido conectivo, un tejido muscular y un tejido nervioso. El epitelio se define a menudo por la expresión de la molécula de adhesión e-caderina (a diferencia de la n-caderina, que es utilizada por las neuronas y las células del tejido conectivo).
- 10 Las funciones de las células epiteliales incluyen la secreción, la absorción selectiva, la protección, el transporte transcelular y la detección de la sensación y, como resultado, suelen presentar una amplia polaridad apical-basolateral (por ejemplo, diferentes proteínas de membrana expresadas) y especialización. Ejemplos de células epiteliales incluyen las células escamosas que tienen la apariencia de placas delgadas y planas. Encajan estrechamente entre sí en los tejidos, proporcionando una superficie lisa y de baja fricción sobre la cual los fluidos pueden moverse fácilmente. La forma del núcleo suele corresponder a la forma celular y ayuda a identificar el tipo de epitelio. Las células escamosas tienden a tener núcleos elípticos horizontalmente aplanados debido a la forma delgada y aplanada de la célula. Clásicamente, los epitelios escamosos se encuentran en superficies de revestimiento que utilizan difusión pasiva simple como el epitelio alveolar en los pulmones. Los epitelios escamosos especializados también forman el revestimiento de cavidades como los vasos sanguíneos (endotelio) y el corazón (mesotelio) y las cavidades principales que se encuentran dentro del cuerpo.
- 15 Otro ejemplo de células epiteliales son las células cuboidales. Las células cuboidales tienen una forma aproximadamente cuboidal, apareciendo cuadradas en sección transversal. Cada célula tiene un núcleo esférico en el centro. El epitelio cuboidal se encuentra comúnmente en el tejido secretivo o absorbente: por ejemplo, la glándula exocrina (secretiva), el páncreas y el recubrimiento (absorbente) de los túbulos renales, así como en los conductos de las glándulas. También constituyen el epitelio germinal que produce los óvulos en el ovario femenino y los espermatozoides en los testículos masculinos.
- 20 Otro tipo más de células epiteliales son las células epiteliales columnares que son alargadas y en forma de columna. Sus núcleos son alargados y suelen estar situados cerca de la base de las células. El epitelio columnar forma el revestimiento del estómago y los intestinos. Algunas células columnares están especializadas en la recepción sensorial, como en la nariz, las orejas y las papilas gustativas de la lengua. Las células en cáliz (glándulas unicelulares) se encuentran entre las células epiteliales columnares del duodeno. Ellas secretan moco, que actúa como lubricante.
- 25 Otro ejemplo de las células epiteliales son las células pseudoestratificadas. Se trata de simples células epiteliales columnares cuyos núcleos aparecen a diferentes alturas, dando la falsa impresión (por lo tanto, "pseudo") de que el epitelio está estratificado cuando se observan las células en sección transversal. El epitelio pseudoestratificado también puede poseer extensiones como cabello finas de su membrana apical (luminal) llamadas cilios. En este caso, el epitelio se describe como epitelio pseudoestratificado "ciliado". Los cilios son capaces de realizar un latido pulsátil dependiente de la energía en una cierta dirección a través de la interacción de microtúbulos citoesqueléticos y la conexión de proteínas estructurales y enzimas. El efecto de inhalación producido hace que el moco secretado localmente por las células caliciformes (para lubricar y atrapar patógenos y partículas) fluya en esa dirección (típicamente fuera del cuerpo). El epitelio ciliado se encuentra en las vías respiratorias (nariz, bronquios), pero también se encuentra en el útero y las trompas de Falopio de las mujeres, donde los cilios impulsan el óvulo hacia el útero.
- 30 El epitelio reviste tanto el exterior (piel) como el interior de las cavidades y el lumen de los cuerpos. La capa más externa de nuestra piel está compuesta por células escamosas estratificadas, queratinizadas y epiteliales muertas.
- 35 Los tejidos que revisten el interior de la boca, el esófago y parte del recto están compuestos de epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Otras superficies que separan las cavidades corporales del ambiente exterior están recubiertas por simples células epiteliales escamosas, columnares o pseudoestratificadas. Otras células epiteliales recubren el interior de los pulmones, el tracto gastrointestinal, los tractos urinario y reproductivo, y forman las glándulas exocrinas y endocrinas. La superficie externa de la córnea está cubierta de células epiteliales de rápido crecimiento y fácil regeneración. El endotelio (el revestimiento interno de los vasos sanguíneos, el corazón y los vasos linfáticos) es una forma especializada de epitelio. Otro tipo, el mesotelio, forma las paredes del pericardio, pleuras y peritoneo.
- 40 Por consiguiente, se puede recrear cualquiera de estos tejidos en el dispositivo de cultivo celular, tal como se describe recubriendo los tipos de células aplicables en las membranas porosas y aplicando el vacío aplicable para proporcionar una fuerza mecánica fisiológica o artificial en las células que imite las fuerzas fisiológicas, como la tensión en la piel o la tensión mecánica en los pulmones. En un modo de realización, un lado de la membrana está recubierto con células epiteliales y el otro lado está recubierto con células endoteliales.
- 45 El endotelio es la capa delgada de células que revisten la superficie interior de los vasos sanguíneos, formando una interfaz entre la sangre circulante en el lumen y el resto de la pared del vaso. Las células endoteliales revisten todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta el capilar más pequeño. Estas células reducen la turbulencia del flujo sanguíneo permitiendo que el fluido sea bombeado más lejos. El tejido endotelial es un tipo especializado de tejido epitelial (uno de los cuatro tipos de tejido biológico en los animales). Más específicamente, es epitelio escamoso simple.
- 50
- 55

El modelo fundamental de anatomía hace una distinción entre las células endoteliales y las células epiteliales sobre la base de los tejidos a partir de los cuales se desarrollan y afirma que la presencia de filamentos de vimentina en lugar de queratina las separa de las células epiteliales. El endotelio de las superficies interiores de las cámaras del corazón se denomina endocardio. Tanto la sangre como los capilares linfáticos están compuestos de una sola capa de células endoteliales llamadas monocapa. Las células endoteliales están involucradas en muchos aspectos de la biología vascular, incluyendo: vasoconstricción y vasodilatación, y por lo tanto el control de la presión sanguínea; coagulación sanguínea (trombosis y fibrinólisis); aterosclerosis; formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis); inflamación y función de barrera, el endotelio actúa como una barrera selectiva entre el lumen del vaso y el tejido circundante, controlando el paso de materiales y el tránsito de glóbulos blancos dentro y fuera del torrente sanguíneo. El aumento excesivo o prolongado de la permeabilidad de la monocapa endotelial, como en los casos de inflamación crónica, puede provocar edema/hinchazón del tejido. En algunos órganos, hay células endoteliales altamente diferenciadas para realizar funciones especializadas de "filtrado". Ejemplos de estas estructuras endoteliales únicas incluyen el glomérulo renal y la barrera hematoencefálica.

En un modo de realización, el lado de la membrana que contiene células endoteliales cultivadas puede estar expuesto a varias sustancias de prueba y también a glóbulos blancos o células específicas del sistema inmunológico para estudiar los efectos de los agentes de prueba sobre la función de las células del sistema inmunológico a nivel tisular.

Los detalles sobre cómo se forma el dispositivo 200 de interfaz tisular se discutirán a continuación de acuerdo con un modo de realización. La fabricación de la membrana de PDMS implica de forma preferible el procesamiento en paralelo de múltiples partes que se ensamblan por etapas. La figura 4A ilustra una vista en perspectiva de una placa 600 de acuerdo con un modo de realización que se utiliza en última instancia para producir la membrana porosa 208. Tal y como se muestra en la figura 4A, la placa 600 es de forma preferible formada por un patrón de una fotorresistencia a la forma y tamaño deseado en un sustrato de silicio.

Debería señalarse que los postes 602 pueden ser diseñados en cualquier disposición deseada dependiendo del diseño previsto de la membrana 208. Por ejemplo, los postes 602 pueden ser dispuestos en un patrón circular para formar un conjunto de poros de patrón circular en la membrana 208. Debería señalarse que los postes 602 pueden tener cualquier otra forma de sección transversal que no sea pentagonal para hacer los poros correspondientes en la membrana, tal y como se discutió anteriormente. También debería señalarse que la placa 600 puede contener crestas de diferentes alturas para crear membranas no planas.

A continuación, tal y como se muestra en la figura 4B, la placa 600 está de forma preferible recubierta con PDMS para formar una capa 604 recubierta por centrifugado. A continuación, la capa 604 recubierta por centrifugado se endurece durante un tiempo y una temperatura determinados (por ejemplo, 110 °C en 15 minutos) y se despega de la placa 600 para obtener una fina membrana 604 PDMS con el conjunto de agujeros 606 pasantes pentagonales, tal y como se muestra en la figura 4C. El ejemplo mostrado muestra la fabricación de una membrana de PDMS de 10 µm de espesor, aunque se contemplan otros valores de espesor.

Aunque se pueden utilizar otros materiales, el PDMS tiene propiedades útiles en biología, ya que es un elastómero moderadamente rígido (1 MPa) que no es tóxico y es ópticamente transparente hasta 300nm. El PDMS es intrínsecamente muy hidrofóbico, pero puede convertirse en una forma hidrofílica mediante el tratamiento con plasma. La membrana 604 puede ser diseñada para una variedad de propósitos, algunos discutidos anteriormente. Por ejemplo, los poros 606 en la membrana 604 pueden ser recubiertos o llenados con moléculas de MEC o geles, como MATRIGEL, laminina, colágeno, fibronectina, fibrina, elastina, etcétera, los cuales son conocidos por los expertos en la técnica. La interfaz tejido-tejido puede recubrirse cultivando diferentes tipos de células a cada lado de la membrana 604, tal y como se muestra en la figura 4D. En particular, tal y como se muestra en la Figura 4D, un tipo de célula 608 está recubierta en un lado de la membrana 604 mientras que otro tipo de célula 610 está recubierta en el lado opuesto de la membrana 604.

Las figuras 5A y 5B ilustran el proceso de cómo la primera porción 202 de cuerpo exterior, una segunda porción 204 de cuerpo exterior se forman de acuerdo con un modo de realización. La primera y segunda porciones 202, 204 de cuerpo exteriores son de forma preferible formadas utilizando técnicas de litografía suave, aunque están contempladas otras técnicas bien conocidas en la técnica. En un modo de realización, un fotoprotector (no mostrado) está formado en un sustrato en el que el fotoprotector tiene características de relieve positivo que son especulares a la configuración de ramificación deseada en la primera porción de cuerpo exterior. Del mismo modo, un segundo fotoprotector (no mostrado) está formado en otro sustrato en el que el segundo fotoprotector tiene características de relieve positivas correspondientes que son especulares a la configuración de ramificación en la segunda porción 204 de cuerpo exterior. Los microcanales junto con los puertos de comunicación y las aberturas de puerto son generados de forma preferible mediante, de forma preferible, PDMS moldeado u otro material apropiado a cada placa. Una vez formadas la primera y segunda porciones 202, 204 de cuerpo exteriores, los agujeros pasantes que sirven como aberturas de puerto se realizan a través de la losa de PDMS de forma preferible utilizando un mecanismo de formación de aberturas o una estampa.

Tal y como se muestra en la figura 5C, la membrana 208 de PDMS ya formada se intercala entre la primera porción 202 de cuerpo exterior y la segunda porción 204 de cuerpo exterior, por lo que las paredes 234, 244 del microcanal, así como las paredes 238, 248 exteriores se alinean utilizando equipos y técnicas de fabricación adecuados. A

continuación, las paredes 234, 244 del microcanal y las paredes exteriores se adhieren de forma preferible a la membrana 208 utilizando un adhesivo adecuado o epoxi. Además, las porciones restantes de las porciones 202, 204 de cuerpo exteriores están permanentemente unidas entre sí utilizando un adhesivo apropiado o epoxi para formar el dispositivo completo.

5 Posteriormente, tal y como se muestra en la figura 5D, se introduce una solución de grabado de PDMS en los canales de servicio para grabar los segmentos de membrana de PDMS en los canales de servicio. Esto da como resultado que la generación de los dos canales 252 de servicio laterales están libres de la membrana, aunque la membrana se mantenga en el microcanal central, tal y como se muestra en la figura 5E. Lo anterior se forma de forma preferible utilizando técnicas de litografía suave, cuyos detalles se describen en "Litografía suave en biología y bioquímica", de Whitesides, y otros, revisión anual publicada, Ingeniería biomédica, 3.335-3.373 (2001), así como en "una membrana de PDMS ultra-delgada como una interfaz bio/micro-nano: Fabricación y caracterización", de Thangawng y otros, Microdispositivos biomédicos, vol. 9, núm. 4, 2007, pp. 587-95.

15 La figura 6 ilustra un esquema de un sistema que tiene múltiples dispositivos de interfaz tisular de acuerdo con un modo de realización. En particular, tal y como se muestra en la figura 6, el sistema 700 incluye una o más CPU 702 acopladas a una o más fuentes 704 de fluido y fuentes de presión (no se muestran), por lo que las anteriores están acopladas a tres dispositivos 706A, 706B y 706C de interfaz de tejido mostrados. Debería señalarse que aunque tres dispositivos 706 son mostrados en este modo de realización, se contemplan menos o más de tres dispositivos 706. En el sistema 700, dos de los tres dispositivos (706A y 706B) están conectados en paralelo con respecto a la fuente 704 de fluido y los dispositivos 706A y 706C están conectados en serie con respecto a la fuente 704 de fluido. Debería señalarse que la configuración mostrada es sólo un ejemplo y que se pueden utilizar otros tipos de patrones de conexión dependiendo de la aplicación.

25 En el ejemplo mostrado, el fluido de la fuente 704 de fluido se suministra directamente a las entradas de fluido de los dispositivos 706A y 706B. A medida que el fluido pasa a través del dispositivo 706A, es expulsado directamente al puerto de entrada de fluido de los dispositivos 706B y 706C. Además, la salida de fluido del dispositivo 706B se combina con la salida del dispositivo 706A en el dispositivo 706C. Con múltiples dispositivos funcionando, es posible monitorizar, usando datos de sensores, cómo se comportan las células en el fluido o membrana después de que el fluido ha pasado a través de otro ambiente controlado. De este modo, este sistema permite establecer múltiples "etapas" independientes, en las que el comportamiento celular de cada etapa puede monitorizarse en condiciones fisiológicas simuladas y controlarse mediante los dispositivos 706. Uno o más dispositivos conectados en serie pueden servir para estudiar la comunicación química entre células. Por ejemplo, un tipo de célula puede secretar la proteína A en respuesta a la exposición a un fluido en particular, por lo que el fluido, que contiene la proteína A secretada, sale de un dispositivo y luego se expone a otro tipo de célula específicamente diseñado en otro dispositivo, por lo que se puede monitorizar la interacción del fluido con la proteína A con las otras células del otro dispositivo (por ejemplo, señalización de paracrina). Para la configuración en paralelo, uno o más dispositivos conectados en paralelo pueden ser ventajosos para aumentar la eficiencia del análisis del comportamiento de la célula a través de múltiples dispositivos a la vez en lugar de analizar el comportamiento de la célula a través de dispositivos individuales por separado.

40 La figura 7A ilustra una vista en perspectiva de un dispositivo de imitación de órganos de acuerdo con un modo de realización que contiene tres microcanales paralelos separados por dos membranas porosas. Tal y como se muestra en la figura 7A, el dispositivo 800 de imitación de órganos incluye microcanales 802 de servicio y un microcanal 804 central general posicionado entre los microcanales 802 de servicio. El microcanal 804 central general incluye múltiples membranas 806A, 806B situadas a lo largo de los respectivos planos x-y paralelos que separan el microcanal 804 en tres microcanales 804A, 804B y 804C centrales distintos. Las membranas 806A y 806B pueden ser porosas, elásticas o una combinación las mismas. Se pueden aplicar medios presurizados positivos y/o negativos a través de los canales 802 de servicio para crear un diferencial de presión que haga que las membranas 806A, 806B se expandan y contraigan a lo largo de sus respectivos planos en paralelo.

50 La figura 7B ilustra una vista en perspectiva de un dispositivo de imitación de órganos de acuerdo con un modo de realización. Tal y como se muestra en la figura 7B, el dispositivo 900 de interfaz de tejido incluye los microcanales 902A, 902B de servicio y un microcanal 904 central posicionado entre los microcanales 902. El microcanal 904 central incluye múltiples membranas 906A, 906B situadas a lo largo de los respectivos planos x-y paralelos. Además, una pared 910 separa el microcanal central en dos microcanales centrales distintos, con secciones respectivas, por lo que la pared 910 junto con las membranas 904A y 904B definen los microcanales 904A, 904B, 904C y 904D. Las membranas 906A y 906B son al menos parcialmente porosas, elásticas o una combinación de las mismas.

55 El dispositivo de la figura 7B difiere del de la figura 7A en que los microcanales 902A y 902B de servicio están separados por una pared 908, por lo que las presiones separadas aplicadas a los microcanales 902A y 902B hacen que sus respectivas membranas 904A y 904B se expandan o contraigan. En particular, se puede aplicar una presión positiva y/o negativa a través de los microcanales 902A de servicio para hacer que la membrana 906A se expanda y contraiga a lo largo de su plano mientras que una presión positiva y/o negativa diferente se aplica a través de los microcanales 902B de servicio para hacer que la membrana 906B se expanda y contraiga a lo largo de su plano a una frecuencia y/o magnitud diferentes. Por supuesto, un conjunto de microcanales de servicio puede experimentar la presión mientras que el otro conjunto de microcanales no experimenta una presión, causando así que sólo una

membrana actúe. Debería señalarse que aunque se muestran dos membranas en los dispositivos 800 y 900, se contemplan más de dos membranas y pueden configurarse en los dispositivos.

En un ejemplo, mostrado en la figura 7C, el dispositivo que contiene tres canales descritos en la figura 7A tiene dos membranas 806A y 806B que están recubiertas para determinar el comportamiento celular de un tumor vascularizado. En particular, la membrana 806A está recubierta con un endotelio linfático en su superficie 805A superior y con células estromales en su superficie inferior, y las células estromales también están recubiertas en la superficie superior de la segunda membrana 805B porosa y un endotelio vascular en su superficie 805C inferior. Las células tumorales se colocan en el microcanal central rodeadas en la parte superior e inferior por capas de células estromales en las superficies de las membranas superior e inferior de la sección 804B. Los fluidos como el medio de cultivo celular o la sangre entran en el canal vascular en la sección 804C (falta la etiqueta 804C en el diagrama). El fluido, como el medio de cultivo celular o linfa, entra en el canal linfático en la sección 804A. Esta configuración del dispositivo 800 permite a los investigadores imitar y estudiar el crecimiento tumoral y la invasión de los vasos sanguíneos y linfáticos durante la metástasis del cáncer. En el ejemplo, una o más de las membranas 806A, 806B pueden expandirse/contraerse en respuesta a la presión a través de los microcanales de servicio. Adicionalmente o alternativamente, las membranas puede que no actúen, pero pueden ser porosas o tener surcos para permitir que las células pasen a través de las membranas.

Las capacidades únicas del dispositivo actual han sido monitoreadas en experimentos que abordan la toxicidad aguda y la translocación extrapulmonar de nanomateriales inducidos por fuerzas mecánicas fisiológicas. El dispositivo se ha utilizado para modelar la inflamación pulmonar en la que puede recrear con precisión y visualizar directamente la compleja interacción de los tejidos pulmonares con las citoquinas y las células inmunitarias transmitidas por la sangre que se transmigran a través de la barrera alveolar-capilar. Usando este modelo, el dispositivo revela respuestas inflamatorias significativas del pulmón imitado a los nanomateriales. Finalmente, el dispositivo se utiliza para simular la infección pulmonar con bacterias y su eliminación mediante el reclutamiento de neutrófilos y la fagocitosis.

El dispositivo se ha utilizado en experimentos que han llevado al descubrimiento de que las fuerzas mecánicas fisiológicas pueden inducir o exacerbar la toxicidad de los nanomateriales de ingeniería en el pulmón y pueden facilitar su translocación a la circulación sistémica. Además, se han desarrollado modelos in vitro que simulan la inflamación pulmonar y permiten la observación directa de la adhesión de las células inmunitarias circulantes transmitidas por la sangre a la endotelia inflamada y su trans migración a través de la barrera alveolar-capilar. Basándose en este modelo, se han revelado importantes actividades proinflamatorias de nanopartículas de ingeniería. Basándose en esta evidencia, se puede establecer un modelo de infección pulmonar y se puede recrear la respuesta inmune innata del pulmón a las bacterias mediadas por la infiltración de neutrófilos en los alvéolos y la fagocitosis bacteriana.

El presente dispositivo fue utilizado en varios experimentos, por lo que el dispositivo se utilizó para imitar el pulmón vivo. Las observaciones y hallazgos con el presente dispositivo se describen a continuación. Durante la inspiración normal de un pulmón real, la cavidad torácica se agranda debido a la contracción del diafragma y a la expansión de la caja torácica y, como resultado, disminuye la presión intrapleurales fuera de los alvéolos. El aumento de la diferencia de presión a través de la pared alveolar hace que los alvéolos se expandan y fuercen la entrada de aire en los pulmones, resultando en el estiramiento del epitelio alveolar y el endotelio en los capilares circundantes. Las células epiteliales alveolares son co-cultivadas con células endoteliales microvasculares pulmonares en una membrana porosa delgada para producir dos capas de tejido opuestas que imitan la interfaz entre el epitelio alveolar y el endotelio pulmonar. La configuración de microcanal compartimentado permite manipular fácilmente el entorno fluido del epitelio y del endotelio de forma independiente, y aplicar una tensión mecánica fisiológica.

En el experimento, el co-cultivo de células epiteliales alveolares y células endoteliales microvasculares pulmonares primarias de origen humano se desarrolló durante dos semanas sin pérdida de viabilidad. El cultivo microfluídico resultó en la producción de barreras alveolares-capilares apretadas con integridad estructural, como lo evidencian los típicos complejos de unión presentes tanto en las capas epiteliales como en las endoteliales. El dispositivo microfluídico se integró con un vacío controlado por ordenador para permitir el estiramiento cíclico de la membrana/célula a diferentes frecuencias y niveles de tensión de forma programable. Se observó que el vacío aplicado generaba una tensión unidireccional que es uniforme a través de todo el microcanal central. Al mismo tiempo, se descubrió que esta tensión era percibida por las células adherentes y hacía que se estiraran y aumentaran su superficie proyectada. También se confirmó la aplicación efectiva de la tensión mecánica a las células al mostrar la alineación inducida por el estiramiento y las respuestas transitorias de calcio de las células endoteliales.

Basándose en las capacidades únicas que ofrece la producción en chip de tejidos pulmonares y la recapitulación fiel de su microambiente nativo, el dispositivo se utilizó para evaluar los efectos adversos potenciales de los nanomateriales. A pesar del uso generalizado de nanomateriales de ingeniería, aún queda mucho por aprender sobre sus riesgos para la salud y el medio ambiente. Los métodos toxicológicos existentes se basan en una simplificación excesiva en los modelos in vitro o en ensayos prolongados y costosos en animales que a menudo plantean desafíos a los estudios mecanicistas a nivel celular. Para salvar la distancia entre los estudios de cultivo celular y los modelos animales, el dispositivo se utilizó para permitir una evaluación más realista y precisa de la toxicidad de los nanomateriales en un microambiente biomimético estrictamente controlado.

En el experimento, los tejidos epiteliales alveolares preparados en el dispositivo fueron expuestos a varios nanomateriales y se examinó el estrés oxidativo midiendo la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante microfluorimetría. Mediante la prueba de nanopartículas de sílice coloidal y puntos cuánticos, se descubrió que la tensión mecánica fisiológica puede aumentar drásticamente el estrés oxidativo generado por las nanopartículas e inducir respuestas tóxicas tempranas en el epitelio pulmonar. Por ejemplo, cuando las células fueron expuestas a nanopartículas de sílice de 12nm en combinación con una tensión cíclica del 10% de deformación a 0,2Hz que simula una respiración normal, la producción de ROS aumentó más de cinco veces después de dos horas, mientras que las nanopartículas o la tensión mecánica por sí solas no causaron ninguna respuesta medible durante la duración de los experimentos (véase la figura 8). La respuesta de las células tratadas con puntos cuánticos carboxilados mostró tendencias similares (véase la figura 9). Se observó que se lograron niveles similares de aumento del ROS después de 24 horas de exposición a nanopartículas de sílice solas, tal y como se muestra en la figura 9.

También se encontró que la tensión cíclica por sí sola no tuvo ningún impacto significativo independientemente de su duración, tal y como se muestra en la figura 9. En conjunto, estas observaciones sugieren que las fuerzas fisiológicas actúan en sinergia con las nanopartículas para ejercer efectos tóxicos tempranos o agravar la toxicidad de las nanopartículas en el pulmón. Esta respuesta de ROS inducida por estiramiento a los nanomateriales dependía del nivel de tensión y de la apoptosis inducida de las células epiteliales detectada por la actividad de la caspasa. Cuando se trató con un limpiador de radicales libres clínicamente utilizado, la N-acetilcisteína (NAC) durante la exposición a nanopartículas, las células fueron completamente rescatadas del estrés oxidativo, presumiblemente debido a la actividad antioxidante de la NAC, lo que condujo a un aumento del glutatión intracelular. También se observó que el estrés oxidativo generado por el efecto combinado de los nanomateriales y la tensión variaba significativamente según el tipo de nanomateriales. Por ejemplo, las exposiciones a nanopartículas de hierro superparamagnéticas de 50 nm en las mismas condiciones sólo dieron lugar a un aumento transitorio del estrés oxidativo. Esta respuesta única de ROS no fue observada en las pruebas de otros nanomateriales, incluyendo nanotubos de carbono de pared simple, nanopartículas de oro, nanopartículas de poliestireno y puntos cuánticos recubiertos con polietilenglicol, tal y como se muestra a continuación en la tabla 1.

Tabla 1

Nanomateriales	Recubrimiento superficial	Tamaño	Respuesta de ROS (tensión 0%)	Respuesta de ROS (tensión 10%)
Nanopartículas de poliestireno	Grupos carboxilo	500nm	No	No
	Grupos carboxilo	200nm	No	No
	Grupos amino	200nm	No	No
	Grupos carboxilo	100nm	No	No
	Grupos carboxilo	20nm	No	No
Puntos cuánticos	Grupos carboxilo	16nm	No	Si
	polietilenglicol	13nm	No	No
Nanopartículas de Silicio	N/A	12nm	No	Si
Nanopartículas de Hierro magnético	Grupos carboxilo	50nm	No	Si
Nanopartículas de oro	N/A	3nm	No	No

Para entender la influencia de las fuerzas fisiológicas en las interacciones tejido-nanomateriales, se utilizó la microscopía confocal para analizar la internalización de nanopartículas fluorescentes de 100 nm en las células epiteliales después de 1 hora de exposición. Sin embargo, el número de partículas o sus agregados detectados en los compartimentos intracelulares fue mucho mayor en presencia de una tensión mecánica, y se descubrió que más del 80% de las células habían absorbido las nanopartículas, mientras que el grado de absorción de las nanopartículas fue

considerablemente menor en ausencia de tensión. Estos resultados indican que las fuerzas mecánicas fisiológicas pueden facilitar la absorción celular de los nanomateriales, permitiéndoles interactuar con los componentes subcelulares y haciéndolos potencialmente más dañinos.

5 Además, el dispositivo ofrece la oportunidad de investigar la translocación extrapulmonar de nanomateriales desde el espacio alveolar a la microvasculatura. El aumento de la evidencia in vivo sugiere que los nanomateriales en los alvéolos tienen la capacidad de cruzar la barrera alveolar-capilar y entrar en la circulación pulmonar, impactando potencialmente en otros órganos. Para investigar esta situación, se introdujeron nanopartículas fluorescentes de 20 nm en el lado epitelial y se monitorizó la translocación de nanopartículas contando el número de partículas transportadas fuera del canal vascular inferior por el flujo continuo de fluido. Este modelo reveló un marcado aumento en la tasa de migración de nanopartículas hacia el compartimento vascular bajo condiciones fisiológicas con un 10% de tensión cíclica, en comparación con el transporte a través de una barrera tisular relajada y estática. Estos hallazgos proporcionan una evidencia in vitro de que la actividad mecánica inherente del pulmón vivo puede permitir que los nanomateriales se transloquen del espacio alveolar al torrente sanguíneo. Los datos del experimento también apoyan la distribución y acumulación sistemática de nanomateriales inhalados observados en estudios en animales y pueden contribuir potencialmente a delinear el mecanismo de este proceso, así como a proporcionar un sistema modelo sustituto para estudiar esta respuesta.

20 Para demostrar aún más la capacidad del dispositivo para reconstituir las respuestas integradas a nivel de órgano en el pulmón, se desarrolló un modelo más sofisticado que incorporó células inmunitarias circulantes transmitidas por la sangre y reprodujo los pasos clave de la inflamación pulmonar. Generalmente, las respuestas inflamatorias en el pulmón implican una cascada de múltiples pasos altamente coordinada de producción epitelial y liberación de citoquinas de respuesta temprana, activación del endotelio vascular a través de la regulación de las moléculas de adhesión de los leucocitos y la subsiguiente infiltración de los leucocitos desde la microcirculación pulmonar hacia el espacio alveolar. Para simular este proceso, la superficie apical del epitelio alveolar fue primero estimulada con el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que es un potente mediador pro-inflamatorio, y la activación endotelial fue examinada midiendo la expresión de la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1). En respuesta a la estimulación del TNF- α del tejido alveolar durante 5 horas, células endoteliales del lado opuesto de la membrana aumentaron dramáticamente su expresión superficial de ICAM-1. Además, el endotelio activado apoyó la captura y adhesión firme de neutrófilos humanos que fluyen en el microcanal vascular, los cuales no se adhirieron en ausencia de exposición a citoquinas. El tratamiento de las células epiteliales con dosis bajas de TNF- α resultó en una activación débil del endotelio, lo que causó que los neutrófilos capturados rodaran continuamente en la dirección del flujo sin ser detenidos. La visualización microscópica directa reveló que los neutrófilos adherentes se aplanaron y arrastraron desde un sitio de adhesión firme a lugares distantes donde se extravasaron a través del endotelio y se transmigraron a través de la barrera alveolar-capilar a través de los poros de la membrana durante el período de varios minutos. Los neutrófilos transmigrados luego emigraron a la superficie apical del epitelio alveolar de forma preferible a través de uniones paracelulares y fueron retenidos en la capa epitelial a pesar del flujo de fluido y el estiramiento cíclico. Estos eventos secuenciales replican con éxito todo el proceso de reclutamiento de neutrófilos desde la microvasculatura hasta el compartimento alveolar, que es un sello distintivo de la inflamación pulmonar.

40 Usando el dispositivo, se investigaron los efectos proinflamatorios de las nanopartículas de sílice coloidal en el pulmón. Sobre las células epiteliales alveolares expuestas a nanopartículas de sílice de 12nm durante 5 horas, el endotelio microvascular se activó y exhibió altos niveles de expresión ICAM-1. Se observó que la aplicación de una tensión cíclica del 10% junto con las nanopartículas aumentaba sinérgicamente la expresión endotelial de ICAM-1. Se observó que los neutrófilos humanos que circulan en el canal vascular se adhirieron firmemente al endotelio inflamado, se transmigraron a través de la barrera tisular y se acumularon en la superficie epitelial. Estas observaciones evidencian actividades proinflamatorias significativas de estas nanopartículas de sílice, que pueden hacerse más pronunciadas debido a fuerzas fisiológicas que provocan inflamación aguda en el pulmón.

50 En un experimento, el presente dispositivo fue configurado para imitar la respuesta inmune innata a la infección pulmonar de origen bacteriano. Para imitar el pulmón afectado por la infección bacteriana, células epiteliales alveolares fueron estimuladas apicalmente con *Escherichia coli* (*E.coli*) expresando constitutivamente proteína fluorescente verde (GFP) durante 5 horas. Cuando posteriormente se permitió que los neutrófilos humanos fluyeran en el microcanal vascular, se unieron a las células endoteliales y se sometieron a diapédesis a través de las capas de tejido, lo que indica que la estimulación bacteriana del epitelio dio lugar a la activación endotelial. Al llegar a la superficie epitelial, los neutrófilos mostraron un movimiento direccional hacia las bacterias marcadas con GFP y las envolvieron como se ilustra en la detección de bacterias fagocitadas con neutrófilos en movimiento marcados con fluorescencia. También se observó que los neutrófilos son capaces de ingerir más de una bacteria en períodos cortos de tiempo y que su actividad fagocítica continuó hasta que la mayoría de las bacterias fueron eliminadas del área de observación. Estos resultados demuestran claramente la capacidad de este modelo para recrear el proceso completo de la respuesta inmune integrada a la infección microbiana dentro de un contexto de órgano fisiológico 3D in vitro.

60 Aunque los modos de realización y las aplicaciones han sido mostrados y descritos, sería evidente para los expertos en la técnica que tienen el beneficio de esta divulgación que son posible más modificaciones que las mencionadas anteriormente sin apartarse de los conceptos inventivos divulgados en el presente documento.

Se incluyen los siguientes párrafos en orden alfabético para mejorar la comprensión de la divulgación:

[A] Un dispositivo organomimético que comprende:

un cuerpo que tiene un microcanal central en el mismo; y

5 una membrana al menos parcialmente porosa situada dentro del microcanal central y a lo largo de un plano, la membrana configurada para separar el microcanal central para formar un primer microcanal central y un segundo microcanal central, en donde se aplica un primer fluido a través del primer microcanal central y un segundo fluido a través del segundo microcanal central, la membrana recubierta de al menos una molécula de unión que soporta la adhesión de una pluralidad de células vivas.

[B] El dispositivo de [A] en el que la membrana porosa es al menos parcialmente flexible, comprendiendo el dispositivo además:

10 una primera pared de cámara del cuerpo situada junto al primer y segundo microcanales centrales, en donde la membrana se monta en la primera pared de cámara; y

15 un primer canal de servicio adyacente al primer y segundo microcanales centrales en un lado opuesto de la primera pared de cámara, donde un diferencial de presión aplicado entre el primer canal de servicio y los microcanales centrales hace que la primera pared de cámara flexione en una primera dirección deseada para expandirse o contraerse a lo largo del plano dentro del primero y segundo microcanales centrales.

[C] El dispositivo de [A] o [B] que comprende además:

una segunda pared de cámara del cuerpo situada adyacente al primer y segundo microcanales centrales, en donde un extremo opuesto de la membrana se monta en la segunda pared de cámara; y

20 un segundo canal de servicio situado adyacente al microcanal central en un lado opuesto de la segunda pared de cámara, en donde el diferencial de presión entre el segundo canal de servicio y los microcanales centrales hace que la segunda pared de cámara flexione en una segunda dirección deseada para expandirse o contraerse a lo largo del plano dentro del primer y segundos microcanales centrales.

[D] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde al menos una abertura de poro en la membrana está comprendida entre 0,5 y 20 micrones a lo largo de una dimensión de anchura.

25 [E] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana además comprende una primera membrana y una segunda membrana colocada dentro del microcanal central, en donde la segunda membrana está orientada paralela a la primera membrana para formar un tercer microcanal central entre las mismas.

[F] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana comprende PDMS,

30 [G] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana está recubierta con una o más capas de células, en donde se aplican una o más capas de células a una superficie de la membrana.

[H] El dispositivo de uno o todos los párrafos anteriores, en donde uno o ambos lados de la membrana están recubiertos con una o más capas de células, en donde una o más capas de células comprenden células seleccionadas del grupo formado por células metazoicas, mamíferas y humanas.

35 [I] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde las células son seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales, endoteliales, mesenquimales, musculares, inmunes, neurales y hemapoyéticas.

[J] El dispositivo de uno o todos los párrafos anteriores, en donde un lado de la membrana está recubierto de células epiteliales y el otro lado de la membrana está recubierto de células endoteliales.

[K] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el cuerpo del dispositivo y la membrana están hechos de un material biocompatible o biodegradable.

40 [L] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el dispositivo se implanta a un organismo vivo.

[M] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el organismo vivo es un ser humano.

[N] El dispositivo de uno o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana está recubierta con una o más capas de células in vitro.

45 [O] El dispositivo de uno o todos los párrafos anteriores, en donde al menos una membrana está recubierta con una o más capas de células in vivo.

[P] El dispositivo de uno o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana está recubierta con un agente biocompatible que facilita la adhesión de al menos una capa celular en la membrana.

- [Q] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el agente biocompatible es una matriz extracelular que comprende colágeno, fibronectina y/o laminina.
- [R] El dispositivo de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el material biocompatible es seleccionado del grupo que consiste en colágeno, laminina, proteoglicano, vitronectina, fibronectina, poli-D-lisina y polisacárido.
- 5 [S] El dispositivo de uno o todos los párrafos anteriores, en donde el primer fluido contiene glóbulos blancos.
- [T] Un método que comprende:
- seleccionar un dispositivo organomimético que tenga un cuerpo, que incluye una membrana al menos parcialmente porosa colocada a lo largo de un plano dentro de un microcanal central para dividir el microcanal central en un primer microcanal central y un segundo microcanal central, la membrana recubierta de al menos una molécula de adhesión que soporte la adhesión de una pluralidad de células vivas;
- 10 aplicar un primer fluido a través del primer microcanal central;
- aplicar un segundo fluido a través del segundo microcanal central; y
- monitorizar el comportamiento de las células con respecto a la membrana entre el primer y segundo microcanales centrales.
- 15 [U] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana es al menos parcialmente elástica y el cuerpo incluye al menos un canal de servicio situado adyacente al primero y segundos microcanales centrales, comprendiendo el método además:
- ajustar un diferencial de presión entre los microcanales centrales y al menos uno de los canales de servicio, en el que la membrana se estira a lo largo del plano en respuesta a la diferencia de presión.
- 20 [V] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el ajuste de la diferencia de presión además comprende:
- aumentar el diferencial de presión de manera que uno o más lados de la membrana se muevan en las direcciones deseadas a lo largo del plano; y
- 25 disminuir el diferencial de presión de manera que uno o más lados de la membrana se muevan en dirección opuesta a lo largo del plano.
- [W] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde al menos una abertura de poro en la membrana está comprendida entre 0,5 y 20 micrones a lo largo de una dimensión de anchura.
- [X] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores que comprende además el tratamiento de la membrana con una o más capas de células, en donde se aplican una o más capas de células a una superficie de la membrana.
- 30 [Y] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, que consiste en aplicar una o más capas de células a uno o ambos lados de la membrana, en donde una o más capas de células comprenden células seleccionadas del grupo formado por células metazoicas, mamíferas y humanas.
- [Z] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde se seleccionan las células del grupo formado por células epiteliales, endoteliales, mesenquimales, musculares, inmunitarias, neurales y hemapoyéticas.
- 35 [AA] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde un lado de la membrana está recubierto con células epiteliales y el otro lado de la membrana está recubierto con células endoteliales.
- [BB] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el cuerpo del dispositivo y la membrana están hechos de un material biocompatible o biodegradable.
- 40 [CC] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el dispositivo se implanta además a un organismo vivo.
- [DD] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el organismo vivo es un ser humano.
- [EE] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana está recubierta con una o más capas de células in vitro.
- 45 [FF] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde por lo menos una membrana es cubierta con la una o más capas de célula in vivo.
- [GG] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la membrana está recubierta con un agente biocompatible que facilita la adhesión de al menos una capa celular en la membrana.

- [HH] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el agente biocompatible es una matriz extracelular compuesta de colágeno, fibronectina y/o laminina.
- [II] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde se selecciona el material biocompatible del grupo formado por colágeno, laminina, proteoglicano, vitronectina, fibronectina, poli-D-lisina y polisacárido.
- 5 [JJ] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el primer fluido contiene glóbulos blancos.
- [KK] Un método para determinar el efecto de al menos un agente en un sistema de tejidos con fuerza mecánica fisiológica o patológica, el método que comprende:
- 10 seleccionar un dispositivo que tenga un cuerpo, el cuerpo que incluye una membrana al menos parcialmente porosa situada a lo largo de un plano dentro de un microcanal central para dividir el microcanal central en un primer microcanal central y un segundo microcanal central;
- hacer contactar la membrana con al menos una capa de células en un primer lado de la membrana y al menos una capa de células en un segundo lado de la membrana porosa, formando así una estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células;
- 15 hacer contactar la estructura tisular formada por al menos dos tipos diferentes de células con al menos un agente en un medio de cultivo celular aplicable;
- aplicar fuerza uniforme o no uniforme sobre las celdas durante un período de tiempo; y
- medir la respuesta de las células de la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células para determinar el efecto de al menos un agente sobre las células.
- 20 [LL] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el medio de cultivo celular aplicable se complementa con glóbulos blancos.
- [MM] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde se aplica la fuerza uniforme o no uniforme utilizando vacío.
- [NN] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células comprende células epiteliales alveolares en el primer lado de la membrana porosa y células microvasculares pulmonares en el segundo lado de la membrana porosa.
- 25 [OO] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde el agente se selecciona del grupo de las nanopartículas, toxinas o contaminantes ambientales, humo de cigarrillo, productos químicos o partículas utilizadas en productos cosméticos, fármacos o candidatos de fármacos, aerosoles, partículas naturales, incluido el polen, armas químicas, ácidos nucleicos de una o dos cadenas, virus, bacterias y organismos unicelulares.
- 30 [PP] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la medición de la respuesta se realiza midiendo la expresión de las especies reactivas de oxígeno.
- [QQ] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la medición de la respuesta se realiza mediante tinción de tejido.
- 35 [RR] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores que comprende además, antes de medir el efecto del agente, la toma de una biopsia de la membrana que comprende la estructura del tejido que comprende al menos dos tipos diferentes de células, en la que se tiñe la biopsia.
- [SS] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, en donde la medición de la respuesta se realiza a partir de una muestra del medio de cultivo celular en contacto, en donde la medición de la respuesta se realiza a partir de una muestra del medio de cultivo celular en contacto con el primero, el segundo o ambos lados de la estructura tisular que forma la membrana que comprende al menos dos tipos diferentes de células con el primero, el segundo o ambos lados de la membrana que comprenden una estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células.
- 40 [TT] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores que además comprende comparar el efecto del agente con otro agente o un control sin el agente en un sistema de dispositivo paralelo similar.
- [UU] El método de cualquiera o todos los párrafos anteriores, que incluye además una etapa de contacto de la membrana con al menos dos agentes, en donde el primer agente se hace contactar en primer lugar para causar un efecto en la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células y el segundo agente al menos se hace contactar después de un período de tiempo para probar el efecto del segundo agente en la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células afectadas por el primer agente.
- 45 [VV] Un dispositivo organomimético que comprende:
- 50 un cuerpo que tiene un microcanal central; y

una pluralidad de membranas situadas a lo largo de planos paralelos en el microcanal central, donde al menos una de la pluralidad de membranas es al menos parcialmente porosa, la pluralidad de membranas configuradas para dividir el microcanal central en una pluralidad de microcanales centrales.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo organomimético que comprende:

un cuerpo que tiene un microcanal (250) central en el mismo; y

5 una membrana (208) al menos parcialmente porosa y al menos parcialmente flexible situada dentro del microcanal central y a lo largo de un plano, la membrana configurada para separar el microcanal central para formar un primer microcanal (250A) central y un segundo microcanal (250B) central, en donde se aplica un primer fluido a través del primer microcanal central y se aplica un segundo fluido a través del segundo microcanal central, la membrana recubierta de al menos una molécula de unión que soporta la adhesión de una pluralidad de células vivas, y

10 un primer canal (252) de servicio separado del primer y segundo microcanales centrales mediante una primera pared (234, 244) de microcanal, en donde la membrana está montada en la primera pared de microcanal, y cuando se aplica una presión al primer canal de servicio, se provoca que la membrana flexione en una primera dirección deseada para expandirse o contraerse a lo largo de un plano dentro del primer y segundo microcanales centrales.

2. El dispositivo de la reivindicación 1 que además comprende:

15 un segundo canal (252) de servicio separado del primer y segundo microcanales centrales mediante una segunda pared (234, 244) de microcanal, en donde un extremo opuesto de la membrana está montado en la segunda pared de microcanal, y cuando se aplica una presión al segundo canal de servicio, se provoca que la membrana flexione en una segunda dirección deseada para expandirse o contraerse a lo largo del plano dentro del primer y segundo microcanales centrales.

3. El dispositivo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que además comprende:

20 una primera membrana (806A; 906A) y una segunda membrana (806B; 906B) situada dentro del microcanal central, en donde la segunda membrana está orientada paralela a la primera membrana hasta formar un tercer microcanal central entre las mismas; o

25 una pluralidad de membranas (806A, 806B; 906A, 906B) situada a lo largo de planos paralelos en el microcanal central, en donde al menos una de la pluralidad de membranas es al menos parcialmente porosa, la pluralidad de membranas configurada para dividir el microcanal central en una pluralidad de microcanales centrales.

4. Un método que comprende:

30 proporcionar un dispositivo organomimético que tiene un cuerpo, el cuerpo que incluye una membrana (208) al menos parcialmente porosa y al menos parcialmente elástica situada a lo largo de un plano dentro de un microcanal central para dividir el microcanal central en un primer microcanal (250A) central y un segundo microcanal (250B) central, la membrana recubierta con al menos una molécula de unión que soporta la adhesión de una pluralidad de células vivas, y al menos un canal (252) de servicio separado del primer y segundo microcanales centrales mediante una pared (234, 244) de microcanal, en donde la membrana es montada en la pared de microcanal;

aplicar un primer fluido, opcionalmente que comprende glóbulos blancos, a través del primer microcanal central;

aplicar un segundo fluido a través de un segundo microcanal central;

35 aplicar una presión al al menos un canal de servicio para hacer que la membrana flexione en una dirección deseada para expandirse o contraerse a lo largo del plano dentro del primer y el segundo microcanales; y

monitorizar el comportamiento de las células con respecto a la membrana entre el primer y el segundo microcanales centrales.

5. El método de la reivindicación 4,

40 en donde aplicar una presión además comprende:

aumentar la presión de manera que uno o más lados de la membrana se muevan en las direcciones deseadas a lo largo del plano; y

disminuir la presión de manera que uno o más lados de la membrana se muevan en una dirección opuesta a lo largo del plano.

45 6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde al menos una abertura de poro de la membrana está entre 0,5 y 20 micrones a lo largo de una dimensión de anchura y/o en donde la membrana está recubierta con una o más capas de células, en donde la una o más capas de células están aplicadas a una superficie de la membrana.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en donde la membrana está recubierta con una o más capas de células, en donde la una o más capas de células son aplicadas a una superficie de la membrana y/o al menos una

- abertura de poro de la membrana está entre 0,5 y 20 micrones a lo largo de una dimensión de anchura y/o en donde uno o ambos lados de la membrana son tratados con una o más capas de células (608, 610), en donde la una o más capas de células comprenden células seleccionadas del grupo que consiste en, células metazoicas, mamíferas y humanas; preferiblemente, en donde las células son seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales, endoteliales, mesenquimales, musculares, inmunes, neurales y hemapoyéticas; o en donde un lado de la membrana es tratado con células epiteliales y el otro lado de la membrana es tratado con células endoteliales.
- 5
8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6, en donde uno o ambos lados de la membrana son tratados con una o más capas (608, 610) de células, en donde la una o más capas de células comprenden células seleccionadas del grupo que consiste en, células metazoicas, mamíferas y humanas; preferiblemente, en donde las células son seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales, endoteliales, mesenquimales, musculares, inmunes, neurales y hemapoyéticas; o en donde un lado de la membrana es tratado con células epiteliales y el otro lado de la membrana es tratado con células endoteliales.
- 10
9. El dispositivo de la reivindicación 8, en donde el cuerpo del dispositivo y la membrana están hechos de un material biocompatible o biodegradable; y/o en donde la membrana está recubierta con una gente biocompatible que facilita la adhesión de al menos una capa de célula en la membrana.
- 15
10. El dispositivo de la reivindicación 9, en donde el agente biocompatible es una matriz extracelular compuesta de colágeno, fibronectina y/o laminina; o en donde el material biocompatible es seleccionado del grupo que consiste en colágeno, laminina, proteoglicano, vitronectina, fibronectina, poli-D-lisina y polisacárido.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 7, que además comprende:
- 20
- hacer contactar la membrana con al menos una capa (de células 608) en un primer lado de la membrana y al menos una capa de células (610) en un segundo lado de la membrana, formando por tanto una estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células;
- hacer contactar la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células con al menos un agente en un medio de cultivo celular aplicable; y
- 25
- medir la respuesta de las células de la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células para determinar el efecto de al menos un agente sobre las células;
- de forma preferible en donde el medio de cultivo de células aplicable es suplementado con glóbulos blancos; y/o
- en donde el agente es seleccionado del grupo que consiste en nanopartículas, toxinas o contaminantes ambientales, humo de cigarrillo, productos químicos o partículas utilizadas en productos cosméticos, fármacos o candidatos de fármacos, aerosoles, partículas naturales, incluido el polen, armas químicas, ácidos nucleicos de una o dos cadenas, virus, bacterias y organismos unicelulares.
- 30
12. El método de la reivindicación 11, en donde la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células comprende células epiteliales alveolares en el primer lado de la membrana porosa y células microvasculares pulmonares en el segundo lado de la membrana porosa.
- 35
13. El método de la reivindicación 11 o de la reivindicación 12, en donde la medida de la respuesta realizada midiendo la expresión de especie reactivas de oxígeno, o utilizando una tinción de tejido; o en donde la medida de la respuesta es realizada a partir de una muestra del medio de cultivo de células en contacto con el primer o segundo o ambos lados de la membrana que comprende una estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células.
- 40
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que además comprende antes de medir el efecto del agente, tomar una biopsia de la membrana que comprende una estructura tisular que comprende al menos dos tipos de células diferentes, en donde la biopsia es teñida.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que además comprende:
- comparar el efecto del agente con otro agente o un control sin el agente en un sistema de dispositivo paralelo similar;
- o
- 45
- una etapa de hacer contactar la membrana con al menos dos agentes, en donde el primer agente se hace contactar primero para provocar un efecto en la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células y el al menos un segundo agente se hace contactar después de un período de tiempo para probar el efecto del segundo agente en la estructura tisular que comprende al menos dos tipos diferentes de células afectadas con el primer agente.

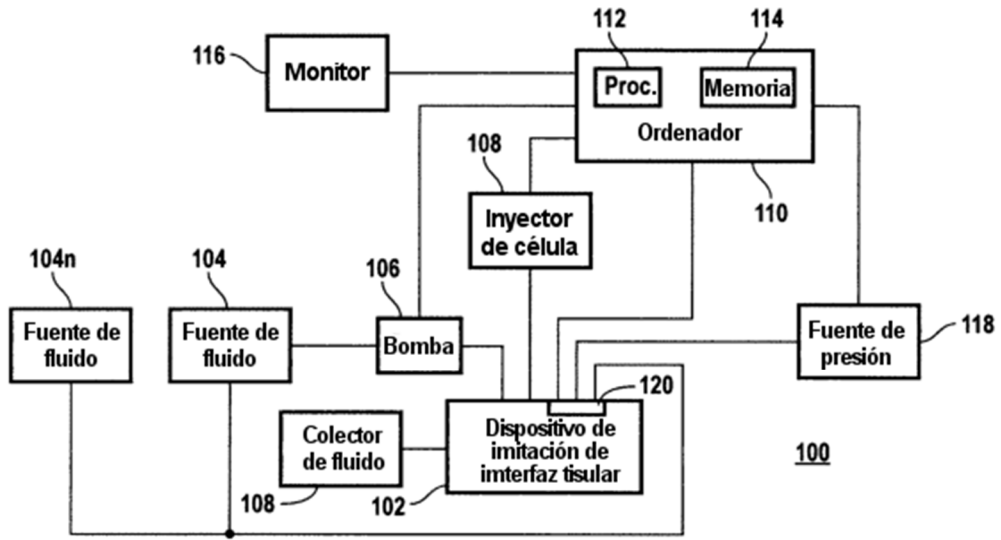


FIG. 1

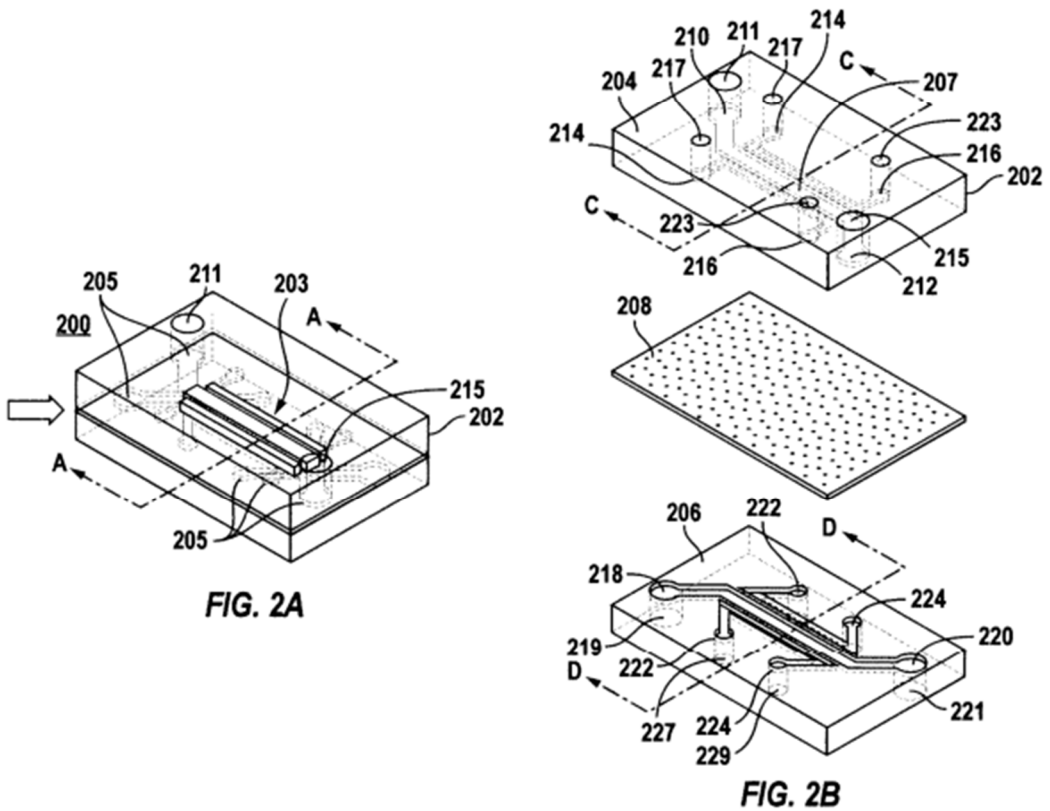


FIG. 2A

FIG. 2B

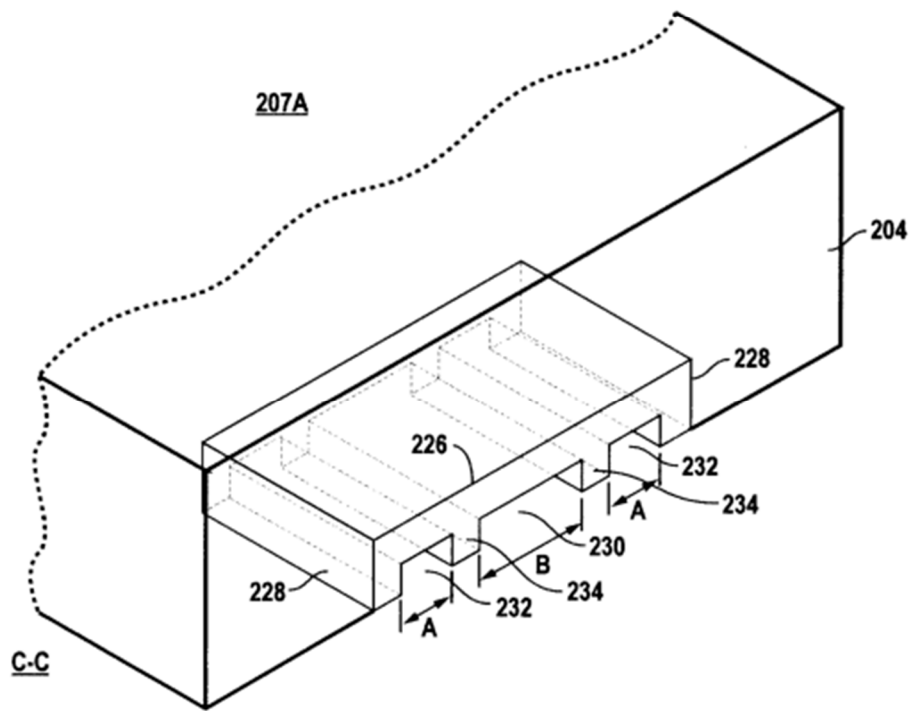


FIG. 2C

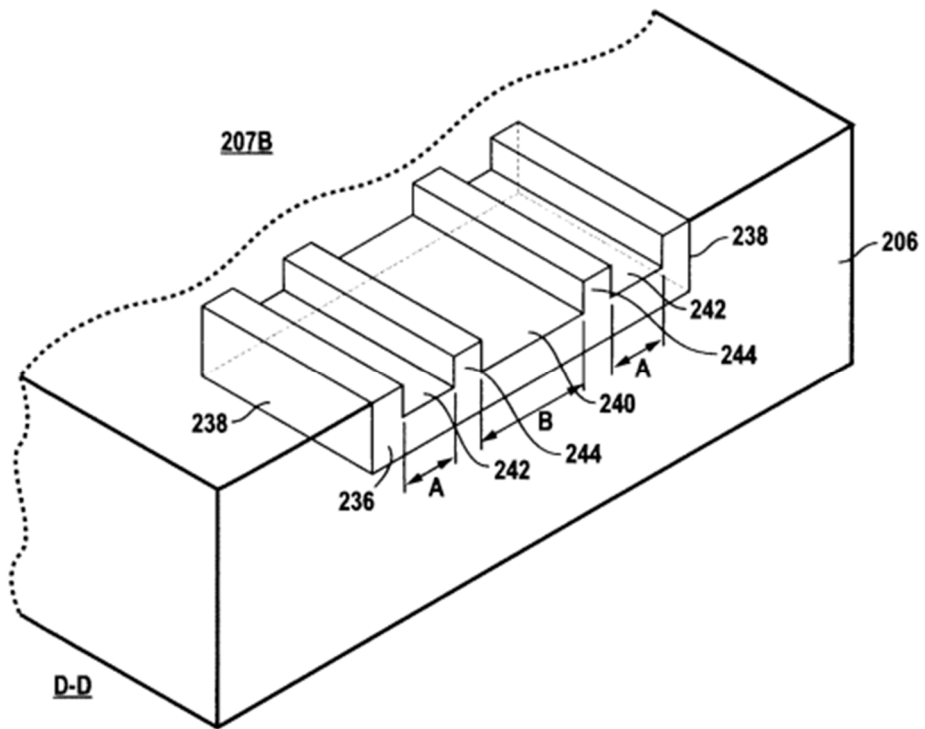


FIG. 2D

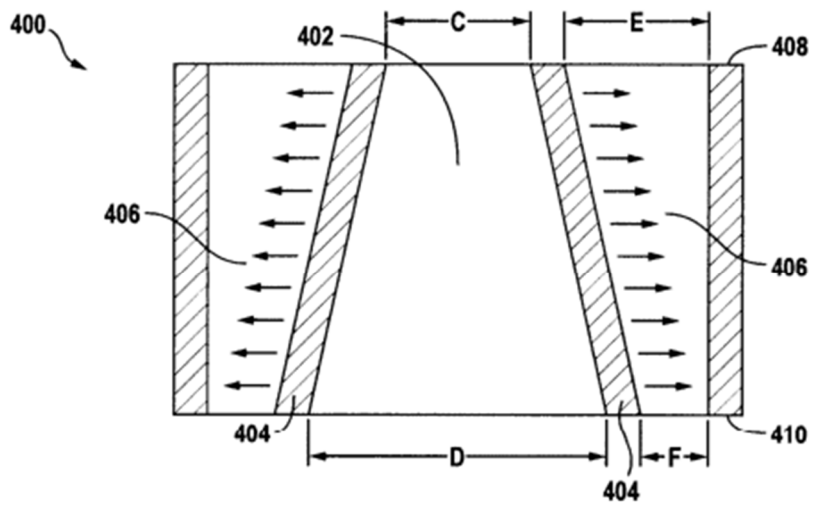


FIG. 2E

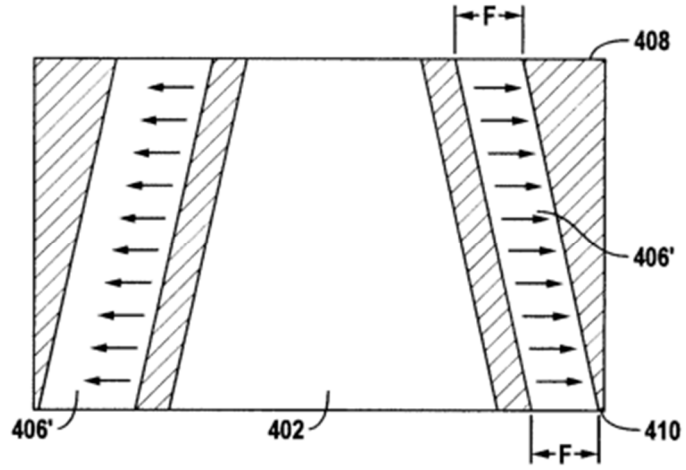


FIG. 2F

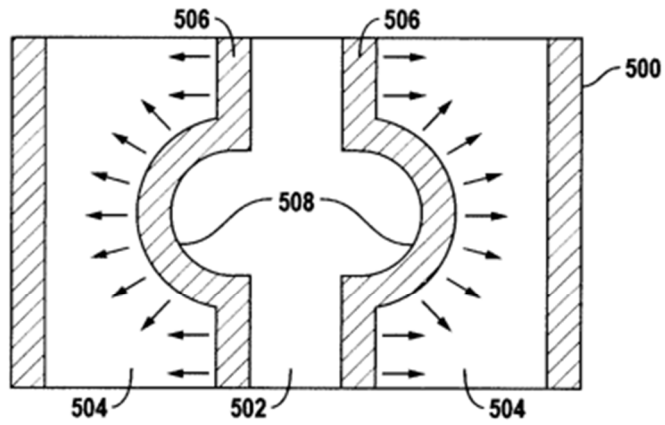


FIG. 2G

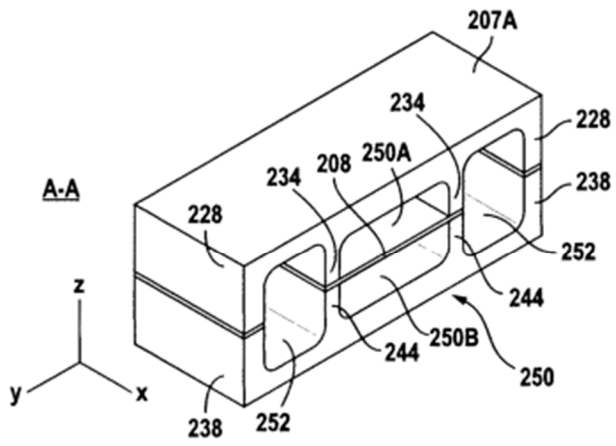


FIG. 3A

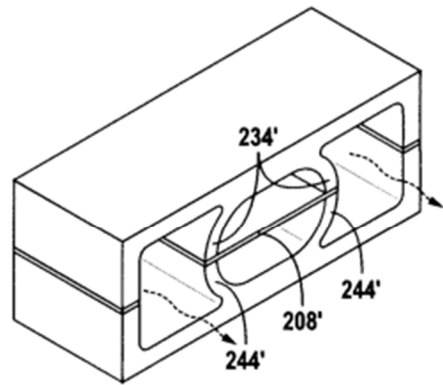


FIG. 3B

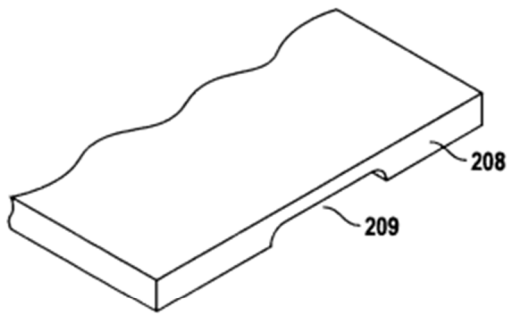


FIG. 3C

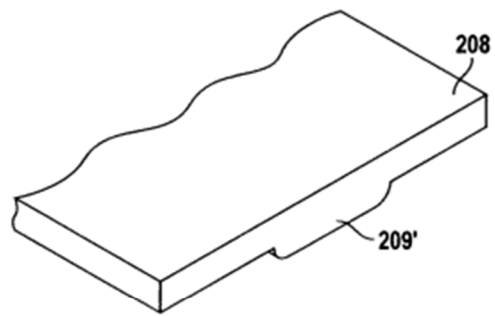


FIG. 3D

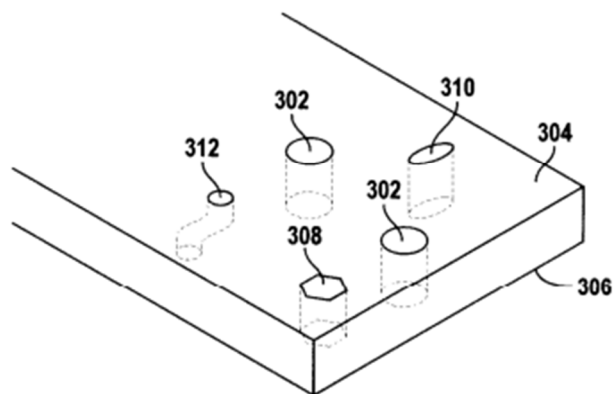


FIG. 3E

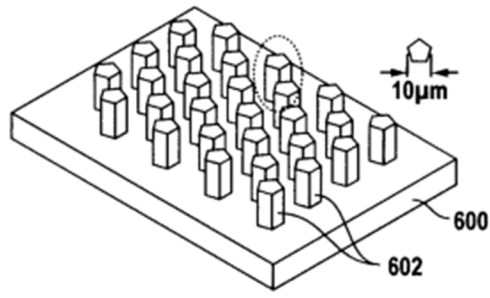


FIG. 4A

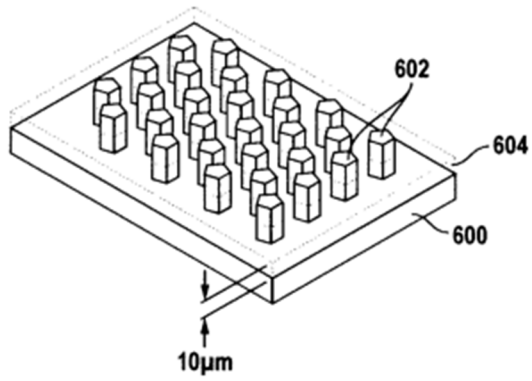


FIG. 4B

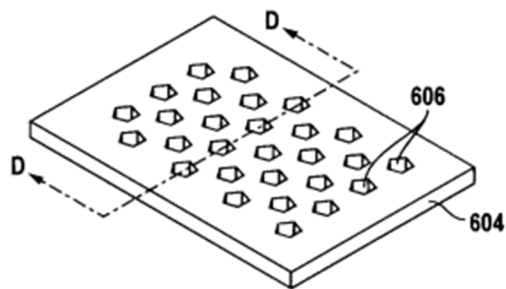


FIG. 4C

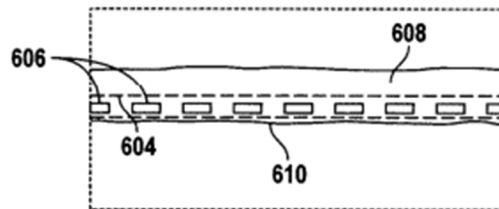


FIG. 4D

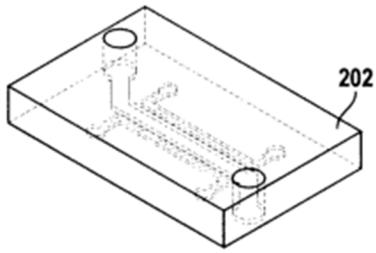


FIG. 5A

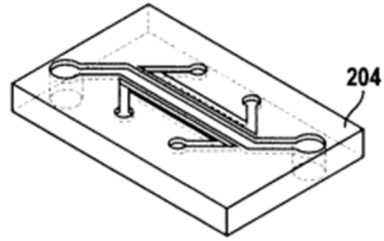


FIG. 5B

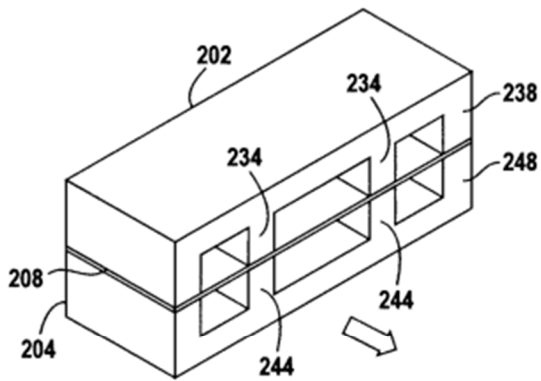


FIG. 5C

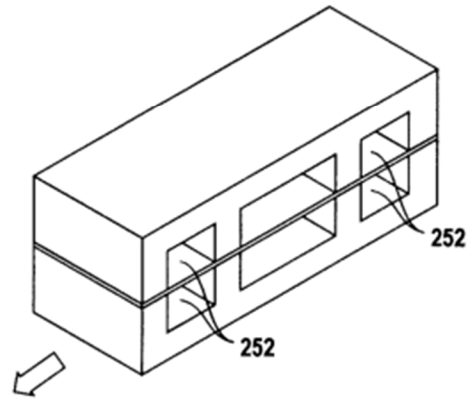


FIG. 5D

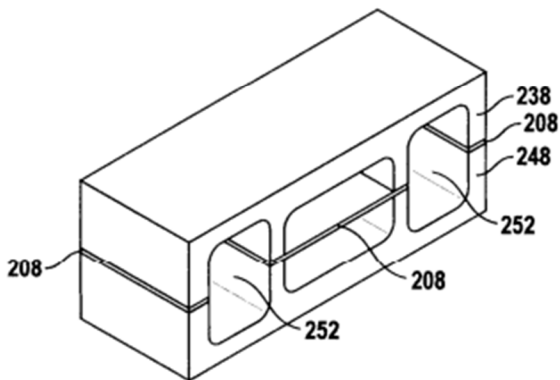


FIG. 5E

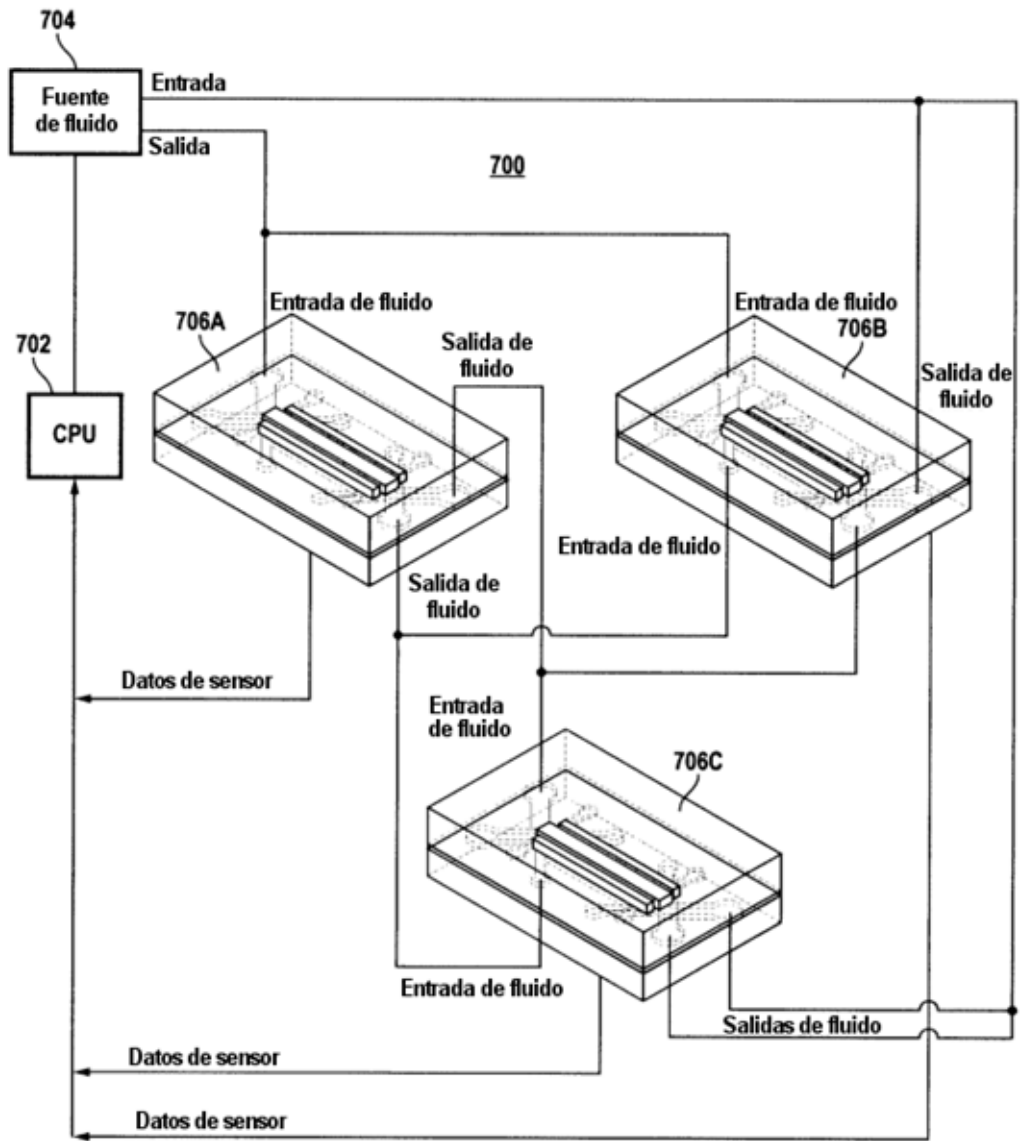


FIG. 6

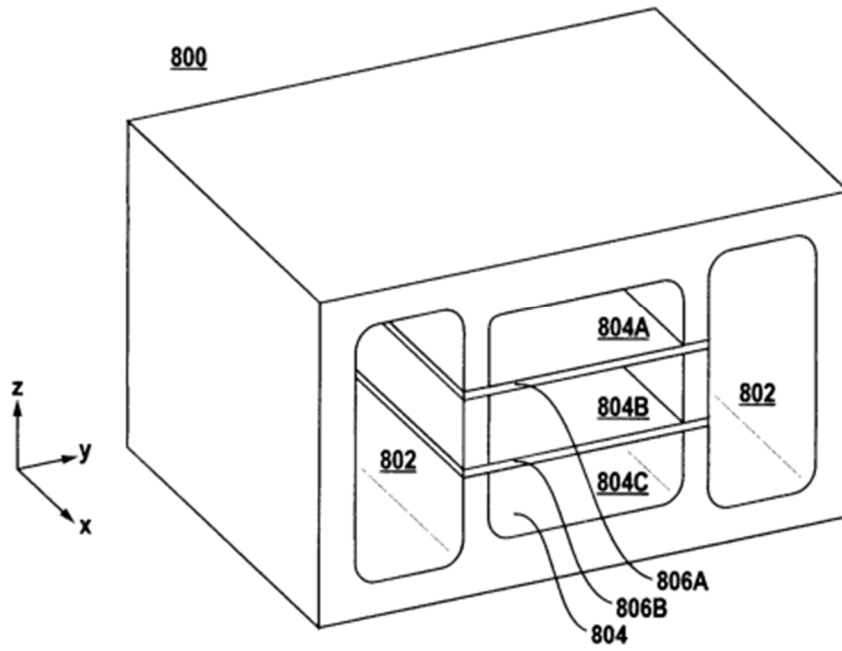


FIG. 7A

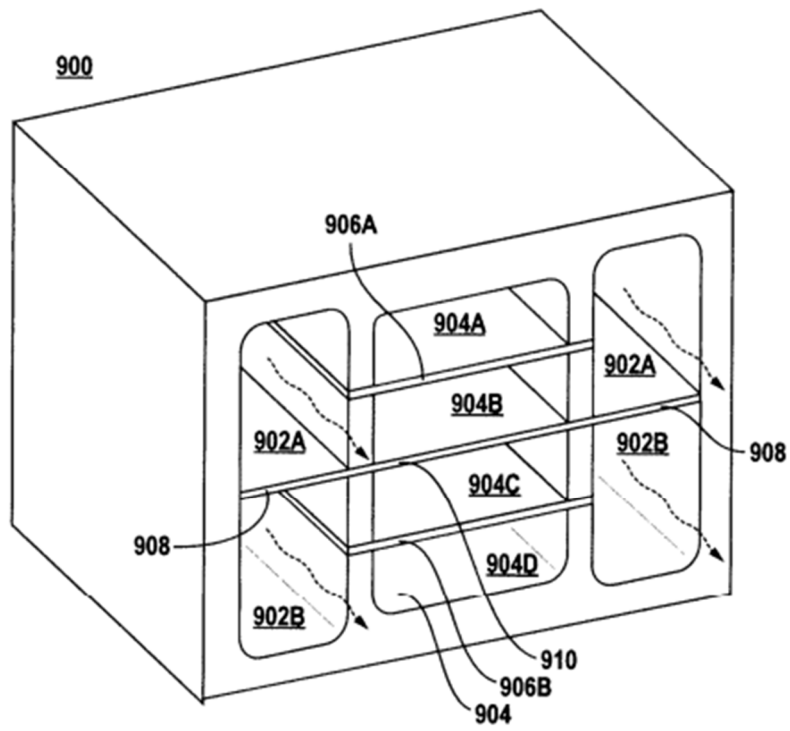


FIG. 7B

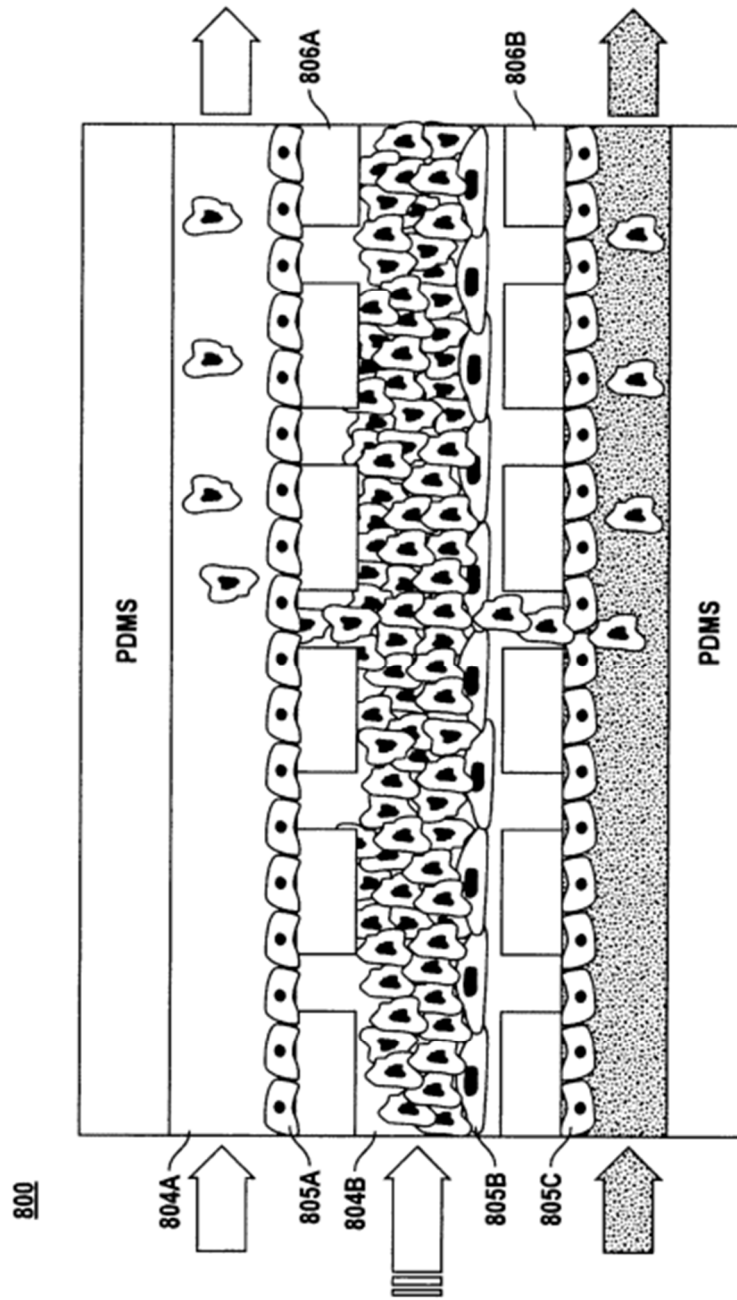


FIG. 7C

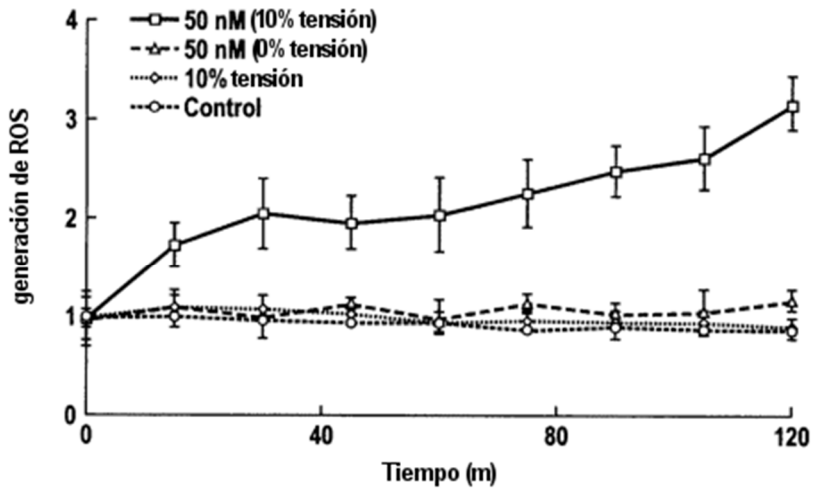


FIG. 8

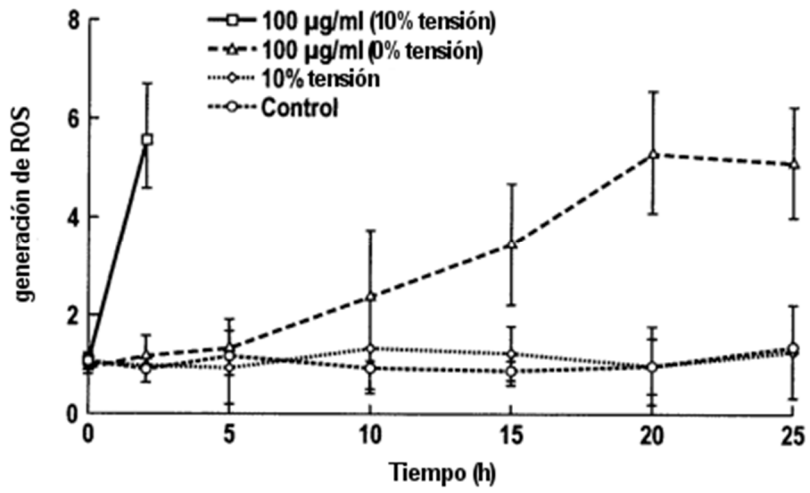


FIG. 9