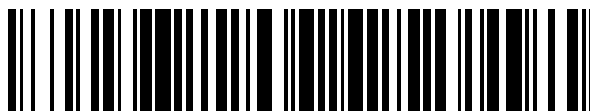


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 914**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6874** (2008.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**C12Q 1/18** (2006.01)

**C12Q 1/6806** (2008.01)

**C12Q 1/6841** (2008.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015 PCT/SE2015/050685**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16007068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 15818165 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3167044**

54 Título: **Dispositivo microfluídico**

30 Prioridad:

**07.07.2014 SE 1450860**

**27.02.2015 WO PCT/SE2015/050227**

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

**26.05.2020**

73 Titular/es:

**ASTREGO DIAGNOSTICS AB (100.0%)**

**Vallvägen 4 B**

**756 51 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**ELF, JOHAN;**

**BALTEKIN, ÖZDEN y**

**ANDERSSON, DAN I.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 762 914 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico

## 5 CAMPO TÉCNICO

Las presentes realizaciones generalmente se refieren a dispositivos microfluídicos y, en particular, a tales dispositivos microfluídicos configurados para cultivar y monitorear células.

## 10 ANTECEDENTES

El desarrollo reciente en biología de células individuales ha dejado en claro que las células isogénicas pueden mostrar grandes diferencias en la expresión y el comportamiento de genes también cuando crecen en condiciones idénticas. Por lo tanto, se necesitan nuevos dispositivos para caracterizar las diferencias de célula a célula en los fenotipos a lo largo del tiempo. Dichos dispositivos deben cumplir ciertos criterios para ser una herramienta efectiva en el cultivo y monitoreo de células individuales. Por ejemplo, estos dispositivos deberían ser fáciles de cargar con células para que uno pueda monitorear las características fenotípicas inmediatamente después de la carga. Además, muchas células individuales diferentes necesitan crecer en paralelo para caracterizar las diferencias de célula a célula. Los dispositivos deben estar diseñados para permitir el cultivo de células durante un largo período de tiempo bajo condiciones de crecimiento constantes y bien controladas para controlar, por ejemplo, la dinámica dependiente del linaje. Se prefiere además si los dispositivos permiten el cambio de las condiciones de cultivo para controlar los cambios dinámicos en respuesta a nuevos medios de cultivo o agentes de prueba. Por ejemplo, podría ser ventajoso probar diferentes medios de cultivo en células isogénicas en paralelo o monitorear la respuesta a los cambios de los medios en diferentes cepas celulares en paralelo.

Una aplicación deseada de dispositivos microfluídicos es monitorear rápida y paralelamente la respuesta fenotípica de una muestra bacteriana a un conjunto de antibióticos u otros agentes de prueba inmediatamente después de que las células bacterianas se hayan cargado en el dispositivo microfluídico. En tal aplicación, sería ventajoso poder cargar directamente el dispositivo microfluídico con, por ejemplo, muestras de orina con bacterias o bacterias mezcladas con células sanguíneas para ganar velocidad en el análisis.

Otra aplicación deseada, que se puede combinar con la prueba de susceptibilidad a los antibióticos (AST), sería probar la variabilidad genética en una muestra de células al monitorear primero las características fenotípicas y a continuación determinar las características genotípicas.

Un dispositivo microfluídico de la técnica anterior, denominado "Máquina madre", se describe en Wang y col., *Current Biology* 2010, 20: 1099-1103. La Máquina madre permite monitorear células en muchos canales celulares diferentes en paralelo. Sin embargo, este dispositivo microfluídico de la técnica anterior tiene varias deficiencias. Por ejemplo, la carga celular es complicada y resulta difícil cambiar rápidamente las condiciones de cultivo en el dispositivo microfluídico.

El documento WO 2013/115725 describe un dispositivo microfluídico pasivo libre de flujo contrario para clasificar una muestra de células flageladas. El dispositivo incluye un depósito de entrada configurado para recibir la muestra de células flageladas, un depósito de salida situado aguas abajo del depósito de entrada y configurado para recoger las células flageladas que se clasifican. Una pluralidad de secciones de microcanales están dispuestas secuencialmente y en comunicación fluida entre ellas entre los depósitos de entrada y salida. El volumen total de los microcanales en las secciones de microcanales disminuye en la dirección aguas abajo desde el depósito de entrada hacia el depósito de salida.

Long Z. y col. (2013) puede considerarse como el estado de la técnica más cercano. Como se muestra en la Fig. 1, el microquimiostato representado en esa invención se asemeja a una escalera. Dicho dispositivo microfluídico abarca 600 canales estrechos y poco profundos en un dispositivo PDMS para atrapar las células de *E. coli*. Estos canales de captura/crecimiento (peldaños) tienen aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de largo, de 0,6 a 0,9  $\mu\text{m}$  de ancho y 1,1  $\mu\text{m}$  de profundidad.

Los peldaños están conectados a un par de canales de alimentación de 50  $\mu\text{m}$  de ancho y aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de profundidad. El flujo de medios en los canales de alimentación proporciona continuamente nutrientes frescos a las células bacterianas dentro de los peldaños y elimina el exceso de células.

Por lo tanto, existe la necesidad de un dispositivo microfluídico mejorado que supere algunas o todas las deficiencias

de los dispositivos microfluídicos de la técnica anterior.

**RESUMEN**

5 Un objetivo de las realizaciones es proporcionar un dispositivo microfluídico mejorado.

Este y otros objetivos se cumplen mediante realizaciones como se describe en esta invención.

10 Un aspecto de las realizaciones se refiere a un dispositivo microfluídico que comprende un sustrato transparente para la formación de imágenes y que presenta una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente que presentan una dimensión para alojar células en monocapa. Un primer extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo que presenta un primer extremo en conexión fluida con un primer puerto de fluido y un segundo extremo en conexión fluida con un segundo puerto de fluido. Un segundo extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente está en conexión fluida con un primer extremo de un primer canal de lavado respectivo que presenta un segundo extremo en conexión fluida con un canal de salida de flujo. El canal de salida de flujo está en conexión fluida con un tercer puerto de fluido. Los primeros canales de lavado tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar las células.

20 Otro aspecto de las realizaciones se refiere a un procedimiento para cargar un dispositivo microfluídico según lo anterior. El procedimiento comprende introducir células y medio de cultivo en uno de un primer puerto de fluido y un segundo puerto de fluido del dispositivo microfluídico para permitir que las células y el medio de cultivo fluyan a través de un canal de entrada de flujo del dispositivo microfluídico y en una pluralidad de dispositivos definidos espacialmente y canales celulares separados. Un primer extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente está en conexión fluida con el canal de entrada de flujo que presenta un primer extremo en conexión fluida con el primer puerto de fluido y un segundo extremo en conexión fluida con el segundo puerto de fluido. El procedimiento también comprende la salida de células excesivas a través del otro del primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido y la salida del medio de cultivo a través del otro del primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido y a través de un tercer puerto en conexión fluida con un canal de salida de flujo. Un segundo extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente está en conexión fluida con un primer extremo de un primer canal de lavado respectivo que presenta un segundo extremo en conexión fluida con el canal de salida de flujo. Los primeros canales de lavado tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar las células.

35 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para pruebas de susceptibilidad a antibióticos. El procedimiento comprende cargar células bacterianas en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente de un dispositivo microfluídico según lo anterior. El procedimiento también comprende exponer células bacterianas en diferentes canales celulares separados y definidos espacialmente de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente a diferentes antibióticos y/o diferentes concentraciones de un antibiótico. El procedimiento comprende además determinar la susceptibilidad a los antibióticos de las células bacterianas en función de una característica fenotípica respectiva, preferentemente al menos uno de una tasa de crecimiento respectiva, un grado respectivo de compactación nucleoide, un grado respectivo de actividad metabólica y un grado respectivo de integridad de la membrana, de las células bacterianas en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente.

45 Incluso otro aspecto de las realizaciones se refiere a un procedimiento para células de genotipado *in situ*. El procedimiento comprende cargar células en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente de un dispositivo microfluídico según lo anterior. El procedimiento también comprende la fijación de las células en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente y genotipar las células *in situ* en la pluralidad de los canales celulares separados y definidos espacialmente.

50 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para la caracterización fenotípica de células. El procedimiento comprende cargar células en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente de un dispositivo microfluídico según lo anterior. El procedimiento también comprende hacer crecer las células en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente y monitorear en tiempo real una característica fenotípica de las células en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente.

60 El dispositivo microfluídico de las realizaciones es fácil de cargar con células y permite cultivar células en condiciones constantes o variables. El dispositivo microfluídico permite cambios rápidos de condiciones de cultivo o aplicación de productos químicos, reactivos u otros agentes.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención, junto con otros objetivos y ventajas de la misma, puede comprenderse de la mejor manera al referirse a la siguiente descripción, tomándola en conjunto con los dibujos adjuntos, donde:

- 5 la Fig. 1 es una ilustración de un dispositivo microfluídico según una realización;
- la Fig. 2 es una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico mostrado en la Fig. 1 a lo largo de la línea AA;
- 10 la Fig. 3 es una ilustración de un dispositivo microfluídico según otra realización.
- la Fig. 4 es una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico mostrado en la Fig. 3 a lo largo de la línea AA;
- 15 la Fig. 5 es una ilustración de un dispositivo microfluídico según una realización adicional;
- la Fig. 6 es una ilustración de un dispositivo microfluídico según incluso otra realización;
- la Fig. 7 es una ilustración de la carga y el funcionamiento del dispositivo microfluídico mostrado en la Fig. 6;
- 20 la Fig. 8 ilustra esquemáticamente una ampliación de la célula y los canales de referencia en un dispositivo microfluídico;
- la Fig. 9 ilustra esquemáticamente un aumento de canales celulares con identificadores de canal en un dispositivo
- 25 microfluídico;
- la Fig. 10 es una ilustración de un dispositivo microfluídico según una realización adicional;
- la Fig. 11 ilustra esquemáticamente un aumento de la porción en la caja A del dispositivo microfluídico mostrado en la
- 30 Fig. 10;
- la Fig. 12 ilustra esquemáticamente un aumento de la porción en la caja B del dispositivo microfluídico mostrado en la Fig. 11;
- 35 la Fig. 13 es una imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) de un molde para moldear un dispositivo microfluídico según una realización;
- la Fig. 14 ilustra imágenes de contraste de fase de células de *Escherichia coli* que crecen en un dispositivo microfluídico según una realización;
- 40 la Fig. 15 ilustra imágenes de contraste de fase de cepas de *E. coli* sensibles al cloranfenicol (MIC≈4 µg/ml) resistente al cloranfenicol (MIC > 12 µg/ml) que crecen en un dispositivo microfluídico según una realización;
- la Fig. 16 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de carga de un dispositivo microfluídico según una
- 45 realización;
- la Fig. 17 muestra la respuesta de la tasa de crecimiento promedio de una cepa de *E. coli* resistente a la eritromicina y dos cepas de *E. coli* susceptibles a la eritromicina, cuando se exponen a 120 µg/ml de eritromicina en el tiempo = 0 min; y
- 50 la Fig. 18 muestra la respuesta de la tasa de crecimiento promedio para una cepa de *E. coli* resistente a la ciprofloxacina cuando se expone a (1) ningún fármaco (marcada como "x"), (2) eritromicina (120 µg/ml, marcada con diamantes) o (3) ciprofloxacina (10 µg/ml, marcada con círculos) en el tiempo = 0 min.

## 55 DESCRIPCIÓN DETALLADA

En todos los dibujos se usan los mismos números de referencia para elementos similares o correspondientes.

Las presentes realizaciones generalmente se refieren a dispositivos microfluídicos y, en particular, a tales dispositivos

60 microfluídicos configurados para cultivar y monitorear células.

El dispositivo microfluídico de las realizaciones facilita el cultivo celular a largo plazo en condiciones constantes o

variables. El dispositivo microfluidico se carga fácilmente con células y permite cambios rápidos de condiciones de crecimiento y adición o intercambio de agentes biológicos o químicos.

El dispositivo microfluidico de las realizaciones se puede usar para cultivo de células individuales y experimentos. En tales aplicaciones, las células individuales se mantienen separadas de otras células en una muestra de entrada. Por ejemplo, el dispositivo microfluidico puede usarse para mantener y cultivar células de una cepa celular respectiva en una biblioteca de múltiples cepas celulares por separado de las células de otras cepas celulares. Por lo tanto, cada cepa celular tiene entonces un canal celular separado y separado espacialmente en el dispositivo microfluidico donde las células pueden crecer y estudiarse.

10

Un aspecto de las realizaciones se refiere a un dispositivo microfluidico, también denominado dispositivo de cultivo. El dispositivo microfluidico comprende un sustrato transparente para la formación de imágenes y que presenta una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente que presentan una dimensión para alojar células en monocapa. Un primer extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo, también denominado canal de flujo. El canal de entrada de flujo tiene un primer extremo en conexión fluida con un primer puerto de fluido, también denominado fuente de fluido, y un segundo extremo en conexión fluida con un segundo puerto de fluido, también denominado desagüe de fluido. Un segundo extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados definidos espacialmente está en conexión fluida con un primer extremo de un primer canal de lavado respectivo que presenta un segundo extremo en conexión fluida con un canal de salida de flujo, también denominado canal de desagüe. El canal de salida de flujo está en conexión fluida con un tercer puerto de fluido, también denominado desagüe de lavado. Los primeros canales de lavado tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar las células.

15

20

Ahora se describirán adicionalmente diversas realizaciones de implementación del dispositivo microfluidico con referencia a los dibujos.

25

En una realización, el dispositivo microfluidico 1, véase la Fig. 1, comprende un sustrato 10 transparente para la formación de imágenes y que presenta una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente 20. Los canales celulares 20 tienen una dimensión para alojar células en monocapa. Un primer extremo respectivo 22 de los canales de célula 20 está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo 30 que presenta un primer puerto de fluido 31 en un primer extremo 32 y un segundo puerto de fluido 33 en un segundo extremo 34. Los primeros canales de lavado 40 están preferentemente presentes y se extienden desde un segundo extremo respectivo 24 de los canales celulares 20 a un canal de salida de flujo 50. Por lo tanto, un primer canal de lavado 40 tiene un primer extremo 42 en conexión fluida con un segundo extremo 24 de un canal celular 20 y un segundo extremo opuesto 44 en conexión fluida con el canal de salida de flujo 50. El canal de salida de flujo 50 está en conexión fluida con un tercer puerto de fluido 51.

30

35

El sustrato 10 tiene múltiples canales celulares 20 donde las células se cultivan. Los canales celulares 20 pueden disponerse en paralelo como se muestra en la Fig. 1 y mostrarse además en la vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea A-A en la Fig. 1, como se muestra en la Fig. 2. En tal caso, un primer extremo respectivo 22 de los canales celulares 20 está en conexión fluida con el canal de entrada de flujo 30 y se extiende desde este canal de entrada de flujo 30. Para aumentar el número total de canales celulares 20, los canales celulares 20 pueden extenderse desde cualquier lado longitudinal del canal de flujo 30, duplicando así sustancialmente el número de canales celulares 20 en comparación con presentar solo canales celulares 20 en un lado del flujo canal 30, véase la Fig. 5.

40

45

En la Fig. 5, el sustrato 10 del dispositivo microfluidico 1 tiene dos conjuntos 2A, 2B de canales celulares 20. Los canales celulares 20 de cada uno de dichos conjuntos 2A, 2B tienen su primer extremo respectivo en conexión fluida a un canal de entrada de fluido común 30 con el primer y el segundo puerto de fluido 31, 33 en sus dos extremos 32, 34. Sin embargo, cada conjunto 2A, 2B tiene un canal de salida de flujo respectivo 50A, 50B como se muestra en la Fig. 5. Por lo tanto, los segundos extremos de los primeros canales de lavado 40 en el primer conjunto 2A están en conexión fluida con un primer canal de salida de flujo 50A, mientras que los segundos extremos de los primeros canales de lavado 40 en el segundo 2B están en conexión fluida con un segundo flujo canal de salida 50B. Estos dos canales de salida de flujo 50A, 50B comparten preferentemente un tercer puerto de salida común 51.

50

El dispositivo microfluidico 1 de la Fig. 5 básicamente multiplexa dos conjuntos 2A, 2B como se muestra en la Fig. 1. Esto significa que los dos conjuntos 2A, 2B de canales celulares 20 y primeros canales de lavado 40 comparten un canal de entrada de flujo común 30 conectado en su primer extremo 32 al primer puerto de fluido 31 y en su segundo extremo 34 al segundo puerto de fluido 33. Cada conjunto 2A, 2B de canales celulares 20 y primeros canales de lavado 40 termina en un canal de salida de flujo respectivo 50A, 50B que están interconectados y conectados a un tercer puerto de fluido común 51.

60

Las células presentes en los canales celulares 20 en el primer conjunto 2A a la izquierda estarán expuestas al mismo

medio de cultivo, los reactivos y productos químicos ingresados en el primer puerto de fluido 31 que las células presentes en los canales celulares 20 en el segundo conjunto 2B a la derecha en la figura.

También son posibles disposiciones más complejas de canales celulares 20 y canales de entrada de flujo 30 en el sustrato 10 como se describirá adicionalmente en esta invención en relación con las Fig. 6-7 y 10. La característica importante es que cada canal celular 20 tiene un extremo 22 en conexión fluida con un canal de entrada de flujo 30 y que los canales celulares 20 están separados para impedir que las células escapen de un canal celular 20 y entren en otro canal celular 20.

Los canales celulares 20 están dimensionados para alojar células en monocapa. Esto significa que la altura o el diámetro de los canales celulares 20 se selecciona para que sea aproximada o ligeramente mayor que el diámetro de las células a monitorear. Por ejemplo, los canales celulares 20 podrían presentar una sección transversal sustancialmente cuadrática como se muestra en la Fig. 2 con un lado del canal que coincide sustancialmente con el diámetro celular de las células. Alternativamente, los canales celulares 20 podrían presentar una sección transversal circular o en forma de U con un diámetro que coincida sustancialmente con el diámetro celular. También son posibles otras configuraciones de sección transversal siempre que las células puedan cultivarse de manera viable, preferentemente en monocapa, en los canales celulares 20. Esto implica que los canales celulares 20 pueden presentar varias células de ancho, pero preferentemente solo una célula de altura. En este caso, las células pueden crecer en los canales celulares formando una monocapa 2D que puede ser más ancha que una célula, pero que es preferentemente una monocapa.

El canal de entrada de flujo 30 tiene preferentemente dimensiones que son significativamente más grandes que el diámetro de las células a monitorear. Esto significa que cualquier célula que ingrese al canal de entrada de flujo 30 será arrastrada a través del canal de entrada de flujo 30 típicamente hacia el segundo puerto de fluido 33 por un flujo de medio de cultivo, preferentemente continuo, desde el primer puerto de fluido 31 a través del canal de flujo 30 y hacia el segundo puerto de flujo 33. Por lo tanto, en una realización, el canal de entrada de flujo 30 tiene una dimensión suficientemente grande para permitir que las células fluyan a través del canal de entrada de flujo 30.

Las diferencias en las dimensiones de la sección transversal del canal de entrada de flujo 30 y los canales celulares 20 se pueden explotar adicionalmente para separar las células entre sí en una muestra biológica aplicada al dispositivo microfluídico 1. Por ejemplo, la muestra biológica puede contener células de interés que presentan un tamaño suficientemente pequeño para permitir que las células entren en los canales celulares 20 cuando fluyen a través del canal de entrada de fluido 30. La muestra biológica puede comprender adicionalmente células más grandes que son demasiado grandes para entrar en un canal celular 20 pero aún lo suficientemente pequeñas como para fluir a través del canal de entrada de flujo 30. Cuando la muestra biológica ingresa al dispositivo microfluídico 1, como a través del primer puerto de entrada 31, se obtiene una separación de tamaño donde las células grandes fluyen más allá de los canales celulares 20 en el canal de entrada de flujo 30 desde el primer puerto de fluido 31 hacia el segundo puerto de fluido 33. Sin embargo, las células diana más pequeñas quedarán atrapadas en los canales celulares 20.

Si la muestra biológica además, o alternativamente, comprende células muy pequeñas que presentan un tamaño lo suficientemente pequeño como para entrar en los primeros canales de lavado 40, se obtiene una separación de tamaño adicional o alternativa. Por lo tanto, mientras que las células diana ingresan a los canales celulares 20 pero no pueden ingresar a los primeros canales de lavado 40 debido al tamaño demasiado grande, las células muy pequeñas ingresarán a los canales celulares 20 y fluirán más hacia los primeros canales de lavado 40 y hacia el canal de salida de flujo 50. Estas pequeñas células saldrán del dispositivo microfluídico 1 a través del tercer puerto de flujo 51.

Por lo tanto, las células grandes nunca entrarán en los canales celulares 20, sino que se enjuagarán a través del canal de entrada de flujo 30 y saldrán por el segundo puerto de flujo 33. Las células pequeñas no serán retenidas en los canales celulares 20 sino que fluirán a través de los canales celulares y los primeros canales de lavado 40 y más allá a través del canal de salida de flujo 50 y el tercer puerto de salida 51. En consecuencia, solo las células diana del tamaño y la dimensión correctos ingresarán y quedarán atrapadas en los canales celulares 20.

Las dimensiones reales de los canales celulares 20 y los primeros canales de lavado 40 pueden seleccionarse y diseñarse en función del tipo particular de células que deberían cultivarse y controlarse en el dispositivo microfluídico 1.

Generalmente, las células, como las de una biblioteca de cepas celulares, se siembran agregando células, como las células de una cepa celular respectiva, en cada canal celular 20. De este modo, se permite que las células crezcan en una monocapa a lo largo de los canales celulares 20. En una realización, cada canal celular 20 contiene células de una sola cepa celular y genotipo. Las células en los canales celulares 20 podrían verse como perlas en una cadena si el canal celular 20 es de una célula de ancho. Si el canal celular 20 es más ancho, las células formarán una capa 2D

en el canal celular 20.

Las células que crecen y se mitigan más allá del primer extremo 22 de los canales celulares 20 entrarán en el canal de entrada de flujo 30 y, por lo tanto, se expulsarán. El segundo extremo opuesto 24 de los canales celulares 20 está  
5 conectado al primer canal de lavado 40, que está dimensionado para impedir que las células escapen del segundo extremo 24 del canal celular 20 y al primer canal de lavado 40.

En una realización, los primeros canales de lavado 40 podrían presentar una pequeña dimensión a lo largo de toda su longitud, es decir, desde el primer extremo 42 conectado al segundo extremo 24 de un canal celular 20 al segundo 44  
10 conectado al canal de salida de flujo 50. En una realización alternativa, el primer canal de lavado 40 comprende una restricción de canal que presenta una dimensión que es demasiado pequeña o estrecha para que las células presentes en un canal celular 20 crezcan o fluyan más allá de la restricción del canal y entren en el primer canal de lavado 40. Esta restricción de canal está entonces presente en el primer extremo 42 del primer canal de lavado 40. La porción restante del primer canal de lavado 40 puede presentar en esta realización una dimensión sustancialmente igual a la  
15 de los canales celulares 20. Por lo tanto, la restricción del canal es un bloqueo u obstrucción eficiente para las células, pero permite que el medio de cultivo y cualquier producto químico, reactivo o agente fluya a través de la obstrucción del canal y adicionalmente al primer canal de lavado 40 y al canal de salida del flujo 50.

Ambas realizaciones de ejemplo logran el efecto deseado de impedir que las células del tamaño objetivo presentes  
20 en los canales celulares 20 crezcan o fluyan más allá del segundo extremo 24 de los canales celulares 20 y entren en los primeros canales de lavado 40.

En una realización, véase la Fig. 3, cada canal celular 20 de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente 20 está flanqueado a lo largo de al menos uno de sus lados longitudinales 26, 28 con un segundo canal  
25 de lavado 60 respectivo que presenta un primer extremo 62 en conexión fluida con el canal de entrada de flujo 30 y un segundo extremo 64 en conexión fluida con el canal de salida de flujo 50. Los segundos canales de lavado 60 tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar las células.

En esta realización, cada canal celular 20 tiene al menos un segundo canal de lavado 60 en conexión fluida con el  
30 canal celular 20 y dispuesto a lo largo de uno de sus lados longitudinales 26, 28. La realización como se muestra en la Fig. 3 tiene segundos canales de lavado 60 dispuestos a lo largo de ambos lados longitudinales 26, 28 de cada canal celular 20.

En una realización, los primeros canales de lavado 40 y los segundos canales de lavado 60 pueden estar  
35 interconectados, formando así una capa de lavado continuo alrededor de los canales celulares 20 como se muestra en la Fig. 3. Por lo tanto, la porción de los segundos canales de lavado 60 desde el segundo extremo 24 de los canales celulares 20 al segundo extremo 64 de los segundos canales de lavado 60 puede estar interconectada a los primeros canales de lavado adyacentes 40.

40 La dimensión de los segundos canales de lavado 60 (o capa de lavado), como la profundidad o la altura, es demasiado pequeña como para alojar las células. Esto significa que las células presentes en los canales celulares 20 no pueden entrar en los segundos canales adyacentes de lavado 60, pero permanecerán en los canales celulares 20.

La Fig. 4 es una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico 1 en la Fig. 3 a lo largo de la línea A-A. Esta  
45 figura ilustra claramente la profundidad comparativamente menor de los segundos canales de lavado 60, en comparación con los canales celulares 20. Los segundos canales de lavado 60 pueden presentar cualquier configuración de sección transversal, como cuadrática, rectangular, circular, en forma de U, etc.

En una realización particular, el primer canal y el canal de lavado 40, 60 tienen la misma profundidad en el sustrato  
50 10.

El canal celular 20 tiene preferentemente una profundidad sustancialmente igual cuando viaja desde su primer extremo 22 en el canal de entrada de flujo 30 a su segundo extremo 24. Esta profundidad corresponde preferentemente o es ligeramente mayor que el diámetro de la célula para permitir que las células en una monocapa en el canal celular 20.  
55 En el segundo extremo 24 del canal celular 20, la profundidad será menor cuando ingrese al primer canal de lavado 40 que se extiende desde el segundo extremo 24 del canal celular 20 al canal de salida de flujo 50. Esta profundidad menor, la cual es preferentemente menor que el diámetro de la célula, impide que las células presentes en el canal celular 20 entren en el primer canal de lavado 40.

60 En una realización, como se muestra en las Fig. 3 y 4, el sustrato 10 comprende preferentemente estructuras o porciones 15 que se extienden a través de todo el espesor del sustrato 10 para aumentar su estabilidad. Las Fig. 3 y 4 ilustran tales estructuras 15 en forma de pilares provistos entre algunos de los segundos canales de lavado 60 a lo

largo de las longitudes longitudinales de los canales celulares 20. Estos pilares 15 pueden presentar cualquier forma siempre que soporten la capa de lavado y permitan el flujo de fluido. Podrían, por ejemplo, ser rectangulares, con forma de estrella, redondas o triangulares y posicionarse de manera regular o irregular. Estas estructuras 15 podrían ser estructuras separadas como se muestra en las figuras para promover el flujo de fluido en toda la capa de lavado, es decir, entre los segundos canales de lavado 60. En un enfoque alternativo, cada columna de pilares mostrada en las figuras forma una estructura única que se extiende a lo largo de toda la longitud entre el canal de entrada de flujo 30 y el canal de salida de flujo 50. Tal solución puede dar como resultado un sustrato 10 más estable, sin embargo, a costa de un flujo de fluido menos eficiente.

10 Los canales celulares 20 y el primer y segundo canal de lavado 40, 60 son preferentemente canales abiertos como se muestra en las Fig. 2 y 4. Esto significa que una placa de cubierta 70 se coloca preferentemente sobre el sustrato 10 para formar una tapa y sellar los canales celulares 20 y tanto el primer como el segundo canal de lavado 40, 60. De este modo, la placa de cubierta 70 está dispuesta sobre una superficie principal 12 del sustrato 10.

15 A continuación se incluye una breve descripción del funcionamiento del dispositivo microfluídico 1.

Durante la carga de células, las células con medios de cultivo ingresan al primer puerto de fluido 31 o al segundo puerto de fluido 33 y fluyen hacia el canal de entrada de flujo 30. En una realización preferida de la invención, todos los puertos de fluido 31, 33, 51 están abiertos para permitir que los medios de cultivo y las células sean empujados hacia los canales celulares 20. El exceso de células, o células que son demasiado grandes para caber en los canales celulares 20, se lavan a través del segundo puerto de fluido 33 o el primer puerto de fluido 31, ya que la profundidad de los canales celulares 20 y los segundos canales de lavado 60 (si están presentes) es demasiado superficial para permitir que las células alcancen el canal de salida de flujo 50 y alcancen el tercer puerto de fluido 51. Los medios de cultivo salen del dispositivo microfluídico 1 tanto del segundo puerto de fluido 33 o del primer puerto de fluido 31 como del tercer puerto de fluido 51. La capacidad de selección de tamaño del dispositivo microfluídico 1 puede usarse para sembrar los canales celulares 20 con, por ejemplo, bacterias que están separadas de, por ejemplo, células sanguíneas que son significativamente más grandes.

Durante el funcionamiento del dispositivo microfluídico 1, el medio de cultivo entra en el primer puerto de fluido 31 como se describió anteriormente. En una primera realización, el segundo puerto de fluido 33 y el tercer puerto de fluido 51 están abiertos. Esto significa que el medio de cultivo no solo saldrá a través del segundo puerto de fluido 33 sino también a través del tercer puerto de fluido 51. Esto significa que el medio de cultivo, los agentes de prueba y los reactivos llegarán efectivamente a todas las células dentro de los canales celulares 20. El exceso de células fluirá hacia el canal de entrada de flujo 30 y más lejos desde el segundo puerto de fluido 33, mientras que los medios fluyen sobre todas las células y hacia el canal de salida de flujo 50 y hacia afuera desde el tercer puerto de fluido 51 para mantener todas las células abastecidas con cultivo fresco medio o reactivos.

En una segunda realización, el tercer puerto de fluido 51 está cerrado, de modo tal que el medio de cultivo y el exceso de células salen a través del segundo puerto de fluido 33. Esta realización generalmente logra un flujo menos eficiente de medio celular sobre las células en los canales celulares 20. en comparación con las primeras realizaciones.

En las etapas de crecimiento, lavado y reacción, el tercer puerto de fluido 51 está preferentemente abierto. Esto significa que el medio de cultivo, el líquido o líquido de lavado y la solución con reactivos de reacción entran en el primer puerto de fluido 31 y fluyen a través del canal de entrada de flujo 30, los canales celulares 20 y los primeros canales de lavado 40 (y los segundos canales de lavado opcionales 60) hacia el canal de salida de flujo 50 y el tercer puerto de fluido 51. En otra realización, el segundo puerto de fluido 33 está abierto durante el crecimiento, el lavado y las etapas. En tal caso, el medio de cultivo, el fluido de lavado o el líquido y la solución con agentes reactivos pueden salir a través del tercer puerto de fluido 51 o el segundo puerto de fluido 33.

50 La Fig. 6 ilustra una realización de un dispositivo microfluídico 1 que presenta múltiples, es decir, al menos dos, conjuntos 2A, 2B, 2C, 2D de canales celulares 20 y primeros canales de lavado 40 que comparten un segundo puerto de fluido común 33 y un tercer puerto de fluido 51 pero tienen puertos de fluido separados, es decir, individuales 31A, 31B, 31C, 31D. Esto significa que pueden introducirse diferentes medios de cultivo y/o reactivos o productos químicos en las células presentes en uno de los conjuntos 2A de los canales celulares 20, en comparación con las células presentes en otro de los conjuntos 2B, 2C, 2D de los canales celulares 20.

Por lo tanto, en una realización, el sustrato 10 del dispositivo microfluídico 1 tiene múltiples conjuntos 2A, 2B, 2C, 2D de la pluralidad de canales celulares separados espacialmente y separados 20, canales de entrada de flujo múltiple 30A, 30B, 30C, 30D y flujo múltiple canales de salida 50A, 50B, 50C, 50D. El primer extremo respectivo 22 de la pluralidad de canales celulares separados espacialmente y separados 20 en cada conjunto 2A, 2B, 2C, 2D de los conjuntos múltiples 2A, 2B, 2C, 2D está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo respectivo 30A, 30B, 30C, 30D de los canales de entrada de flujo múltiple 30A, 30B, 30C, 30D. El segundo extremo respectivo 44 de los primeros



canales de lavado 40 en cada conjunto 2A, 2B, 2C, 2D de los conjuntos múltiples 2A, 2B, 2C, 2D está en conexión fluida con un canal de salida de flujo respectivo 50A, 50B, 50C, 50D de los canales de salida de flujo múltiple 50A, 50B, 50C, 50D.

5 Un primer extremo respectivo 32A, 32B, 32C, 32D de cada canal de entrada de flujo 30A, 30B, 30C, 30D de los canales de entrada de flujo múltiple 30A, 30B, 30C, 30D está en conexión fluida con un primer puerto de fluido respectivo 31A, 31B, 31C, 31D. De manera correspondiente, un segundo extremo respectivo 34A, 34B, 34C, 34D de cada canal de entrada de flujo 30A, 30B, 30C, 30D de los canales de entrada de flujo múltiple 30A, 30B, 30C, 30D está en conexión fluida con un segundo puerto de fluido común 33. Además, cada canal de salida de flujo 50A, 50B, 50C, 50D de los  
10 canales de salida de flujo múltiple 50A, 50B, 50C, 50D está en conexión fluida con un tercer puerto de fluido común 51.

El dispositivo microfluídico 1 de la Fig. 6 debería verse simplemente como una realización ejemplar que presenta múltiples, es decir, al menos dos, conjuntos 2A, 2B, 2C, 2D de canales celulares 20. Esto significa que las variantes  
15 del dispositivo microfluídico 1 podrían presentar un sustrato con  $M$  de tales conjuntos, y donde  $M$  es un valor entero mayor o igual a 2.

La Fig. 7 ilustra esquemáticamente una realización del uso del dispositivo microfluídico 1 de la Fig. 6. En una realización, durante la carga, las células y el medio de cultivo entran en el segundo puerto de fluido 33 con el medio  
20 de cultivo que fluye a través del tercer puerto de fluido 51 y a través de los primeros puertos de fluido 31A, 31B, 31C, 31D. Las células excesivas fluyen a través de los primeros puertos de fluido 31A, 31B, 31C, 31D. En otra realización, las células entran a través de los primeros puertos de fluido individuales 31A, 31B, 31C, 31D con células en exceso que salen a través del segundo puerto 33 común y el medio de cultivo que sale a través del segundo puerto 33 de fluido común y el tercer puerto 51 de fluido común.

25 Durante el funcionamiento del dispositivo microfluídico 1, el medio de cultivo entra preferentemente en los primeros puertos de fluido separados 31A, 31B, 31C, 31D, permitiendo así que diferentes medios de cultivo alcancen los diferentes conjuntos 2A, 2B, 2C, 2D de los canales celulares 20 y los primeros canales de lavado 40. Las células en exceso se lavan a través del segundo puerto de fluido común 33 y el medio de cultivo fluye desde el tercer puerto de  
30 fluido común 51 y también a través del segundo puerto de fluido común 33.

Si se va a usar un mismo medio de cultivo para todos los conjuntos 2A, 2B, 2C, 2D de los canales celulares 20 y no hay necesidad de agregar productos químicos, reactivos u otros agentes individualmente a los diferentes conjuntos 2A, 2B, 2C, 2D, entonces el flujo del medio de cultivo podría ser, en cambio, desde el segundo puerto de fluido común  
35 33 y hacia el tercer puerto de fluido común 51 y los primeros puertos de fluido separados 31A, 31B, 31C, 31D.

La Fig. 10 ilustra esquemáticamente una variante del dispositivo microfluídico 1 descrito anteriormente en relación con las Fig. 6 y 7. En esta realización, el primer extremo respectivo 32A, 32B, 32C de cada canal de entrada de flujo 30A, 30B, 30C de los canales de entrada de flujo múltiple 30A, 30B, 30C está en conexión fluida con múltiples primeros  
40 puertos de fluido respectivos 31A, 31A', 31B, 31B', 31C, 31C'. El segundo extremo respectivo 34A, 34B, 34C de cada canal de entrada de flujo 30A, 30B, 30C de los canales de entrada de flujo múltiple 30A, 30B, 30C está en conexión fluida con múltiples segundos puertos de fluido comunes 33A, 33B, 33C.

Esto significa que, en esta realización, cada canal de entrada de flujo 30A, 30B, 30C está en conexión fluida con  
45 múltiples primeros puertos de fluido separados 31A, 31A', 31B, 31B', 31C, 31C' y múltiples puertos de fluido secundarios comunes 33A, 33B, 33C. Los múltiples puertos de fluido comunes 33A, 33B, 33C son compartidos por todos los conjuntos 2A, 2B, 2C de canales celulares, mientras que cada uno de estos conjuntos 2A, 2B, 2C de canales celulares tiene su propio grupo de múltiples primeros puertos de fluido 31A, 31A'; 31B, 31B'; 31C, 31C'.

50 El uso de múltiples primeros puertos de fluido 31A, 31A', 31B, 31B', 31C, 31C' por conjunto 2A, 2B, 2C de canales celulares y múltiples puertos de fluido secundarios comunes 33A, 33B, 33C permite que un mismo dispositivo microfluídico 1 sea operado en diferentes modos.

Un primer modo de operación implica el uso de múltiples cepas celulares específicas. En tal caso, las diferentes cepas  
55 celulares se cargan en el dispositivo microfluídico 1 en los primeros puertos de fluido 31A, 31B, 31C (o 31A', 31B', 31C') con al menos uno de los segundos puertos de fluido comunes 33A, 33B, 33C como salida para el exceso de células, mientras que el medio de cultivo sale del dispositivo microfluídico 1 a través del tercer puerto de fluido común 51 y el o los segundos puertos de fluido comunes abiertos 33A, 33B, 33C. Durante la operación, el medio de cultivo y los reactivos, productos químicos o agentes se transportan desde al menos uno de los segundos puertos de fluido  
60 comunes 33A, 33B, 33C que no se usó para desechos celulares durante la carga, y dejan el dispositivo microfluídico 1 a través del tercer puerto de fluido común 51 y los primeros puertos de fluido 31A', 31B', 31C' (o 31A, 31B, 31C).

En una realización preferida particular de la invención, se prefiere usar un primer puerto de fluido 31A, 31B, 31C de cada primer par de puertos de fluido 31A, 31A', 31B, 31B', 31C, 31C' como puerto de entrada de medio de cultivo y células durante la carga y el otro puerto de fluido 31A', 31B', 31C' de cada primer par de puertos de fluido 31A, 31A', 31B, 31B', 31C, 31C' como puerto de salida del medio de cultivo durante la operación. En consecuencia, se prefiere  
 5 usar un segundo puerto de fluido común 33A de los múltiples segundos puertos de fluido comunes 33A, 33B, 33C como puerto de salida del medio de cultivo y las células durante la carga y otro segundo puerto de fluido común 33C como puerto de entrada para el medio de cultivo y los reactivos, los productos químicos o los agentes durante la operación. Tal enfoque reduce el riesgo de contaminar los diversos puertos de fluido y, en particular, reduce el riesgo de contaminar el medio de cultivo y los reactivos, los productos químicos o los agentes utilizados durante la operación  
 10 con el medio de cultivo y las células añadidas durante la carga.

Un segundo modo de operación implica el uso de una sola cepa celular o biblioteca de cepas celulares. En tal caso, la cepa celular o las células de la biblioteca de cepas se cargan a través de al menos un, preferentemente, un segundo  
 15 puerto de salida común 33A usando un primer puerto de fluido respectivo 31A', 31B', 31C' (o 31A, 31B, 31C) como puerto de salida para el exceso de células y el medio de cultivo y el tercer puerto de fluido común 51 como puerto de salida para el medio de cultivo. Durante el funcionamiento, pueden introducirse diferentes medios de cultivo y/o reactivos, productos químicos o agentes diferentes en el primer puerto de fluido respectivo 31A, 31B, 31C (o 31A', 31B', 31C'). Al menos uno de los segundos puertos comunes de fluido 33B, 33C y el tercer puerto común de fluido 51 se usan como puertos de salida para los diferentes medios de cultivo y/o diferentes reactivos, productos químicos o  
 20 agentes.

En una realización particular, el segundo extremo respectivo 34A, 34B, 34C de cada canal de entrada de flujo 30A, 30B, 30C de los canales de entrada de flujo múltiple 30A, 30B, 30C está en conexión fluida con el segundo puerto (s) de fluido común 33A, 33B, 33C a través de un canal de interconexión respectivo 36A, 36B, 36C. En una realización,  
 25 cada canal de interconexión respectivo 36A, 36B, 36C tiene una longitud de canal sustancialmente igual.

Por lo tanto, en una realización, la distancia del canal desde cada segundo extremo respectivo 34A, 34B, 34C de los canales de entrada de flujo 30A, 30B, 30C al segundo puerto de fluido común 33 (véase Fig. 6) o los puertos 33A, 33B, 33C (ver Fig. 10) es preferentemente la misma para cada conjunto 2A, 2B, 2C de canales celulares. Esto significa  
 30 que los canales de interconexión 36A, 36B, 36C se usan para compensar las diferencias en las distancias físicas en el sustrato 10 entre los respectivos canales de entrada de fluido 30A, 30B, 30C y los segundos puertos comunes de fluido 33A, 33B, 33C como se muestra en la Fig. 10. Tal misma distancia mantiene la presión sobre el flujo igual para cada conjunto 2A, 2B, 2C de los canales celulares.

La Fig. 11 ilustra esquemáticamente un aumento de la porción del dispositivo microfluídico que se muestra en la Fig. 10 presente en el cuadro A. En consecuencia, a Fig. 12 ilustra esquemáticamente un aumento de la porción del dispositivo microfluídico que se muestra en la Fig. 11 presente en el cuadro B. Esta Fig. 12 ilustra dos características  
 35 opcionales, pero preferidas, del dispositivo microfluídico.

En primer lugar, cada canal celular 20 tiene preferentemente un identificador de canal respectivo 11. La Fig. 12 ilustra los identificadores de canal 11 como números de canal respectivos para los diversos canales celulares 20. Por ejemplo, los canales celulares 20 podrían numerarse desde 0000 (o 0001) hasta 9999 para un dispositivo microfluídico 1 con 10.000 (o 9.999) canales celulares 20. Se podrían usar otros símbolos de identificación que los números como  
 40 identificadores de canal 11.

Por lo tanto, en una realización, véanse las Fig. 9 y 12, el sustrato 10 del dispositivo microfluídico comprende un identificador de canal respectivo 11 para cada canal celular separado y definido espacialmente 20 de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente 20. Los identificadores de canal respectivos 11 son visibles  
 45 por imagen.

No es absolutamente necesario que cada canal celular 20 tenga un identificador de canal respectivo 11. Por consiguiente, en una realización, el sustrato 10 comprende un identificador de canal respectivo 11 para al menos cada enésimo canal celular separado y definido espacialmente 20 de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente 20. El parámetro N puede presentar cualquier valor entero igual o mayor que 1, como 1, 2, 5,  
 50 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, como ejemplos no limitativos, aunque ilustrativos.

Por lo tanto, los identificadores de canal 11 son preferentemente legibles de manera visual si se usa, por ejemplo, un microscopio o un dispositivo de imágenes que toma imágenes o graba un vídeo de células presentes en los canales celulares 20 del dispositivo microfluídico 1. Esto significa que las células presentes en un canal celular dado 20 pueden  
 60 identificarse a través del identificador de canal 11.

En segundo lugar, el dispositivo microfluídico comprende preferentemente canales de referencia 21, véanse las Fig. 8

y 12. Por ejemplo, cada enésimo canal celular 20 en el sustrato 10 podría reemplazarse por un canal de referencia 21 para algún valor entero definido de n. Alternativamente, el primer y/o último canal celular 20 podría presentar la forma de un canal de referencia 21. Una variante adicional es presentar uno o más canales de referencia 21 en alguna otra posición seleccionada del canal celular en el sustrato 10.

5

Los canales de referencia 21 están diseñados para impedir que las células entren y crezcan dentro de los canales de referencia 21. Esto podría lograrse teniendo una dimensión de los canales de referencia 21 que sea demasiado pequeña como para que las células entren en los canales de referencia 21. Alternativamente, las restricciones de canal pueden estar presentes en o cerca de los extremos de los canales de referencia 21. Dichas restricciones de canal impiden así que las células entren en los canales de referencia 21 pero aún permiten que el medio de cultivo y cualquier producto químico, reactivo o agente entre y fluya a través de los canales de referencia 21.

10

Los canales de referencia 21 pueden usarse para obtener datos de fondo, control o referencia, como durante la formación de imágenes del dispositivo microfluídico y las células presentes en el mismo. Por ejemplo, los productos químicos que presentan una propiedad de fluorescencia o absorbancia particular podrían agregarse a las células para determinar o controlar una característica particular de las células. En tal caso, los registros de fluorescencia o absorbancia obtenidos de los canales de referencia 21 se pueden usar como referencia de fondo o de control al determinar la fluorescencia o absorbancia en los diferentes canales celulares 20. Por lo tanto, los canales de referencia 21 pueden usarse para fines de sustracción de fondo. Otro ejemplo es cuando las células se controlan mediante microscopía de contraste de fase, en cuyo caso la imagen de contraste de fase característica del canal de referencia se puede utilizar para presentar en cuenta el fondo no celular.

15

20

La Fig. 8 ilustra una realización de tales canales de referencia 21. En esta realización, el sustrato 10 tiene al menos un canal de referencia 21 dispuesto entre y sustancialmente paralelo con dos canales celulares adyacentes separados espacialmente y adyacentes 20 de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente 20. Un primer extremo 23 respectivo del al menos un canal 21 de referencia está en conexión fluida con el canal 30 de entrada de flujo y comprende un bloque celular 27 dispuesto para impedir que las células entren en el al menos un canal 21 de referencia desde el primer extremo 23 respectivo. Un segundo extremo 25 respectivo del al menos un canal 21 de referencia está en conexión fluida con un primer extremo 42 de un primer canal 40 de lavado respectivo que presenta un segundo extremo 44 en conexión fluida con el canal 50 de salida de flujo.

25

30

En esta realización, los canales de referencia 21 son sustancialmente los mismos que el canal celular 20 con respecto a la extensión y la dimensión, pero con una diferencia importante. Los canales de referencia 21 comprenden un bloque celular 27 en su primer extremo respectivo 23. Este bloque celular 27 podría presentar la forma de una restricción de canal o una porción de canal con una dimensión más pequeña que el resto de los canales de referencia 21. La restricción de canal o la porción de dimensión más pequeña se selecciona para que sea demasiado pequeña o estrecha para las células que de otro modo pueden entrar en los canales 20 de la célula. Por lo tanto, estas células no pueden entrar en los canales de referencia 21 desde el primer extremo 23. El segundo extremo 25 de los canales de referencia 21 está conectado, como los canales celulares 20, a un primer canal de lavado 40 respectivo. Esto significa que las células no pueden entrar en los canales de referencia 21 desde el segundo extremo 25 debido a la dimensión o tamaño seleccionado de los primeros canales de lavado 40.

35

40

La Fig. 12 ilustra otra realización de canales de referencia 21. En esta realización, el sustrato 10 tiene al menos un canal de referencia 21 dispuesto entre y sustancialmente paralelo con dos canales celulares adyacentes separados y definidos espacialmente 20 de la pluralidad de canales celulares separados y separados espacialmente 20. Un primer extremo respectivo 23 del al menos un canal de referencia 21 está en conexión fluida con el canal de entrada de flujo 30A y comprende una restricción de canal 29 dispuesta para impedir que las células entren en el al menos un canal de referencia 21 desde el primer extremo respectivo 23. Un segundo extremo respectivo 25 del al menos un canal de referencia 21 está en conexión fluida con el canal de salida de flujo 50A y comprende una restricción de canal 29 dispuesta para impedir que las células entren en el al menos un canal de referencia 21 desde el segundo extremo respectivo 25.

45

50

En esta realización, cada canal de referencia 21 comprende de este modo dos restricciones de canal 29 una en o cerca de cada extremo 23, 25 del canal de referencia 21. Las dimensiones de la parte restante del canal de referencia 21 podrían ser sustancialmente las mismas que las dimensiones de los canales celulares 20.

55

En las realizaciones descritas anteriormente, los canales de referencia 21 se describen como dispuestos entre dos canales celulares adyacentes 20. En otras realizaciones, un canal de referencia 21 puede estar presente en cualquier extremo de un conjunto 2A de canales celulares 20, de modo que carece de un canal celular 20 a lo largo de uno de sus dos lados longitudinales. También es posible presentar dos canales de referencia 21 dispuestos adyacentes entre sí.

60

Sin embargo, generalmente se prefiere presentar los canales de referencia 21 distribuidos uniformemente sobre el conjunto 2A de canales celulares, tal como presentar un canal de referencia 21 en cada enésima posición del canal en el sustrato 10.

- 5 La Fig. 13 es una imagen de SEM de un molde que puede usarse para moldear un dispositivo microfluídico de las realizaciones. La figura muestra los identificadores de canal como números de canal y muestra las restricciones de canal utilizadas para definir canales de referencia y la interfaz entre un canal celular y el primer canal de lavado correspondiente.
- 10 La Fig. 14 ilustra imágenes de contraste de fase de las células de *Escherichia coli* que crecen en un dispositivo microfluídico según las realizaciones tomadas en dos puntos diferentes en el tiempo. La dimensión más pequeña de los primeros canales de lavado, como en forma de restricciones de canal en la interfaz entre los primeros canales de lavado y los canales celulares, impide de manera eficiente que las células de *E. coli* crezcan hacia la izquierda en la figura, es decir, que ingresen a los primeros canales de lavado. El canal en la parte inferior de la figura es un canal de referencia vacío. Las restricciones dobles en cada extremo del canal de referencia impiden que cualquier célula de *E. coli* ingrese al canal de referencia. Los identificadores de canal son visibles en las imágenes de contraste de fase, lo que permite la identificación de canales celulares individuales y de células de *E. coli* que crecen allí.

El sustrato del dispositivo microfluídico puede estar hecho de cualquier material transparente, como material plástico, donde se pueden definir las estructuras que constituyen los canales celulares, los primeros canales de lavado, el primer puerto de fluido, el segundo puerto de fluido, el canal de entrada de flujo, el canal de salida de flujo y el tercer puerto de fluido. Ejemplos no limitativos de materiales adecuados incluyen ZEONEX® y ZEONOR®, que son polímeros olefínicos cíclicos (COP) comercializados por ZEON Chemicals L.P. y TOPAS®, que son copolímeros olefínicos cíclicos (COC) comercializados por Topas Advanced Polymers. Estos materiales tienen excelentes características ópticas en términos de transmisión y fluorescencia de fondo. También tienen buenas características de flujo cuando se calientan y, por lo tanto, pueden replicar estructuras pequeñas que permiten la formación de sustratos del dispositivo microfluídico.

30 Otros ejemplos de materiales adecuados para el sustrato incluyen vidrios, polidimetilsiloxano (PDMS), poli(metil metacrilato) (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), politetrafluoroetileno (PTFE), tereftalato de polietileno (PET) y poli(p-fenileno sulfuro) (PPS).

La placa de cubierta ilustrada en las Fig. 2 y 4 puede fabricarse con diversos materiales que son preferentemente transparentes para permitir la formación de imágenes. Los ejemplos no limitativos incluyen vidrio y materiales plásticos.

35 En el funcionamiento, el dispositivo microfluídico está conectado preferentemente a un colector fluídico para formar un sistema de cultivo que comprende el dispositivo microfluídico y el colector fluídico. El colector fluídico está configurado para distribuir el medio de cultivo y los reactivos, productos químicos o agentes a los canales celulares utilizando al menos una bomba controlada por ordenador. El colector fluídico está configurado preferentemente para permitir el cambio de medios de cultivo, distribución de reactivos, productos químicos o agentes usando las bombas preprogramadas y controladas por ordenador. En una realización particular, los reactivos, los productos químicos o los agentes y los medios de cultivo celular pueden mantenerse a diferentes temperaturas durante todo el experimento.

45 La Fig. 16 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para cargar un dispositivo microfluídico según una realización. El procedimiento comprende introducir células y medio de cultivo en uno de un primer puerto de fluido y un segundo puerto de fluido del dispositivo microfluídico en la etapa S1 para permitir que las células y el medio de cultivo fluyan a través de un canal de entrada de flujo del dispositivo microfluídico y en una pluralidad de dispositivos definidos espacialmente y canales celulares separados. Un primer extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente está en conexión fluida con el canal de entrada de flujo que presenta un primer extremo en conexión fluida con el primer puerto de fluido y un segundo extremo en conexión fluida con el segundo puerto de fluido. Una etapa S2 siguiente comprende la salida de células excesivas a través del otro del primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido y la etapa S3 comprende la salida del medio de cultivo a través del otro del primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido y a través de un tercer puerto en conexión de fluido con un canal de salida de flujo. Un segundo extremo respectivo de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente está en conexión fluida con un primer extremo de un primer canal de lavado respectivo que presenta un segundo extremo en conexión fluida con el canal de salida de flujo. Los primeros canales de lavado tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar las células.

60 Las etapas S2 y S3 generalmente tienen lugar al mismo, a medida que las células y el medio de cultivo de entrada ingresan al dispositivo microfluídico y sus diversos canales.

El dispositivo microfluídico de las realizaciones se puede usar para diversas aplicaciones. Un ejemplo de tal aplicación

es la prueba de susceptibilidad a antibióticos (AST). Por ejemplo, el dispositivo microfluídico 1 que se muestra en la Fig. 10 puede usarse para este propósito. En tal caso, la cepa de muestra puede cargarse, por ejemplo, desde el segundo puerto de fluido común 33A usando los primeros puertos de fluido 31A', 31B', 31C' como puertos de salida para el exceso de células y medio de cultivo y el tercer puerto de fluido común 51 como puerto de salida para el medio de cultivo y para succionar células en los canales celulares. En un ejemplo, durante la carga, el medio de cultivo fluye desde el segundo puerto de fluido común 33C al segundo puerto de fluido común 33B para impedir contaminar el segundo puerto de fluido común 33C. Después de cargar la célula, el medio de cultivo fluye preferentemente desde el segundo puerto de fluido común 33C usando los primeros puertos de fluido 31A', 31B', 31C' y el tercer puerto de fluido común 51 como puertos de salida. En esta etapa, se puede controlar el crecimiento de las células en los canales celulares durante un tiempo, de 0 minutos a días, mientras se obtienen imágenes de las células en los diferentes canales celulares. La prueba de AST comienza haciendo fluir diferentes antibióticos o un mismo antibiótico pero a diferentes concentraciones en los diferentes conjuntos 2A, 2B, 2C de canales celulares usando los primeros puertos de fluido 31A, 31B, 31C como puertos de entrada, mientras usa los segundos puertos comunes de fluido 33A, 33B, 33C y el tercer puerto de fluido común 51 como puertos de salida. La susceptibilidad se controla mediante la respuesta fenotípica al antibiótico en los diferentes canales celulares. Por ejemplo, es posible determinar la tasa de crecimiento promedio y la distribución célula a célula de las tasas de crecimiento simplemente monitoreando la extensión de longitud en contraste de fase usando rutinas automáticas de análisis de imágenes. Estas mediciones se pueden promediar sobre las células en muchos canales celulares, de modo que es posible determinar cambios fenotípicos en cuestión de minutos. Los cambios fenotípicos también pueden ser cambios morfológicos, como la compactación del ADN o cambios en la estructura de la membrana o en la integridad. Algunos cambios fenotípicos se estudian mejor mediante la adición de agentes de prueba, como las tinciones fluorescentes 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y SYTOX®, que pueden controlarse en un canal de fluorescencia.

El AST fenotípico puede ser seguido por una prueba de genotipado *in situ*, donde la presencia, ausencia o abundancia de genes significativos, secuencias de ADN o especies de ARN se determinan, por ejemplo, por hibridación fluorescente *in situ* (FISH), secuenciación o amplificación isotérmica *in situ* utilizando, por ejemplo, la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) o la hibridación y ligadura de una o más sondas de candado específicas seguidas de la amplificación de círculo rodante (RCA).

La Fig. 15 presenta imágenes de contraste de fase tomadas de un dispositivo microfluídico durante una prueba de AST en la que las cepas *E. coli* susceptibles al cloranfenicol (concentración inhibitoria mínima (MIC)≈4 µg/ml) y resistentes al cloranfenicol (MIC > 12 µg/ml) se cargaron en diferentes canales celulares en un dispositivo microfluídico correspondiente a la Fig. 10. Después de la carga celular, ambas cepas se expusieron a 6 µg/ml de cloranfenicol. Las imágenes que se toman con 15 minutos de diferencia muestran claramente que la cepa susceptible al cloranfenicol ha crecido mucho menos que la cepa resistente al cloranfenicol.

La Fig. 17 muestra las tasas de crecimiento promedio para tres cepas de *E. coli* diferentes cuando se exponen a 120 µg/ml de eritromicina en un tiempo de 0 min, cuando las tres cepas se cargan en el conjunto 2A, 2B, 2C respectivamente de los canales celulares 20 en un dispositivo microfluídico 1 correspondiente a la Fig. 10. La cepa resistente, indicada con la "x", presenta una MIC de 256 µg/ml, mientras que las cepas no resistentes, indicadas con círculos y diamantes, presentan un MIC~ 12 µg/ml. La figura muestra claramente que la cepa resistente se puede distinguir de las manchas susceptibles en menos de 20 min.

La Fig. 18 muestra la respuesta de la tasa de crecimiento promedio, determinada por la imagen de lapso de tiempo de contraste de fase, para una cepa de *E. coli* resistente a la ciprofloxacina (DA20859 Eco gyrA1-S83L gyrA2-D87N parC-S80I MIC~30 µg/ml) cargada en los conjuntos respectivos 2A, 2B, 2C de los canales celulares 20 en un dispositivo microfluídico 1 correspondiente a la Fig. 1. La cepa de *E. coli* se expuso a (1) ningún fármaco marcado con "x", (2) eritromicina, en 120 µg/ml, marcada con diamantes o (3) ciprofloxacina, en 10 µg/ml, marcada con círculos. El punto de tiempo 0 min corresponde al inicio del tratamiento. La curva correspondiente al tratamiento con el fármaco (eritromicina) al que la cepa es susceptible se puede distinguir de la curva sin tratamiento en < 10 min. La curva correspondiente al tratamiento con el fármaco al que la cepa es susceptible se puede distinguir de la curva correspondiente al fármaco (ciprofloxacina) al que la cepa es resistente en < 15 minutos.

Por lo tanto, una realización se refiere a un procedimiento para pruebas de susceptibilidad a antibióticos. El procedimiento comprende cargar células bacterianas en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente de un dispositivo microfluídico según las realizaciones. El procedimiento también comprende exponer células bacterianas en diferentes canales celulares separados y definidos espacialmente de la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente a diferentes antibióticos y/o diferentes concentraciones de un antibiótico. El procedimiento comprende además determinar la susceptibilidad a los antibióticos de las células bacterianas, basándose en un fenotipo respectivo característico de las células bacterianas en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente.

Por lo tanto, se monitorea y determina una característica de fenotipo respectiva para las células bacterianas y donde esta característica de fenotipo es representativa de la susceptibilidad a los antibióticos de las células bacterianas. En una realización preferida de la invención, la característica de fenotipo es preferentemente al menos uno de una tasa de crecimiento respectiva, un grado respectivo de compactación nucleoide, un grado respectivo de actividad metabólica y un grado respectivo de integridad de membrana de las células bacterianas en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente.

El dispositivo microfluídico de las realizaciones se puede usar para cultivar y controlar varios tipos de células que incluyen, entre otras, células bacterianas, arqueales, eucariotas, tales como las de levadura, células de mamíferos, humanas, etc.

El dispositivo microfluídico de las realizaciones se puede usar para caracterizar células, tal como una biblioteca de cepas celulares. La caracterización puede ser en forma de determinar al menos una característica fenotípica de las cepas celulares y/o genotipar el material genético de las cepas celulares *in situ*. Un ejemplo de la caracterización fenotípica y el genotipado *in situ* de una biblioteca de cepas celulares se describe en la Solicitud de patente en tramitación No. PCT/SE2015/050227. En particular, el dispositivo microfluídico permite monitorear las características fenotípicas y los genotipos determinados *in situ* para conectarlos de una manera altamente paralela. Esto significa que una amplia biblioteca de cepas celulares con diferentes genotipos puede procesarse en paralelo en el dispositivo microfluídico para conectar las características fenotípicas monitoreadas a los diferentes genotipos de las cepas celulares.

La biblioteca de cepas celulares se puede obtener según diversas técnicas dentro de la ingeniería del genoma. Por ejemplo, la Ingeniería Genómica Automática Multiplex (MAGE) se puede usar para crear varios miles de millones de genomas mutantes diferentes por día (Wang y col. Nature, 2009, 460: 894-898). Otras técnicas que se pueden usar para crear una biblioteca de células incluyen la proteína 9 (Cas9) asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente entrecruzadas (CRISPR) (Wang y col., Science, 2014, 343: 80-84; Koike-Yusa y col., Nature Biotechnology, 2014, 32: 309-312; Zhou y col., Nature, 2014, 509: 487-491) o la interferencia de ARN a gran escala (Berns y col., Nature, 2004, 428: 431-437).

El dispositivo microfluídico permite que las células de cada cepa celular en la biblioteca se mantengan y cultiven por separado de las células de otras cepas celulares y otros genotipos. Por lo tanto, cada cepa celular tiene un canal celular separado y definido espacialmente en el dispositivo microfluídico, donde las células pueden crecer y estudiarse.

Las células cultivadas en los canales celulares separados y definidos espacialmente en el dispositivo microfluídico pueden exponerse preferentemente a diversos estímulos o agentes físicos y/o químicos sin ser arrastrados, para controlar la respuesta de las células a estímulos o agentes físicos y/o químicos. Por ejemplo, varios agentes químicos de prueba, como nutrientes, fármacos, antibióticos, inductores o represores de expresión génica, podrían agregarse al medio de cultivo y, por lo tanto, entrar en contacto con las células. Las características fenotípicas de las cepas celulares en términos de la respuesta de las células de las diferentes cepas celulares a los diversos agentes de prueba se pueden determinar, por ejemplo, mediante microscopía. En consecuencia, la temperatura, el pH, la presión, el flujo, los gases, la exposición a la luz o el estrés mecánico al que están expuestas las células podrían modificarse y la respuesta de las células de las diferentes cepas celulares a tales condiciones físicas cambiantes puede determinarse, por ejemplo, por microscopía

Las cepas de células tienen genotipos diferentes, como se representa al presentar diferentes regiones variables en al menos una parte de su material genético. La región variable está típicamente presente en el genoma de las cepas celulares. Alternativamente, la región variable está presente en un elemento genético móvil, como un plásmido o un vector, y por lo tanto no necesariamente tiene que incorporarse de manera estable en el genoma de las células. A continuación, las realizaciones se discuten principalmente con respecto a la región variable que está presente en el genoma. Sin embargo, son posibles realizaciones alternativas donde la región variable y los elementos de ADN adicionales mencionados en esta invención están, en cambio, presentes en un plásmido u otro elemento genético móvil de las cepas celulares. La región variable, o partes de la misma, también puede estar presente en elementos genéticos inestables, como transposones, virus o fagos. Tal codificación a veces tendrá ventajas en términos de amplificar la secuencia variable antes de fijar las células para la secuenciación *in situ*, por ejemplo, escindiendo o circularizando específicamente partes de la región variable del genoma de ADNds antes de fijar las células.

En una realización, el procedimiento también comprende sembrar aleatoriamente células de las cepas celulares en los canales celulares separados y definidos espacialmente en el dispositivo microfluídico. La siembra aleatoria de células se realiza preferentemente de modo que cada canal celular solo comprenda células de un mismo genotipo, es decir, de la misma cepa celular.

Una ventaja de las realizaciones es que la identidad genética, es decir, el genotipo, de las células no necesita

determinarse y conocerse antes de la siembra de las células en el dispositivo microfluídico. Por lo tanto, no es necesario mantener las células en la biblioteca celular ordenadas antes de la siembra en términos de presentar que conocer la identidad genética de cada cepa celular y monitorear continuamente la posición de cada genotipo a lo largo del procedimiento. Esto significa que la presente realización, en claro contraste, primero analiza las características  
5 fenotípicas en paralelo sin ningún conocimiento del genotipo y a continuación determina los genotipos y los conecta con las características fenotípicas.

La característica fenotípica determinada para cada cepa celular en la biblioteca es preferentemente una característica fenotípica correspondiente a cada genotipo en la biblioteca. Por lo tanto, las células en la biblioteca son células  
10 genéticamente diferentes que presentan un genotipo diferente, es decir, un genotipo respectivo por cepa celular. Las diferencias en el genotipo implican que las células tendrán diferentes características fenotípicas correspondientes a cada genotipo respectivo.

En una realización, las características fenotípicas de las células se determinan usando microscopía. La microscopía  
15 para monitorear y determinar fenotipos tiene varias ventajas en comparación con las tecnologías de la técnica anterior. Por ejemplo, la microscopía de fluorescencia permite largos intervalos de tiempo de las líneas celulares durante muchas generaciones, sensibilidad de detección de moléculas individuales y la posibilidad de monitorear las respuestas temporales a las condiciones de crecimiento cambiantes de cualquier manera.

Los ejemplos no limitativos, aunque ilustrativos, de las características fenotípicas que se pueden monitorear y determinar según las realizaciones mediante el uso de microscopía incluyen: la morfología celular, los patrones de  
20 expresión espacial y/o temporal de diversas moléculas, tales como el ácido ribonucleico (ARN) o las proteínas, los niveles de metabolitos específicos, los cambios en la vida útil o la tasa de crecimiento, como en respuesta a la adición de diferentes estímulos o agentes físicos o químicos, las variaciones de célula a célula en los niveles de expresión  
25 génica, el desarrollo embrionario, el brillo de proteínas reporteras o aptámeros de ARN, etc.

La caracterización fenotípica de las cepas celulares puede, por lo tanto, realizarse en paralelo bajo un microscopio durante un largo período de tiempo si es necesario. La caracterización fenotípica se realiza además sin conocimiento del genotipo de las diversas cepas celulares en la biblioteca. En claro contraste, la caracterización fenotípica determina  
30 las características fenotípicas respectivas para cada canal celular separado y definido espacialmente en el dispositivo microfluídico. Por ejemplo, se supone que la característica fenotípica relevante que se determinará para las cepas celulares es la expresión génica de un gen diana para una proteína reportera de fluorescencia, con una región reguladora génica variable o secuencia de codificación, después de la adición de un agente de prueba. En tal caso, el microscopio se puede usar para tomar una imagen sobre el dispositivo microfluídico donde se pueden determinar  
35 visualmente los respectivos niveles de expresión génica. Cada nivel de expresión génica individual puede cuantificarse para obtener un valor respectivo para cada canal celular en el dispositivo microfluídico. Por lo tanto, el resultado de la determinación de la caracterización fenotípica podría ser una lista o matriz de uno o más valores respectivos para cada canal celular en el dispositivo microfluídico. Si a cada canal celular se le asigna un identificador de canal respectivo como se describió anteriormente en esta invención, la característica fenotípica medida para las células en  
40 un canal celular se puede asociar con el identificador de canal asignado a ese canal celular.

En una realización, determinar la característica fenotípica comprende determinar la característica fenotípica de cada cepa celular durante el cultivo de las células en el dispositivo microfluídico usando microscopía. Los ejemplos de tecnologías de microscopía que se pueden usar en las realizaciones incluyen, por ejemplo, la microscopía de campo  
45 brillante, la microscopía de contraste de fase, la microscopía de fluorescencia, la microscopía de lámina de luz o cualquier tipo de modalidad de imagen de súper resolución, tal como la microscopía de reducción de emisión estimulada (STED), la fotomicroscopía de localización activada (PALM), la microscopía óptica de escaneo de campo cercano (NSOM), la microscopía 4Pi, la microscopía de iluminación estructurada (SIM), la microscopía de agotamiento del estado fundamental (GSD), la microscopía de distancia de precisión espectral (SPDM) y la microscopía de  
50 reconstrucción óptica estocástica (STORM)) Además, también se podría utilizar el seguimiento intracelular de partículas individuales (SPT) o la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). El análisis de microscopía se puede hacer en puntos de tiempo fijos o usando imágenes de lapso de tiempo.

También son posibles otras mediciones de los fenotipos, como la medición de propiedades mecánicas mediante  
55 microscopía de fuerza atómica, el potencial de membrana mediante tintes indicadores o micro electrodos, la secreción de moléculas pequeñas mediante espectrometría de masas por imagen o conjuntos de biosensores específicos. También son posibles los detectores de matriz óptica de campo cercano directamente conectados al dispositivo de cultivo.

Una vez que se han determinado las características fenotípicas de las cepas celulares, las células se fijan preferentemente en los canales celulares en el dispositivo microfluídico. La fijación celular se puede realizar según técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el formaldehído, el metanol o el etanol se pueden usar para la

fijación celular. En un ejemplo no limitativo, las células se fijan con formaldehído al 4% durante aproximadamente 15 minutos o paraformaldehído al 3% (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante aproximadamente 30 minutos.

- 5 En una realización, las células fijadas se permeabilizan antes del genotipado *in situ*. Se pueden usar diversos protocolos empleados tradicionalmente para la permeabilización celular según las realizaciones. Por ejemplo, se puede usar Triton X-100 (tal como 0,25% Triton X-100) u otro tensioactivo, tal como un tensioactivo no iónico. Alternativamente, el etanol, como el 70% de etanol, puede usarse para la permeabilización celular. Otros ejemplos incluyen ácido clorhídrico, tal como ácido clorhídrico 0,1 M, opcionalmente combinado con una proteasa, tal como
- 10 pepsina, por ejemplo, pepsina al 0,01%, o lisozima para degradar la pared celular bacteriana.

El genotipado *in situ* comprende el genotipado *in situ* de al menos una parte de una región variable de cada cepa celular en los canales celulares en el dispositivo microfluídico. Por lo tanto, no es absolutamente necesario genotipar *in situ* la región variable completa de cada cepa celular. Por lo tanto, la secuenciación *in situ*, como se usa en esta

15 invención, comprende la secuenciación *in situ* de al menos una parte de la región variable o, de hecho, la región variable completa. La secuenciación *in situ* preferentemente genera información que muestra cualquier diferencia de nucleótidos en la región variable entre diferentes cepas celulares y dónde estas diferencias de nucleótidos dan lugar a diferentes fenotipos.

20 En una realización, el genotipado *in situ* se basa en la tecnología de secuenciación *in situ* fluorescente (FISSEQ) como se describe, por ejemplo, en Science, 2014, 343(6177): 1360-1363. Brevemente, en FISSEQ, se generan amplicones de ADNc dentro de la célula, en las células fijas, usando transcriptasa inversa e incorporación de 5-trifosfato de aminoalil desoxiuridina (dUTP) durante la transcripción inversa (RT). El ADNc se vuelve a fijar usando BS (PEG) 9, un conector reactivo con amina con un espaciador de 4 nm. Los fragmentos de ADNc se circulan a continuación antes

25 de la amplificación del círculo rodante (RCA). A continuación, se usa la BA(PEG)9 para entrecruzar los amplicones RCA que contienen aminoalil dUTP. La secuenciación SOLID por ligadura se puede utilizar entonces para secuenciar la secuencia relevante en los amplicones RCA para obtener la secuencia de nucleótidos de la región variable.

En una realización, el genotipado *in situ* de la región variable comprende preferentemente la secuenciación *in situ* por

30 ligadura de la región variable o al menos una porción de la misma en los canales celulares en el dispositivo microfluídico. La secuenciación mediante ligadura se basa en la sensibilidad de la ligasa de ácido desoxirribonucleico (ADN) para los emparejamientos erróneos de pares de bases. Generalmente, la región variable a secuenciar está preferentemente en forma de una secuencia de ADN monocatenario, flanqueada en al menos un extremo por una secuencia conocida que funcionará como secuencia de unión de cebador de anclaje. Un cebador de anclaje que es

35 complementario a la secuencia conocida se une a la secuencia conocida.

A continuación, se introduce un conjunto mixto de oligonucleótidos de sonda, típicamente de ocho a nueve bases de largo, etiquetados, típicamente con un colorante fluorescente, según la posición que se secuenciará. Estos oligonucleótidos marcados se hibridan con la región variable, junto al cebador de anclaje y la ADN ligasa se une

40 preferentemente a un oligonucleótido al cebador de anclaje cuando su secuencia de nucleótidos coincide con la región variable desconocida. En función de la fluorescencia producida por la molécula, se puede inferir la identidad de la base en esta posición de la región variable.

Las sondas de oligonucleótidos también se pueden construir con enlaces escindibles, que se pueden escindir después

45 de identificar el marcador. Esto eliminará la etiqueta y regenerará un 5'-fosfato en el extremo de la sonda ligada, permitiendo así una nueva ronda de ligadura. Este ciclo de ligadura y escisión se puede repetir varias veces para leer secuencias más largas. Esta técnica secuencia cada base  $Q^{th}$  en la región variable, donde Q es la longitud de la sonda que queda después de la escisión. Para secuenciar las posiciones omitidas en la región variable, el cebador de anclaje y los oligonucleótidos ligados pueden despojarse de la región variable, y se inicia otra ronda de secuenciación por

50 ligadura con un cebador de anclaje que es una o más bases más cortas.

Otra técnica es hacer rondas repetidas de una única ligadura donde el marcador corresponde a diferentes posiciones en la sonda, seguido de quitar el cebador de anclaje y la sonda ligada.

55 La secuenciación mediante ligadura puede realizarse en cualquier dirección (5'-3' o 3'-5') dependiendo del extremo de las sondas de oligonucleótidos que está bloqueado por la etiqueta.

En una realización, la secuencia que se secuencia es preferentemente una secuencia de ADNc obtenida por transcripción inversa de una transcripción de ARN obtenida de la región variable. En esta realización, la región variable

60 está flanqueada por al menos una secuencia conocida a la que se unirá el cebador de anclaje.

La secuenciación por ligadura se puede realizar en células fijadas para lograr una secuenciación *in situ* por ligadura



de la región variable o al menos una porción de la misma en los canales celulares en el dispositivo microfluídico, véase, por ejemplo, Science 2014, 343: 1360-1363 y Nature Methods 2013, 10: 857-860. Brevemente, en una variante, el ARN obtenido de la región variable, o un código de barras, se copia al ADNc mediante transcripción inversa, seguido de la degradación de la cadena de ARNm usando una ARNasa. En una primera realización, una sonda de candado se une al ADNc con un espacio entre los extremos de la sonda sobre las bases que están dirigidas a la secuenciación mediante ligadura. Este vacío se llena con la polimerización de ADN y la ligadura de ADN para crear un círculo de ADN. En una segunda realización, la circulación de ADNc se lleva a cabo solo mediante ligadura de ADNss. En una tercera realización, el ADNds que incluye al menos una parte de la secuencia variable y el ADN vecino se elimina del ADN circundante, por ejemplo, mediante enzimas de restricción o transposasas. El ADNds extirpado puede ser digerido a ADNss por endonucleasas para auto-hibridarse y ligarse a fin de formar un ADN circular.

En una variante, la región variable a secuenciar se amplifica directamente a partir de ADNds, ya sea cromosómico o en un elemento genético móvil. En este caso, el ADNds se puede cortar con una enzima de restricción cerca de la región variable y el ADNds se hace monocatenario mediante una exonucleasa. Este ADNss puede amplificarse mediante un procedimiento que normalmente funciona en ADNc, pero sin la necesidad de expresar un ARN. Este procedimiento alivia las limitaciones para diseñar una región de ADN cerca de la región variable. Por ejemplo, la región variable puede rellenarse mediante una reacción de candado de gapfill.

Como alternativa al gapfill, es posible usar una región variable relativamente larga (10-25 pb) e hibridar un conjunto de oligonucleótidos de ADNss a las regiones variables. Las energías de unión de los oligonucleótidos se eligen de modo que solo el oligonucleótido específico se una a la temperatura de hibridación y ligadura elegida. Digamos, por ejemplo, que la biblioteca contiene 4000 variantes codificadas en una región variable de 15 pb que permitiría  $4^{15} \sim 10^9$  variantes, es posible elegir la variante 4000 de manera que no haya sondas de hibridación cruzada. Después de la hibridación del oligonucleótido y la sonda de candado, la sonda se liga en un círculo que puede amplificarse.

En cualquier caso, el círculo de ADN formado se amplifica por amplificación de círculo rodante cebado con objetivo (RCA) generando un producto de círculo rodante (RCP) que se somete a secuenciación por ligadura. Un cebador de anclaje se hibrida junto a la secuencia objetivo antes de la unión de las sondas de oligonucleótidos. En una realización, las sondas de oligonucleótidos consisten en cuatro bibliotecas de 9-meros, con ocho posiciones aleatorias (N) y una posición fija (A, C, G o T). Cada biblioteca está marcada con uno de los cuatro tintes fluorescentes. La sonda de oligonucleótidos con mejor coincidencia en la posición fija se incorporará mediante ligadura junto con su marcador fluorescente. Se toma una imagen de la muestra y cada RCP muestra el color correspondiente a la base coincidente. La sonda de oligonucleótidos se lava antes de la aplicación de sondas de oligonucleótidos para la siguiente base. Los pasos de ligadura, lavado, formación de imágenes y agotamiento se repiten hasta que se haya leído el número deseado de bases.

En otra realización, el genotipado *in situ* comprende la secuenciación *in situ* por síntesis de la región variable o al menos una porción de la misma en los canales celulares en el dispositivo microfluídico.

Por ejemplo, se agregan cuatro tipos de dNTP modificados que contienen un terminador que bloquea la polimerización adicional. El terminador también contiene una etiqueta fluorescente que puede ser detectada por la cámara. Los nucleótidos no incorporados se lavan y se toman imágenes de los nucleótidos marcados con fluorescencia. La etiqueta fluorescente, junto con el terminador, se elimina químicamente del ADN permitiendo el siguiente ciclo de secuenciación.

El resultado del genotipado *in situ* es preferentemente la secuencia de nucleótidos de la región variable o al menos una porción de la misma para cada cepa celular. Además, cada secuencia de nucleótidos está conectada a un canal celular respectivo en el dispositivo microfluídico, tal como mediante el uso de identificadores de canal. Esto es posible ya que el genotipado se realiza como un genotipado *in situ*, como la secuenciación *in situ* por ligadura o síntesis. En esta invención, *in situ* implica que el genotipado se realiza en el sitio o en posición, es decir, en los canales celulares en el dispositivo microfluídico.

La salida del fenotipo descrito anteriormente era una característica fenotípica determinada respectiva para cada canal celular en el dispositivo microfluídico, como en forma de una lista o matriz que enumera las características fenotípicas determinadas para cada canal celular según lo identificado por los identificadores de canal. La salida del genotipado *in situ* es la secuencia de nucleótidos determinada para las regiones variables en cada canal celular en el dispositivo microfluídico. Esta salida también puede presentar la forma de una lista o matriz que enumera la secuencia de nucleótidos determinada para cada canal celular tal como se identifica por los identificadores de canal.

A continuación, cada característica fenotípica respectiva puede conectarse o asociarse a cada genotipo respectivo en función de los canales celulares en el dispositivo microfluídico. Por ejemplo, la característica fenotípica determinada para las células de la cepa celular en el canal celular No. *P* es el resultado del genotipo de las células de esta cepa

celular y este genotipo se obtiene de la secuencia de nucleótidos determinada para el canal celular No. P. Por lo tanto, la conexión del fenotipo y el genotipo se puede lograr simplemente haciendo coincidir las características fenotípicas y los genotipos determinados para cada canal celular en el dispositivo microfluídico.

- 5 En la aplicación descrita anteriormente, el dispositivo microfluídico de las realizaciones se usa para el fenotipo combinado la determinación *in situ* del genotipo de una biblioteca de cepas celulares. El dispositivo microfluídico puede usarse alternativamente para la mera determinación del fenotipo o simplemente para la determinación del genotipo *in situ*.
- 10 Por lo tanto, no es necesario realizar ambas determinaciones, de fenotipos y genotipos *in situ* de las células cargadas en el dispositivo microfluídico.

Por lo tanto, un aspecto de las realizaciones se refiere a un procedimiento para células genotipadas *in situ*. El procedimiento comprende cargar células en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente

- 15 de un dispositivo microfluídico según las realizaciones. El procedimiento también comprende la fijación de las células en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente. El procedimiento comprende además genotipar *in situ* las células en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente.

Otro aspecto de las realizaciones se refiere a un procedimiento para la caracterización fenotípica de células. El procedimiento comprende cargar células en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente de un dispositivo microfluídico según las realizaciones. El procedimiento también comprende hacer crecer o cultivar las células en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente. El procedimiento comprende además el monitoreo en tiempo real de un fenotipo característico de las células en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente.

- 20
- 25 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para caracterizar una biblioteca de una pluralidad de cepas celulares que presentan diferentes regiones variables en al menos una parte del material genético de las cepas celulares. El procedimiento comprende cargar células de las cepas celulares de la biblioteca en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente de un dispositivo microfluídico según las realizaciones. El procedimiento también comprende cultivar o cultivar las células de las cepas celulares en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente. El procedimiento comprende además determinar una característica fenotípica de cada cepa celular en el dispositivo microfluídico, preferentemente monitoreando en tiempo real una característica fenotípica respectiva de las células de las cepas celulares en la pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente. El procedimiento comprende además fijar las células de las cepas celulares en
- 30 los canales celulares separados y definidos espacialmente en el dispositivo microfluídico. El procedimiento comprende además genotipar *in situ* la región variable de cada cepa celular en los canales celulares separados y definidos espacialmente en el dispositivo microfluídico. Finalmente, el procedimiento comprende conectar cada característica fenotípica respectiva a cada genotipo respectivo en función de los canales celulares separados definidos espacialmente en el dispositivo microfluídico, preferentemente en función de los identificadores de canal respectivos
- 35 o las posiciones respectivas de los canales celulares separados y definidos espacialmente en el sustrato del dispositivo microfluídico.
- 40

Las realizaciones descritas anteriormente han de entenderse como unos pocos ejemplos ilustrativos de la presente invención. Resultará evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar diversas modificaciones, combinaciones y cambios en las modalidades sin alejarse del alcance de la presente invención. En particular, pueden combinarse diferentes soluciones parciales en las diferentes realizaciones en otras configuraciones, cuando sea técnicamente posible. El alcance de la presente invención se define, sin embargo, por las reivindicaciones adjuntas.

- 45

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo microfluídico (1) que comprende:
  - 5 un sustrato (10) transparente para formar imágenes y que tiene una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20) que tienen una dimensión para alojar células en monocapa; un primer extremo respectivo (22) de dicha pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20) que está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo (30); y un segundo extremo (24) respectivo de dicha pluralidad de canales celulares (20) separados y definidos
    - 10 espacialmente que está en conexión fluida con un primer extremo (42) de un primer canal de lavado (40) respectivo que presenta un segundo extremo (44) en conexión fluida con un canal de salida de flujo (50), donde dicho canal de salida de flujo (50) está en conexión fluida con un tercer puerto de fluido (51), **caracterizado porque** dicho canal de entrada de flujo (30) tiene un primer extremo (32) en conexión fluida con un primer puerto de fluido (31) y un segundo extremo (34) en conexión fluida con un segundo puerto de fluido (33); y dichos primeros canales de lavado (40) tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar dichas células.
  2. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 1, donde dicho canal de entrada de flujo (30) tiene
    - 20 una dimensión suficientemente grande para permitir que dichas células fluyan a través de dicho canal de flujo (30).
  3. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 1 o 2, donde cada canal celular (20) separado y definido espacialmente de dicha pluralidad de canales celulares (20) separados y definidos espacialmente está
    - 25 flanqueado a lo largo de al menos uno de sus lados longitudinales (26, 28) con un segundo canal de lavado respectivo (60) que presenta un primer extremo (62) en conexión fluida con dicho canal de entrada de flujo (30) y un segundo extremo (64) en conexión fluida con dicho canal de salida de flujo (50), donde dichos segundos canales de lavado (60) tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar tales células.
  4. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho sustrato (10)
    - 30 tiene al menos un canal de referencia (21) dispuesto entre y sustancialmente paralelo a dos canales celulares adyacentes separados y definidos espacialmente (20) de dicha pluralidad de canales celulares separados definidos espacialmente (20); un primer extremo respectivo (23) de dicho al menos un canal de referencia (21) que está en conexión fluida con dicho canal de entrada de flujo (30) y comprende un bloque celular(27) dispuesto para impedir que
      - 35 dichas células entren en dicho al menos un canal de referencia (21) desde ese primer extremo respectivo (23); y un segundo extremo respectivo (25) de dicho al menos un canal de referencia (21) está en conexión fluida con un primer extremo (42) de un primer canal de lavado respectivo (40) que presenta un segundo extremo (44) en conexión fluida con dicho flujo canal de salida (50).
  5. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho sustrato (10)
    - 40 tiene al menos un canal de referencia (21) dispuesto entre y sustancialmente paralelo a dos canales celulares adyacentes separados y definidos espacialmente (20) de dicha pluralidad de canales celulares separados definidos espacialmente (20); un primer extremo respectivo (23) de dicho al menos un canal de referencia (21) que está en conexión fluida con dicho canal de entrada de flujo (30) y comprende una constricción del canal (29) dispuesta para
      - 45 impedir que dichas células entren en dicho al menos un canal de referencia (21) desde ese primer extremo respectivo (23); y un segundo extremo respectivo (25) de dicho al menos un canal de referencia (21) que está en conexión fluida con dicho canal de salida de flujo (50) y comprende una constricción del canal (29) dispuesta para impedir que dichas células entren en dicho al menos un canal de referencia (21) desde ese segundo extremo respectivo (25), y
  6. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde
    - 50 dicho sustrato (10) comprende un identificador de canal respectivo (11) para al menos cada enésimo canal celular separado y definido espacialmente (20) de dicha pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20); y dichos identificadores de canal respectivos (11) son visibles por imagen.
  7. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde
    - 55 dicho sustrato (1) tiene múltiples conjuntos (2A, 2B, 2C, 2D) de dicha pluralidad de canales celulares separados definidos espacialmente (20), múltiples canales de entrada de flujo (30A, 30B, 30C, 30D) y múltiples canales de salida de flujo (50A, 50B, 50C, 50D); dicho primer extremo respectivo (22) de dicha pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente
      - 60 (20) en cada conjunto (2A, 2B, 2C, 2D) de dichos conjuntos múltiples (2A, 2B, 2C, 2D) está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo respectivo (30A, 30B, 30C, 30D) de dichos canales de entrada de flujo múltiple (30A, 30B,

30C, 30D);

dicho segundo extremo respectivo (44) de dichos primeros canales de lavado (40) en cada conjunto (2A, 2B, 2C, 2D) de dichos conjuntos múltiples (2A, 2B, 2C, 2D) está en conexión fluida con un canal de salida de flujo respectivo (50A, 50B, 50C, 50D) de dichos canales de salida de flujo múltiple (50A, 50B, 50C, 50D);

5 un primer extremo respectivo (32A, 32B, 32C, 32D) de cada canal de entrada de flujo (30A, 30B, 30C, 30D) de dichos canales de entrada de flujo múltiple (30A, 30B, 30C, 30D) está en conexión fluida con un primer puerto de fluido respectivo (31A, 31B, 31C, 31D);

un segundo extremo respectivo (34A, 34B, 34C, 34D) de cada canal de entrada de flujo (30A, 30B, 30C, 30D) de dichos canales de entrada de flujo múltiple (30A, 30B, 30C, 30D) está en conexión fluida con un segundo común puerto de fluido (33); y

10 cada canal de salida de flujo (50A, 50B, 50C, 50D) de dichos canales de salida de flujo múltiple (50A, 50B, 50C, 50D) está en conexión fluida con un tercer puerto de fluido común (51).

8. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 7, donde dicho primer extremo respectivo (32A, 32B, 15 32C) de cada canal de entrada de flujo (30A, 30B, 30C) de dichos canales de entrada de flujo múltiple (30A, 30B, 30C) está en conexión fluida con múltiples primeros puertos de fluido respectivos (31A, 31A', 31B, 31B', 31C, 31C'); dicho segundo extremo respectivo (34A, 34B, 34C) de cada canal de entrada de flujo (30A, 30B, 30C) de dichos canales de entrada de flujo múltiple (30A, 30B, 30C) está en conexión fluida con múltiples puertos de fluido comunes múltiples (33A, 33B, 33C).

20

9. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 7 u 8, donde dicho segundo extremo respectivo (34A, 34B, 34C) de cada canal de entrada de flujo (30A, 30B, 30C) de dichos canales de flujo múltiple (30A, 30B, 30C) está en conexión fluida con dicho segundo puerto de fluido común (33A, 33B, 33C) a través de un canal de interconexión respectivo (36A, 36B, 36C), donde cada canal de interconexión respectivo (36A, 36B, 36C) tiene una longitud de canal 25 sustancialmente igual.

10. Un procedimiento para cargar un dispositivo microfluídico (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, siendo que dicho procedimiento comprende:

30 introducir las células (S1) y el medio de cultivo en uno de un primer puerto de fluido (31) y un segundo puerto de fluido (33) de dicho dispositivo microfluídico (1) para permitir que dichas células y medio de cultivo fluyan a través de un canal de entrada de flujo (30) de dicho dispositivo microfluídico (1) y en una pluralidad de canales celulares separados espacialmente (20), donde un primer extremo respectivo (22) de dicha pluralidad de canales celulares separados espacialmente (20) está en conexión fluida con dicho flujo canal de entrada (30) que presenta un primer extremo (32) en conexión fluida con dicho primer puerto de fluido (31) y un segundo extremo (34) en conexión fluida con dicho segundo puerto de fluido (33);

35 hacer salir (S2) las células excesivas a través del otro de dicho primer puerto de fluido (31) y dicho segundo puerto de fluido (33); y

40 hacer salir (S3) el medio de cultivo a través del otro de dicho primer puerto de fluido (31) y dicho segundo puerto de fluido (33) y a través de un tercer puerto (51) en conexión fluida con un canal de salida de flujo (50), donde un segundo extremo respectivo (24) de dicha pluralidad de canales celulares separados espacialmente (20) está en conexión fluida con un primer extremo (42) de un primer canal de lavado respectivo (40) que presenta un segundo extremo (44) en conexión fluida con dicha salida de flujo canal (50), siendo que dichos primeros canales de lavado (40) tienen una dimensión demasiado pequeña como para alojar tales células.

45

11. Un procedimiento para la prueba de susceptibilidad a antibióticos, siendo que dicho procedimiento comprende:

50 cargar células bacterianas en una pluralidad de canales celulares separados espacialmente (20) de un dispositivo microfluídico (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;

exponer células bacterianas en diferentes canales celulares separados espacialmente (20) de dicha pluralidad de canales celulares separados espacialmente (20) a diferentes antibióticos y/o diferentes concentraciones de un antibiótico; y

55 determinar la susceptibilidad a antibióticos de dichas células bacterianas basándose en una característica fenotípica respectiva, preferentemente al menos una de una tasa de crecimiento respectiva, un grado respectivo de compactación nucleóide, un grado respectivo de actividad metabólica y un grado respectivo de integridad de membrana, de dichas células bacterianas en dicha pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20).

60 12. Un procedimiento para el genotipado de células *in situ*, siendo que dicho procedimiento comprende:

cargar células bacterianas en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20)

de un dispositivo microfluídico (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;  
fijar dichas células en dicha pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20); y  
genotipar dichas células *in situ* en dicha pluralidad de esos canales celulares separados definidos  
espacialmente (20).

5

13. Un procedimiento para la caracterización fenotípica de células, siendo que dicho procedimiento  
comprende:

10

cargar células bacterianas en una pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20) de  
un dispositivo microfluídico (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;  
hacer crecer dichas células en dicha pluralidad de canales celulares separados y definidos espacialmente (20);  
y monitorear en tiempo real un fenotipo característico de dichas células en dicha pluralidad de canales celulares  
separados y definidos espacialmente (20).

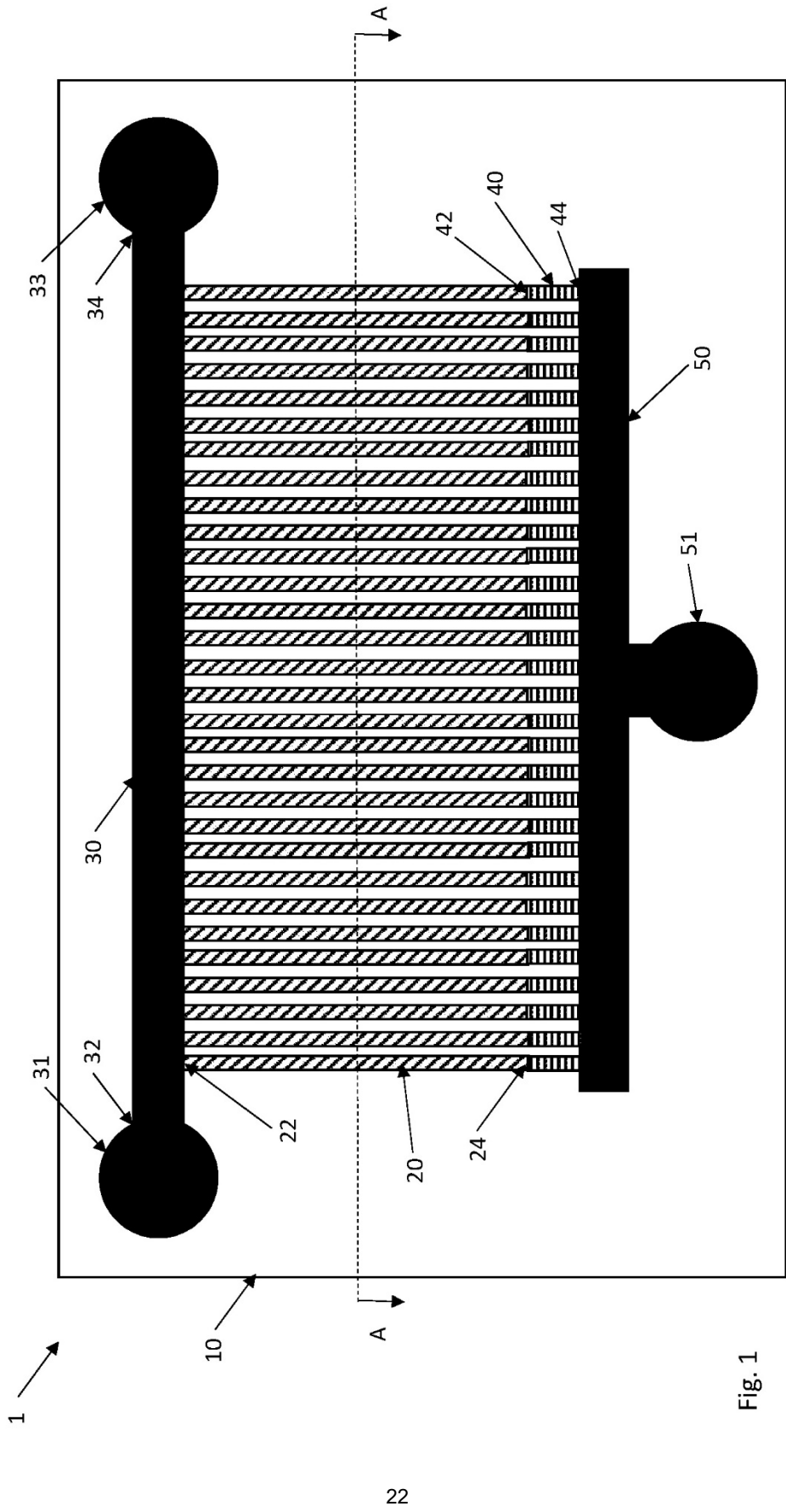


Fig. 1

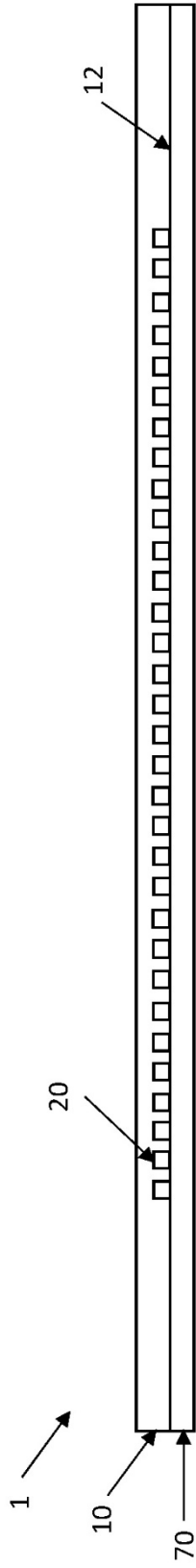


Fig. 2

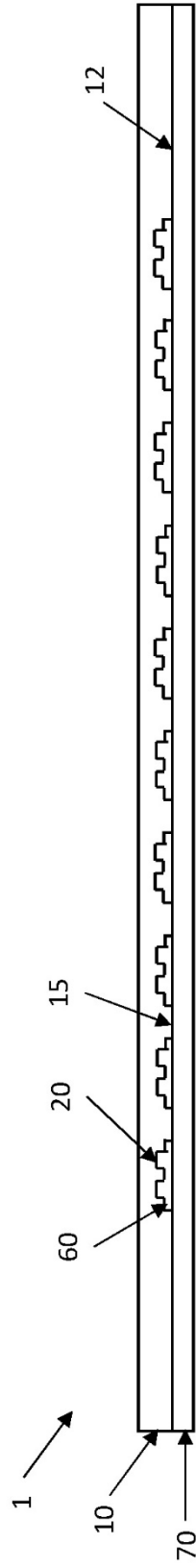


Fig. 4

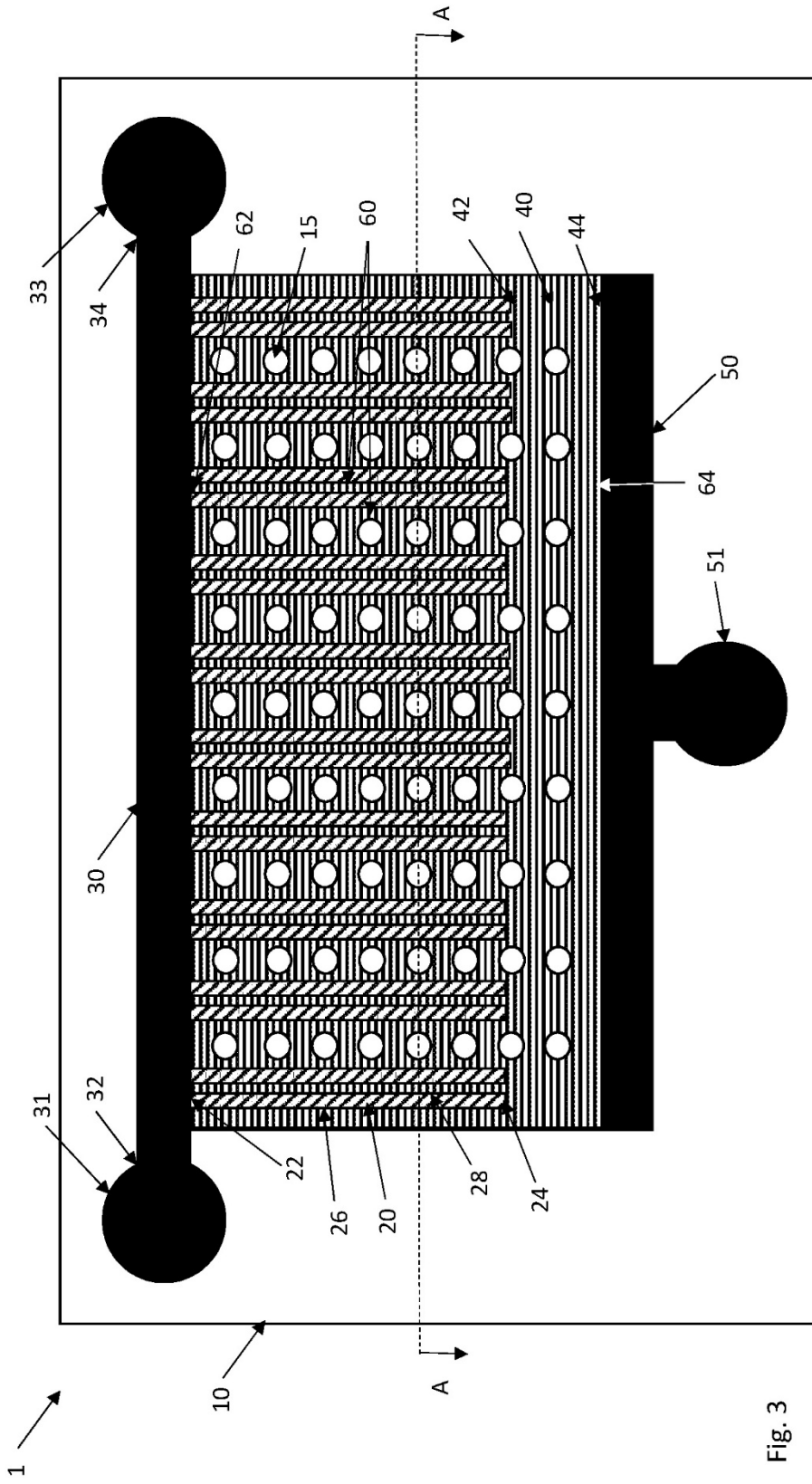


Fig. 3



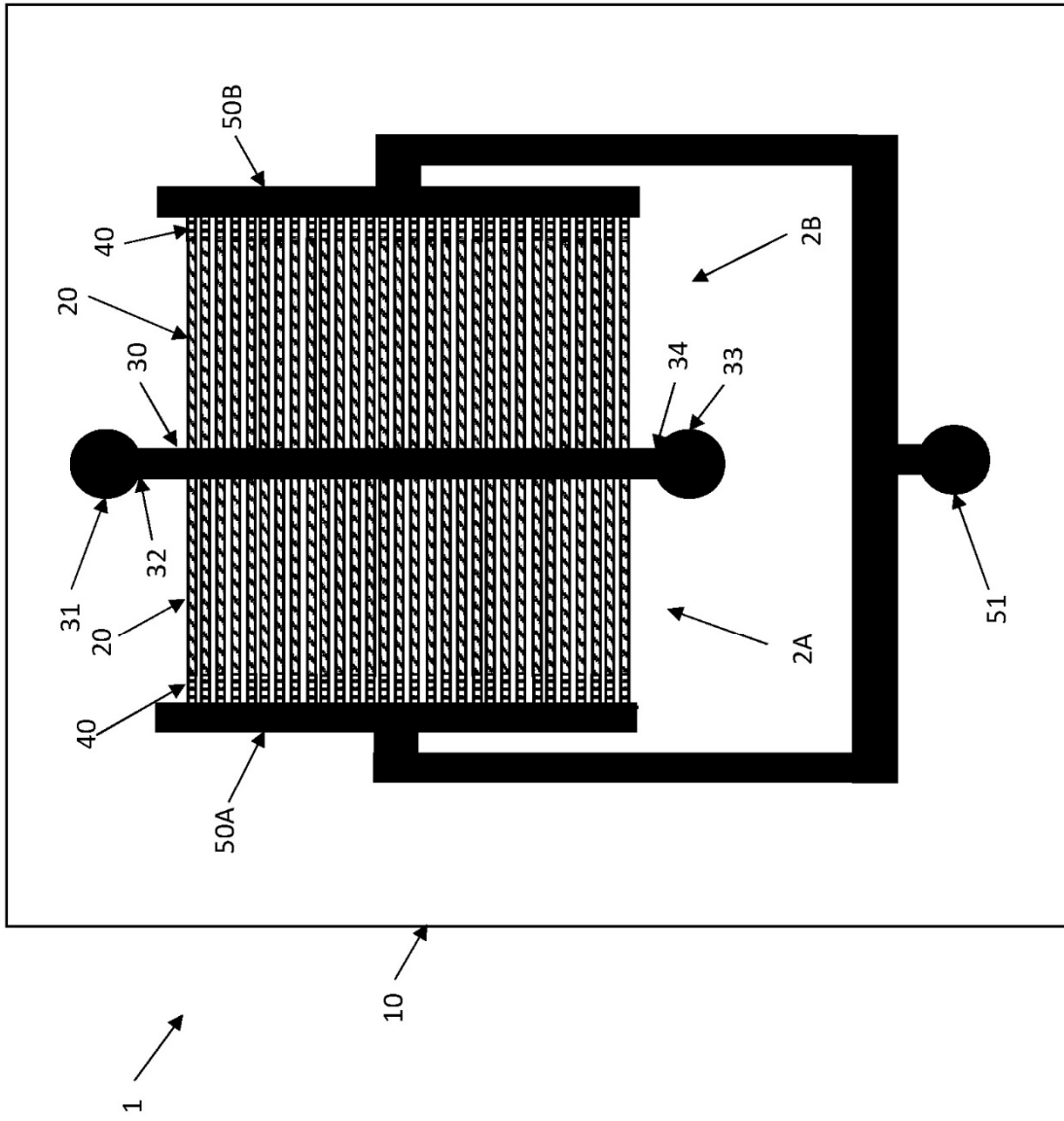


Fig. 5

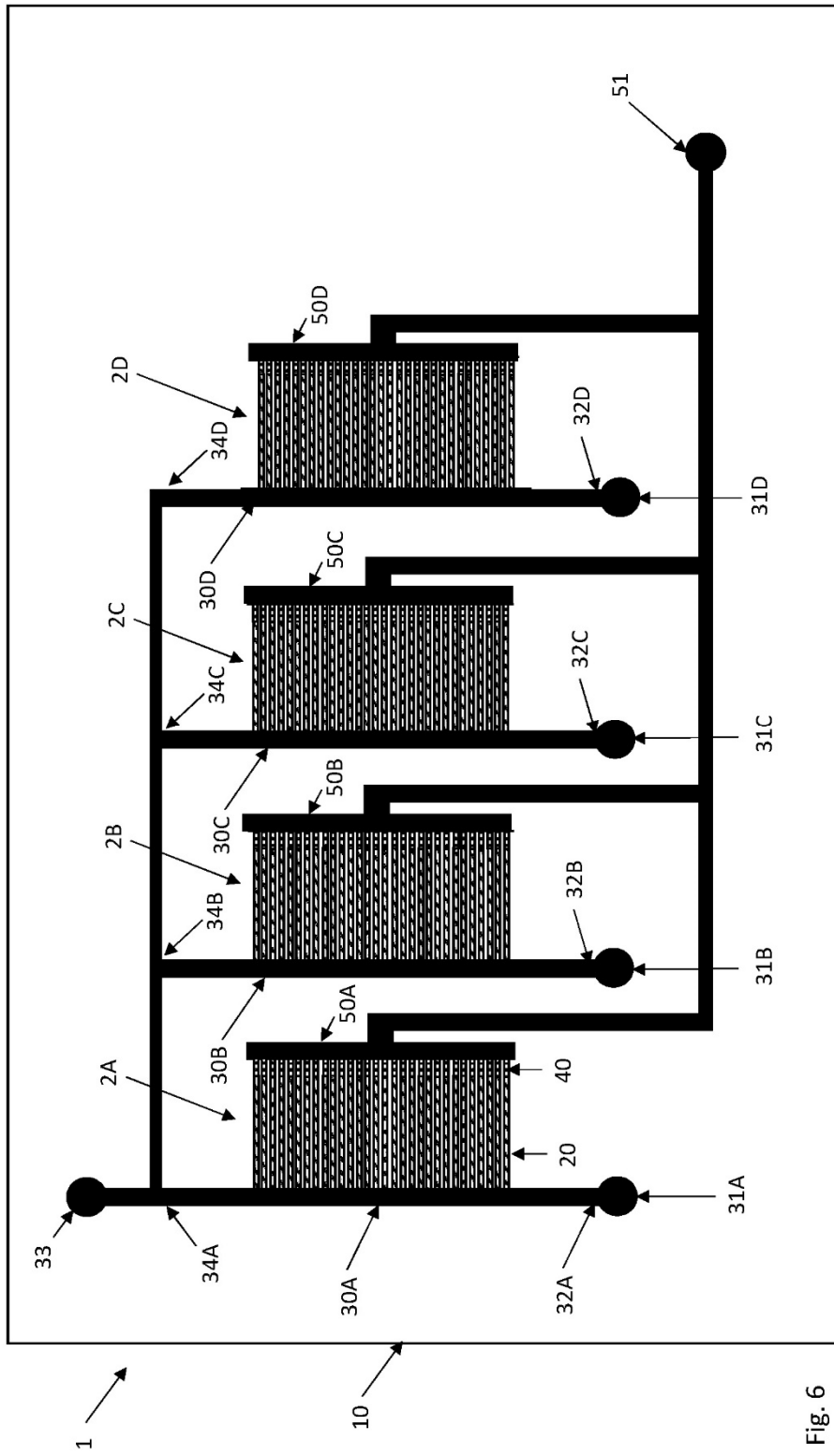


Fig. 6

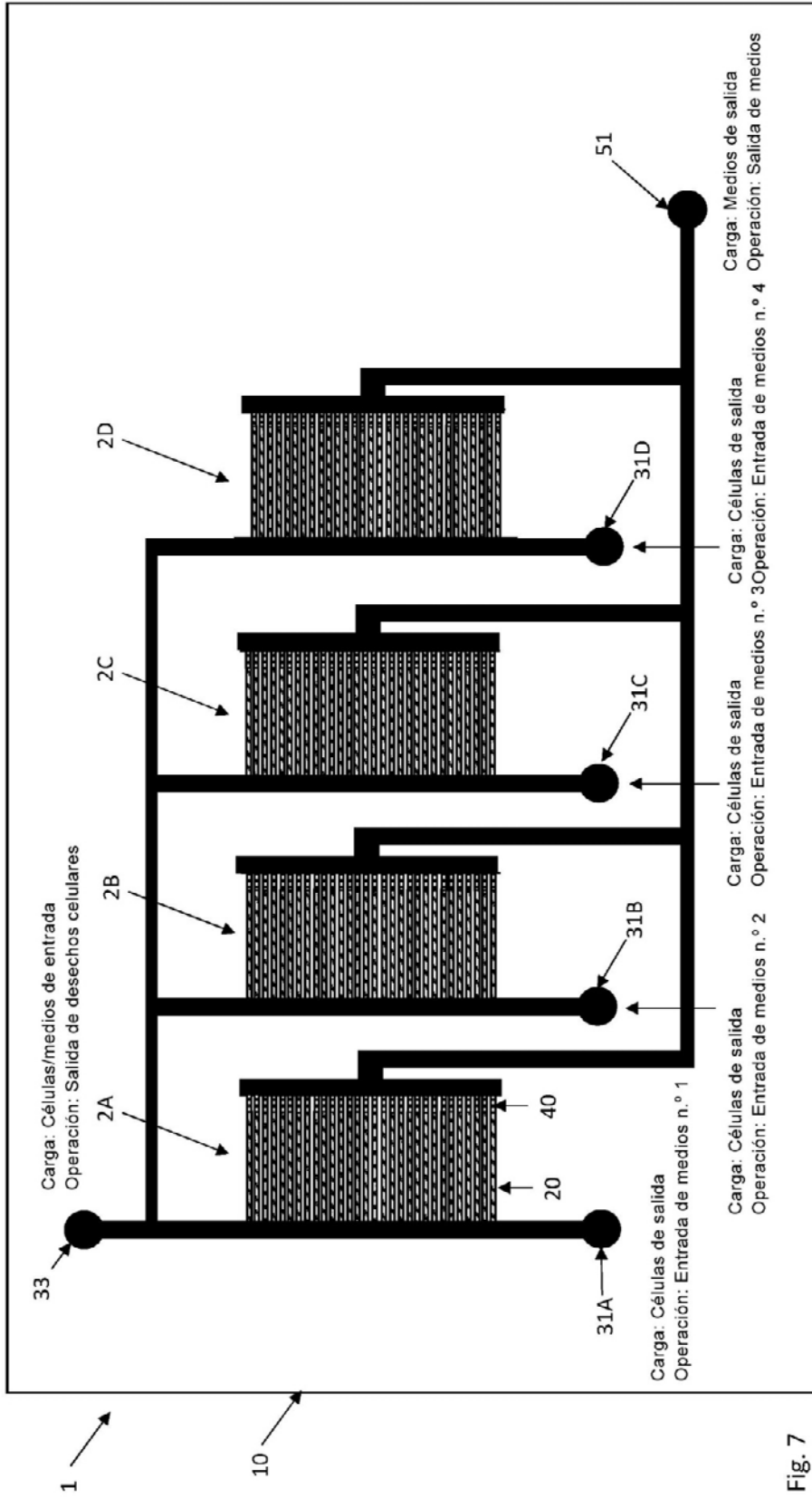


Fig. 7

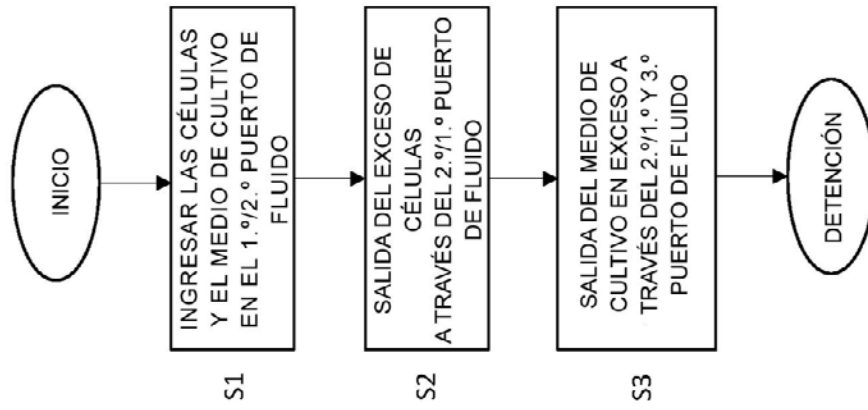


Fig. 16

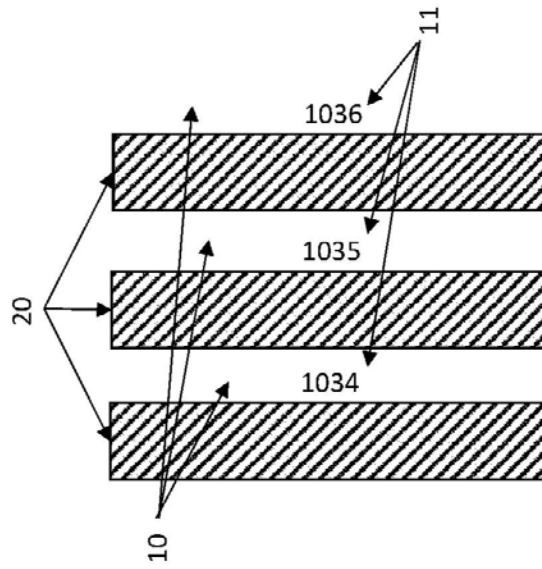


Fig. 9

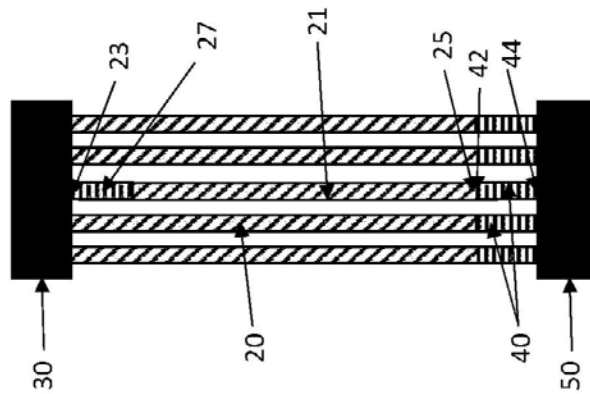


Fig. 8

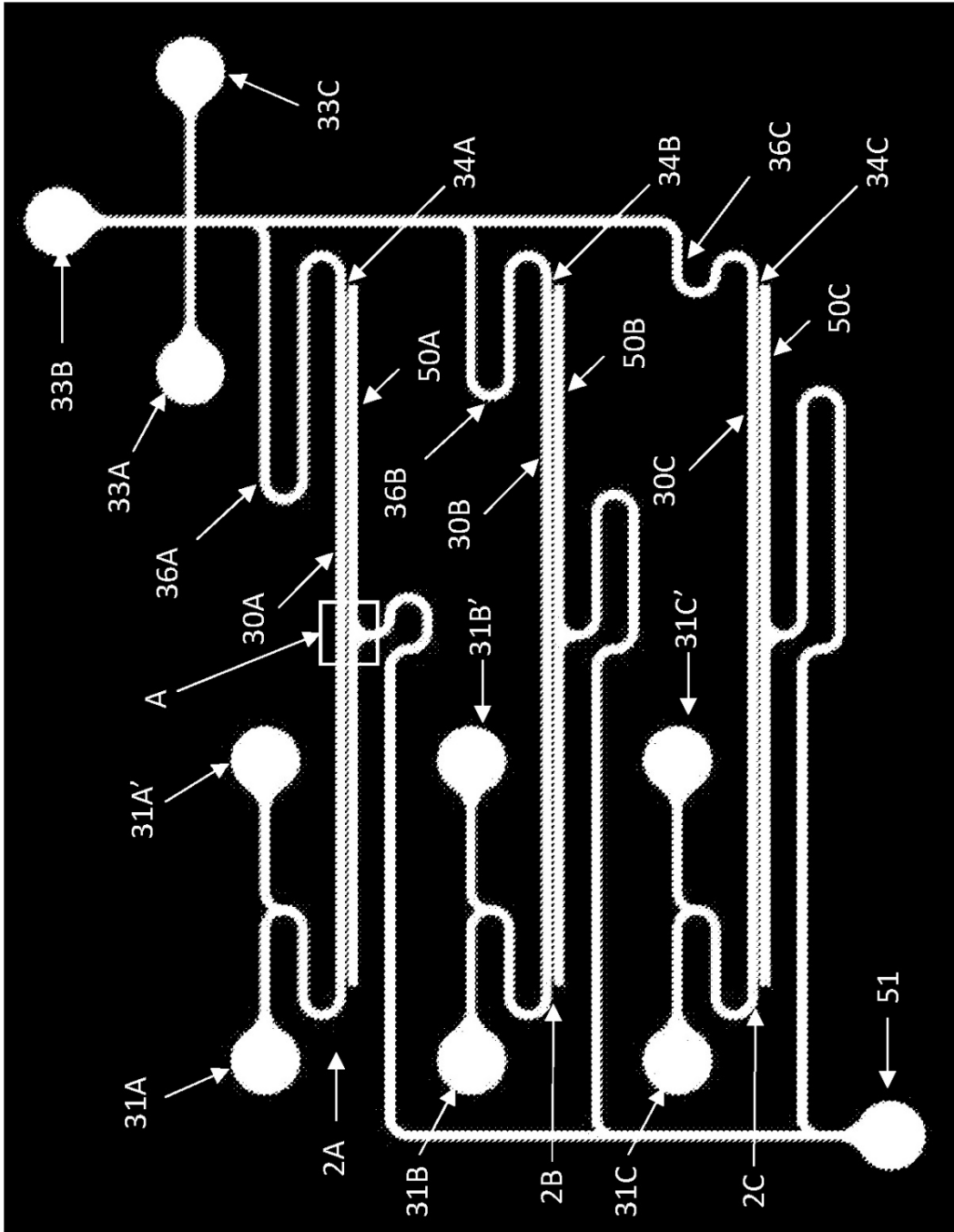


Fig. 10

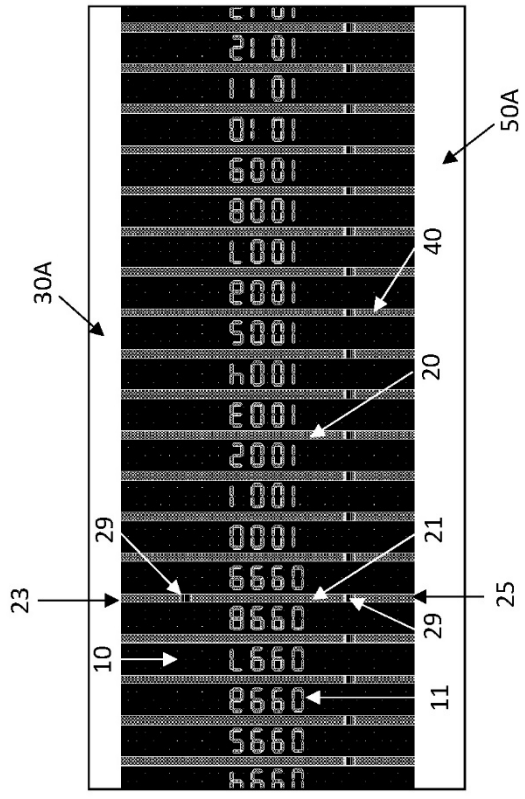


Fig. 12

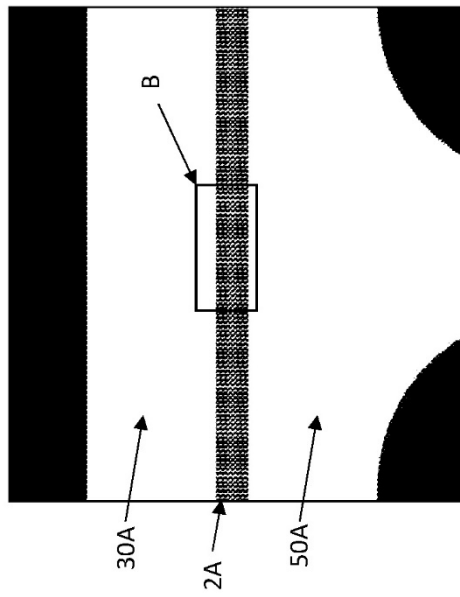


Fig. 11

Microscopio electrónico de barrido - imagen del molde

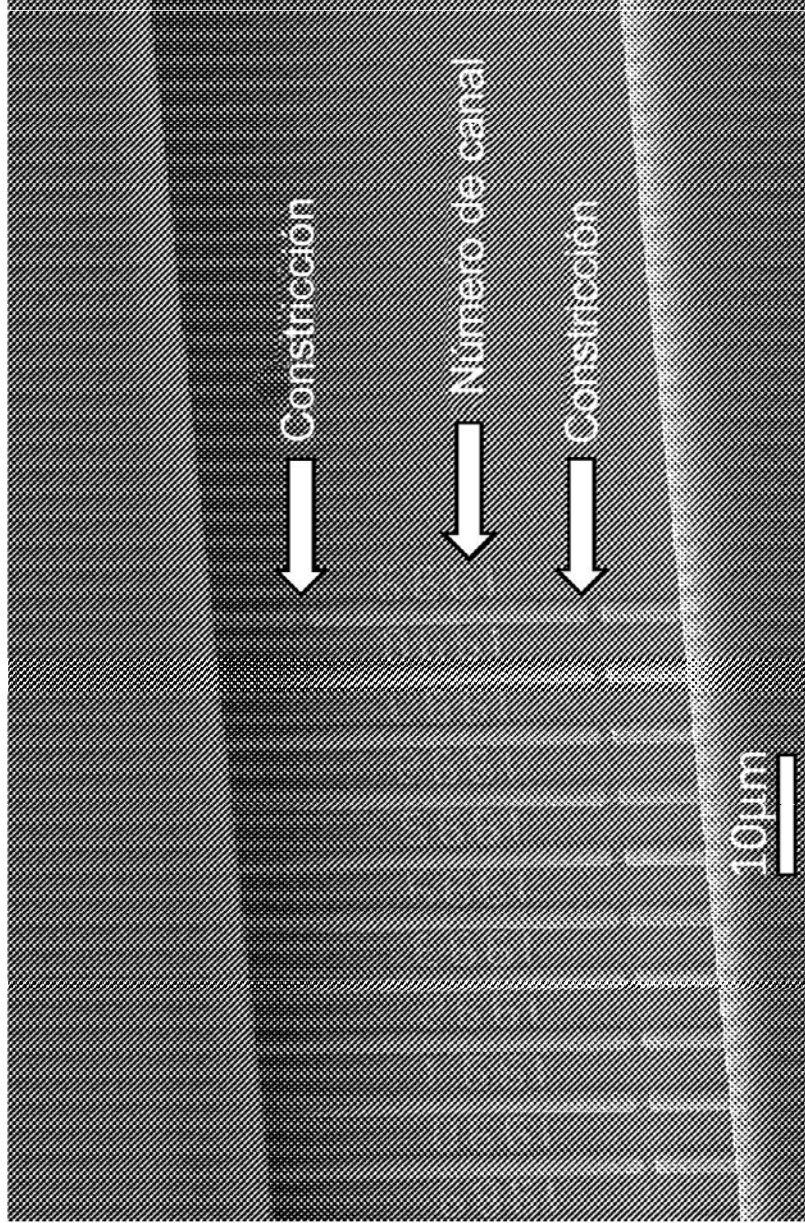


Fig. 13

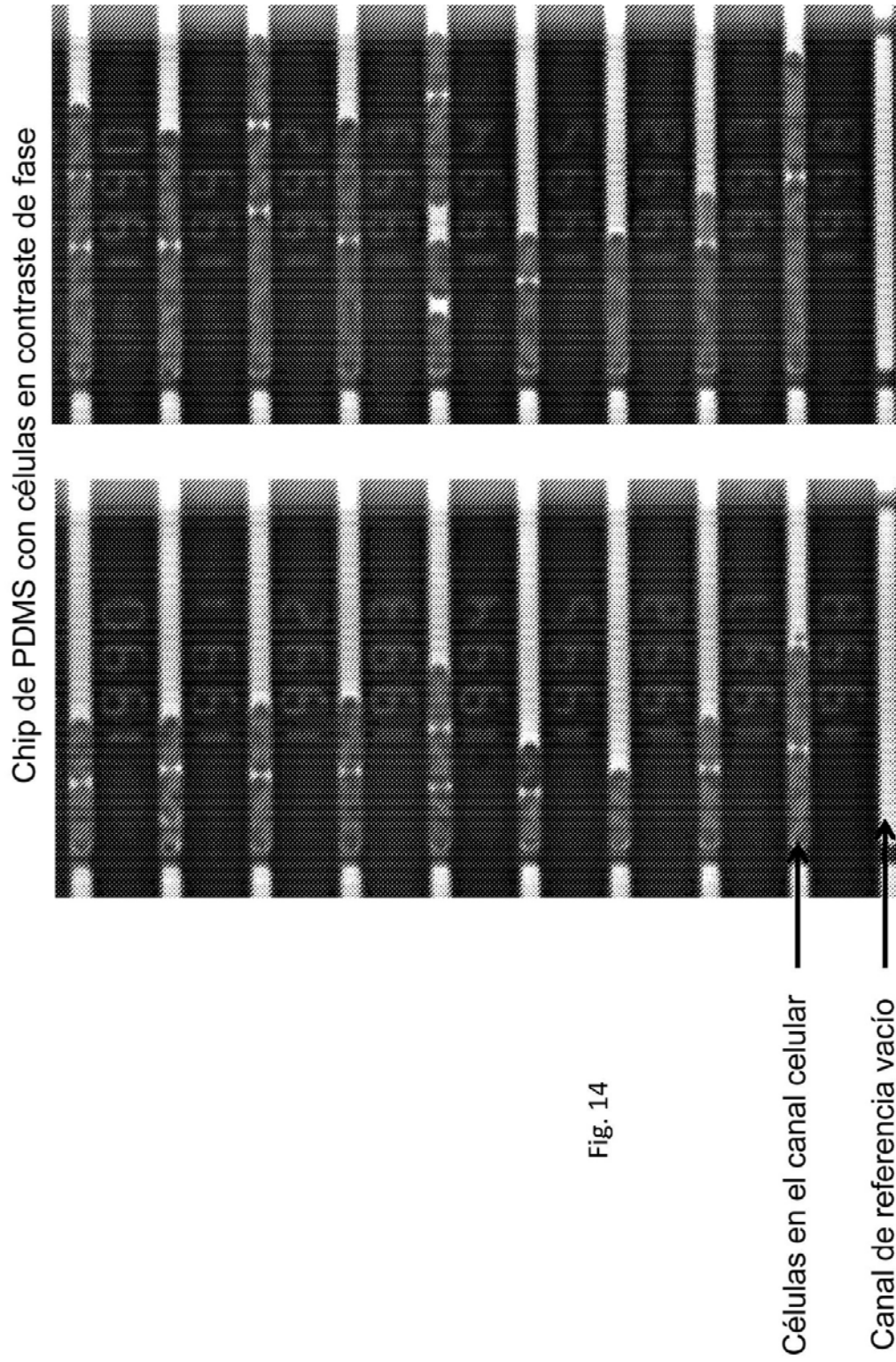


Fig. 14



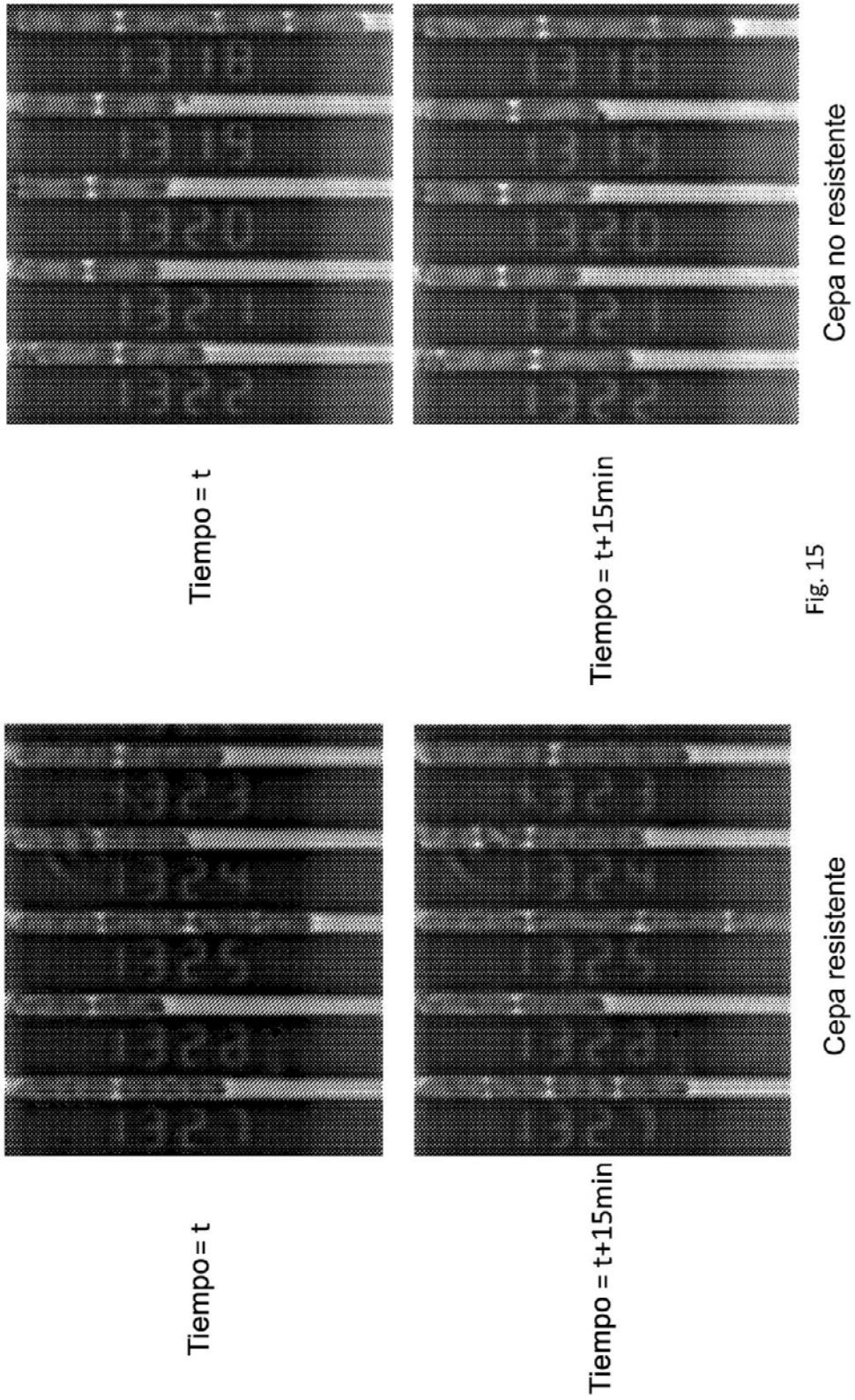


Fig. 15

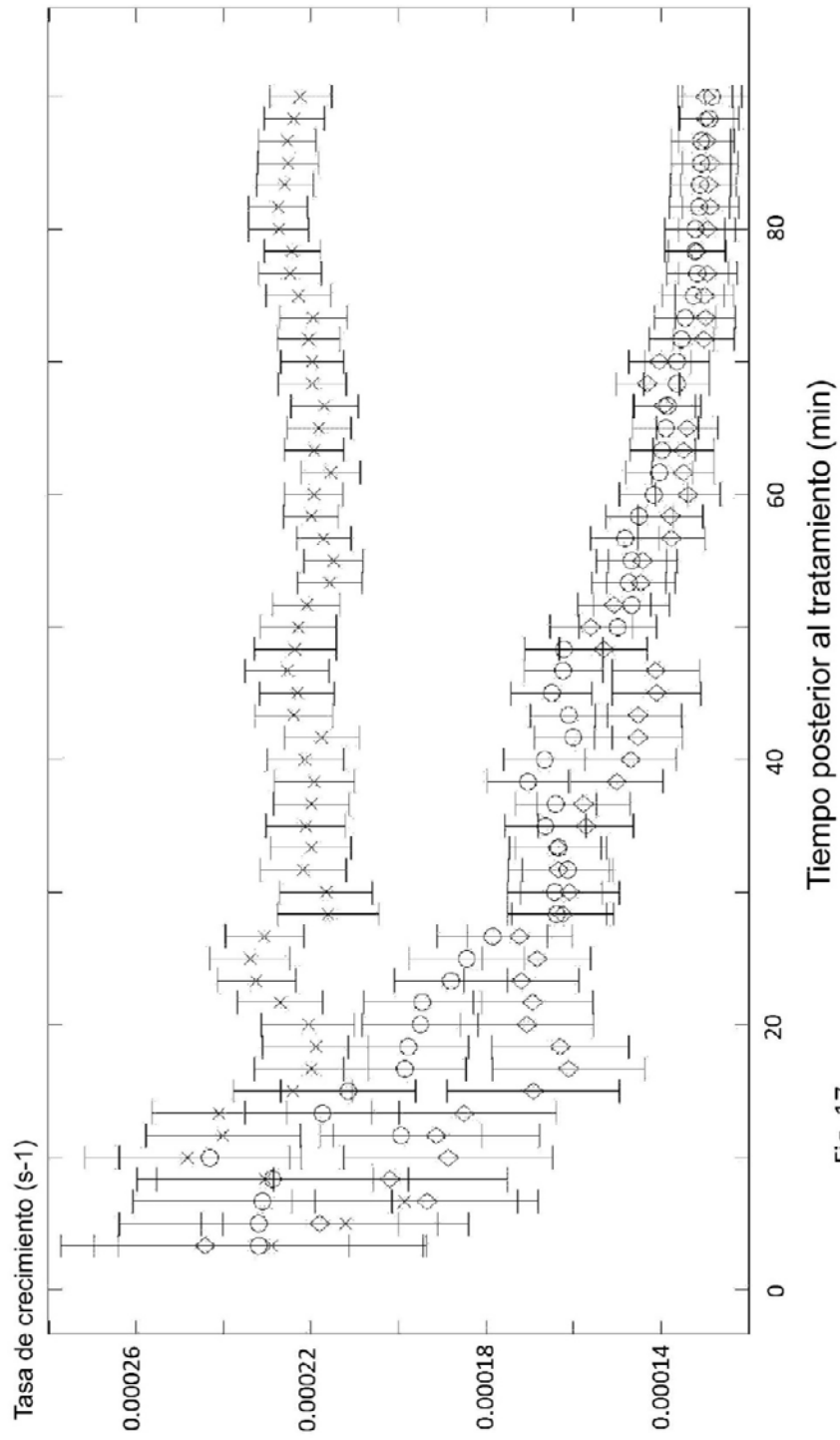


Fig. 17

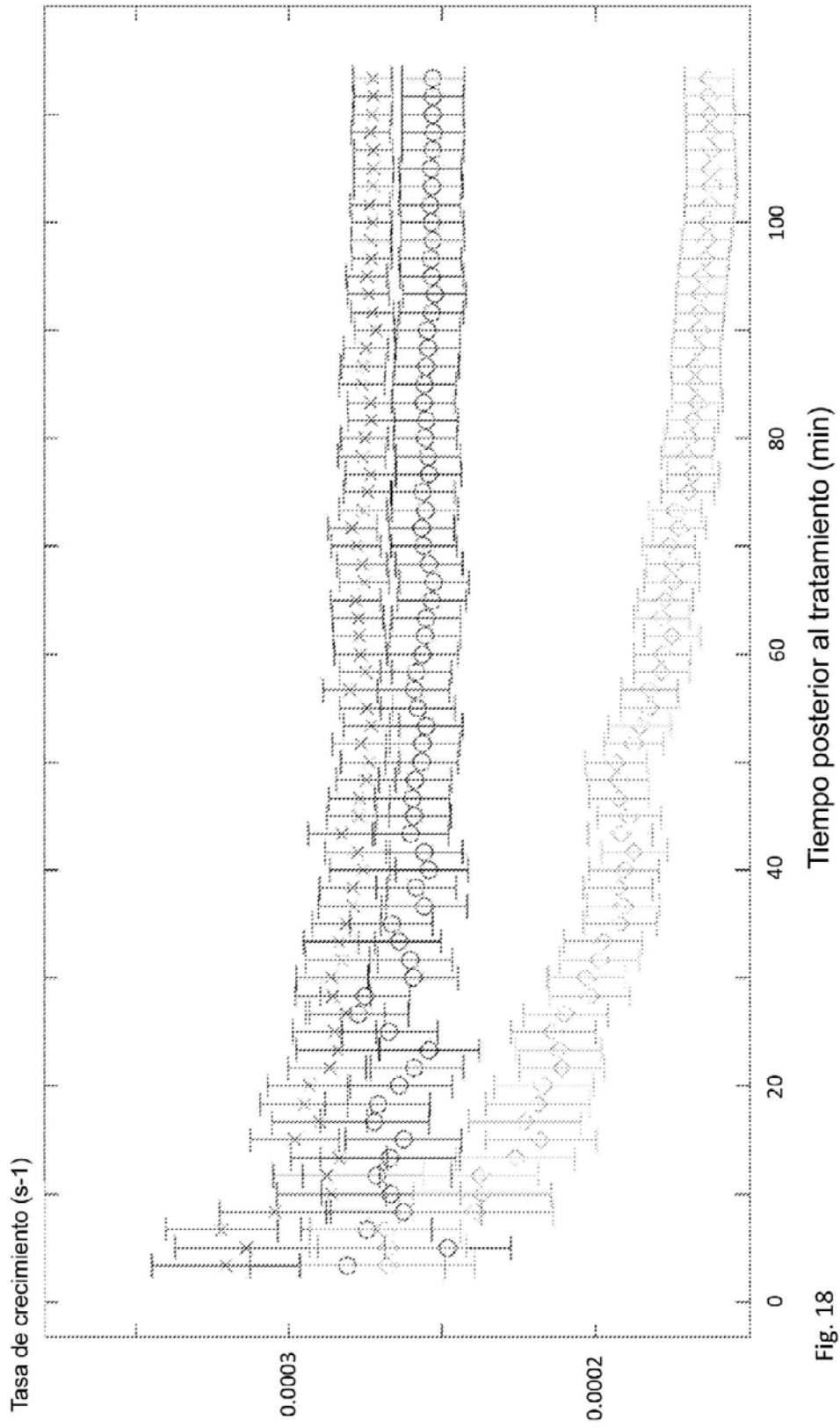


Fig. 18