

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 991**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2015 PCT/IB2015/058034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16063199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2015 E 15807695 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3209790**

54 Título: **Dispositivo microfluídico, sistema y procedimiento para el estudio de organismos**

30 Prioridad:
20.10.2014 WO PCT/IB2014/065472

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

73 Titular/es:
**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)
EPFL-TTO, EPFL Innovation Park J
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:
**CORNAGLIA, MATTEO;
GIJS, MARTIN y
MIGLIOZZI, DANIEL**

74 Agente/Representante:
LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 795 991 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, sistema y procedimiento para el estudio de organismos

5 **Campo técnico**

La presente invención se basa en el campo de los sistemas microfluídicos. En particular, la presente invención describe procedimientos que usan un dispositivo microfluídico para la selección basada en el tamaño de objetos de muestra tales como organismos pequeños, así como sistemas para el cultivo y estudio de características fenotípicas/conductuales de dichos organismos y/o para el cribado de fármacos.

Antecedentes de la técnica

Mejorar la salud humana y evaluar el estado de salud es hoy en día un tema completamente multidisciplinario, que involucra muchas disciplinas y campos de investigación, desde la medicina y la biología, hasta la física, la química y la ingeniería. En el núcleo de los principales problemas relacionados con la salud humana, aún reside la falta de una comprensión global de la fisiología de organismos completos, debido a una complejidad extrema que es muy difícil de comprender sin técnicas analíticas integradas y de múltiples parámetros. Se hacen muchos esfuerzos constantemente para profundizar progresivamente en los secretos de la biología humana para tratar mejor las enfermedades. Obviamente, no hay posibilidad de realizar esta investigación directamente en humanos en su conjunto. Por lo tanto, los investigadores basan principalmente su trabajo en estudios realizados en células y tejidos, que sin embargo no pueden preservar la información completa sobre el organismo completo del que proceden. Por tanto, cuando esta información es absolutamente necesaria, los científicos deben abordar el análisis de organismos completos tales como ratones, ratas, cerdos, monos, etc., que representan los llamados "organismos modelo" para investigar los diferentes aspectos de la salud humana. Sin embargo, este enfoque origina bastantes preocupaciones éticas inevitables y, desde un punto de vista práctico, plantea varios otros problemas en términos de tiempo y coste de los análisis. Estos estudios, de hecho, no pueden involucrar una gran cantidad de muestras y, por lo tanto, generalmente no son adecuados para análisis de alto rendimiento, que sin embargo son cada vez más cruciales para el sector de la salud.

Por todas estas razones, en los últimos años, los llamados "organismos modelo pequeños" están ganando especial atención en el campo, ya que permiten eludir la mayoría de estos problemas. Los análisis en animales pequeños tales como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* o *Xenopus laevis* mantienen de hecho una gran cantidad de información biológica sobre la organización de un organismo completo, evitando así el tiempo, el coste y los problemas éticos. Sin embargo, el pequeño tamaño de estos animales complica considerablemente estos análisis, especialmente cuando solo están disponibles las técnicas de recogida y colocación manual tradicional y otras técnicas de manipulación, que carecen de los estándares de reproducibilidad y rendimiento requeridos para fines de comercialización. Sin embargo, las soluciones microfabricadas definitivamente pueden resolver este último problema, ya que permiten operar directamente en la misma escala de longitud de los organismos bajo prueba, allanando el camino hacia un control absoluto sobre los protocolos y los análisis de alto rendimiento requeridos por este campo.

Los primeros "chips de gusanos" microfluídicos utilizados para la manipulación e imágenes in vivo de *C. elegans* aparecieron por primera vez en 2007. Chronis y col. (Nat. Methods 4, 727-731, doi: 10.1038/nmeth1075, 2007) introdujeron los llamados dispositivos "olfativos" y de "comportamiento", capaces de atrapar gusanos individuales y controlar su actividad neuronal y conductual. Estos dispositivos fueron fabricados en polidimetilsiloxano (PDMS) y su parte constitutiva principal estaba representada por "trampas de gusanos", optimizadas en tamaño para albergar gusanos adultos jóvenes (aproximadamente 1 mm de largo y 70 μ m de diámetro), y caracterizados por un extremo cónico para bloquear el gusano, mientras seguía permitiendo el análisis de sus patrones de locomoción en la sección más amplia del canal microfluídico. El grupo de Yanik (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 104, 13891-13895, 2007) introdujo entonces "clasificadores microfluídicos de alta velocidad", para inmovilizar *C. elegans* individuales para el cribado de características fenotípicas a resolución subcelular en animales fisiológicamente activos. Estos dispositivos microfluídicos se basaban en capas de flujo y control separadas, hechas de polímeros flexibles. Los microcanales se usaron como una capa de flujo, para administrar reactivos y manipular gusanos, mientras que la capa de control consistía en un segundo conjunto de microcanales construidos sobre la capa de flujo. Cuando se presuriza, los canales de la capa de control proporcionan una función de válvula mediante la desviación de una membrana hacia el canal de flujo, usado para bloquear o redirigir el flujo. En cambio, el grupo de Whitesides ha desarrollado un dispositivo microfluídico de "pinza de gusano" (Lab Chip 7, 1515-1523, doi: 10.1039/b707861g, 2007), con el objetivo de agrupar e inmovilizar *C. elegans*. Este sistema consistía en una matriz basada en PDMS de canales microfluídicos gradualmente cónicos, con una anchura que varía de 100 μ m a 10 μ m, más de 5 mm de longitud. Todos estos microcanales se fusionaron en una entrada común en un lado y una salida común en el otro lado. Cuando los animales fueron introducidos en la red de microcanales, fueron empujados al final de los canales cónicos, donde se atascaron. Además, casi todos los gusanos atrapados podían extraerse eventualmente de las pinzas invirtiendo la dirección de flujo dentro del dispositivo. En otro estudio (Lab Chip 10, 589-597, doi: 10.1039/b919265d, 2010), a continuación, el mismo grupo agregó cámaras de confinamiento circulares a cada rama de la matriz microfluídica descrita anteriormente. En este chip, los gusanos podían cultivarse en las diferentes cámaras e inmovilizarse para obtener imágenes en la fase adulta mediante succión en las pinzas de gusanos. Cada línea de la matriz podía abordarse selectivamente usando válvulas de tornillo prefabricadas. Para demostrar la idoneidad de este dispositivo para realizar

estudios/mediciones longitudinales, se cargaron gusanos individuales por succión en la cuarta fase larval en cada cámara de confinamiento y se investigaron durante su vida útil. También se demostró la aplicabilidad de dispositivos microfluídicos basados en gotas para crear y detectar una matriz de gotas que contienen *C. elegans*. Clausell-Tormos y col. (Chem. Biol. 15, 875-875, doi: 10.1016/j.chembiol.2008.08.004, 2008) lograron encapsular los huevos de *C. elegans*, junto con la bacteria *E. coli* como alimento para animales, dentro de 660 nL de tapones acuosos. Este sistema se ha empleado a continuación para controlar las larvas después de la eclosión del huevo, durante las diversas fases de su desarrollo. Si bien, por un lado, este sistema basado en gotas es relativamente simple de diseñar y no requiere una arquitectura microfluídica compleja, por otro lado, carece de flexibilidad, ya que no puede aislar a las madres de su propia progenie. En otro trabajo, Shi y col. (Lab Chip 8, 1432-1435, doi:10.1039/b808753a, 2008) diseñó un dispositivo microfluídico para la encapsulación de gusanos en gotas aisladas y la posterior inmovilización de gotas en una matriz trampa. Este dispositivo microfluídico consistía en un generador de gotas de unión en T combinado con un microcanal serpentino, cortocircuitado en cada rama por una cavidad para atrapar las gotas. Las diferentes resistencias fluidicas de la vía de flujo principal y la vía de flujo en cortocircuito a base de cavidades aseguraron una captura de gotas eficiente, mientras que alrededor del 60 % de las gotas atrapadas contenían un solo gusano. El grupo de Lu (Lab Chip 10, 1862-1868, 2010) presentó un procedimiento para la inmovilización reversible y la obtención de imágenes por lapso de tiempo desde la fase L1 hasta la edad adulta, de gusanos que se cultivaron dentro de un chip microfluídico. Su dispositivo microfluídico PDMS consistía en capas de flujo y control separadas. La red de flujo presentaba cámaras de cultivo, aisladas por válvulas de entrada y salida, para retener y cultivar selectivamente los gusanos dentro del chip. La capa de control del dispositivo comprendía en cambio los circuitos neumáticos para el control de la válvula y una segunda serie de canales para hacer fluir una solución precalentada en la parte superior de la capa de flujo, para controlar con precisión su temperatura. El copolímero de bloque Pluronic F127 se inyectó en las cámaras de cultivo para la inmovilización selectiva de los gusanos por gelificación dependiente de la temperatura del Pluronic.

Wen H. y col., BIOMEDICAL MICRODEVICES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 14, n.º 4, 24 de abril de 2012, páginas 721-728 describe un dispositivo microfluídico para el estudio de características fenotípicas o conductuales de organismos de muestra (es decir, nematodos como *C. Elegans*), y para otras aplicaciones tales como, por ejemplo, el cribado de compuestos químicos/biológicos que tienen una actividad biológica.

J. Jung y col. MICRO-NANOMECHATRONICS AND HUMAN SCIENCE (MHS), 2012 INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON, IEEE, 4 de noviembre de 2012, páginas 262-267 describe un dispositivo microfluídico para el estudio de características fenotípicas o conductuales de organismos de muestra (*C. Elegans*), y para otras aplicaciones tales como, por ejemplo, el cribado de compuestos químicos/biológicos que tienen una actividad biológica. Jung también describe un procedimiento correspondiente para cultivar y analizar los gusanos usando este dispositivo, incluyendo el cribado de compuestos activos (por ejemplo, cadmio). Sin embargo, no se menciona ni queda implícito que los organismos de muestra al aplicar una presión al menos a un depósito de modo que solo el medio de cultivo fluido pueda pasar a través de los filtros de válvula desde al menos un depósito de entrada a todos los elementos del dispositivo estén en conexión fluidica entre ellos.

J. Jung y col. INTELLIGENT ROBOTS AND SYSTEMS (IROS), 2012 IEEE/RSJ INTERNATIONAL CONFERENCE ON, IEEE, 7 de octubre de 2012, páginas 932-937 describe también un dispositivo microfluídico para el estudio de características fenotípicas o conductuales de organismos de muestra (*C. Elegans*), y para otras aplicaciones tales como, por ejemplo, el cribado de compuestos químicos/biológicos que tienen una actividad biológica. También se describen los procedimientos correspondientes en los que se estudia la influencia del cadmio.

Se han descrito muchos otros dispositivos microfluídicos en la técnica relacionada, tales como los de Casadevall i Solvas y col., (Chem. Commun., 2011, 47, 9801-9803), Carr y col. (Lab Chip. 21 de julio de 2011; 11(14): 2385-2396), Ghorashian y col. (PLoS One. 17 de septiembre de 2013; 8(9):e74480), documentos CN102669058, CN102972351, CN103461279, IN201100640, US8702939, US20130118411, WO 2009039284, US20100263599 y WO 2009021232.

A pesar de todos los logros antes mencionados en el campo, todavía falta un procedimiento simple, robusto y estandarizado para estudios rápidos y de alto rendimiento en nematodos de *C. elegans*. La mayoría de los dispositivos microfluídicos existentes, de hecho, se basan en diseños complicados (por ejemplo, capas de control presurizadas) y en protocolos microfluídicos engorrosos, que les impidieron alcanzar los estándares de confiabilidad y rendimiento requeridos para su comercialización.

Resumen de la invención

La presente invención describe procedimientos que usan dispositivos microfluídicos, así como sistemas, útiles para el estudio de características fenotípicas o conductuales de organismos de muestra, y para otras aplicaciones tales como, por ejemplo, el cribado de compuestos químicos/biológicos que tienen una actividad biológica. El dispositivo microfluídico comprende cámaras de cultivo, depósitos y estructuras de filtración que actúan como válvulas pasivas para un paso controlado de los organismos seleccionados. Dichos filtros de válvula conectan los depósitos con las cámaras de cultivo, y estas últimas entre ellas. Al aplicar una presión a un depósito, los organismos de muestra pueden pasar a través de las válvulas desde dicho depósito a las cámaras de cultivo, permitiendo así el cultivo posterior de los mismos. El mecanismo de filtrado puede basarse tanto en el tamaño y/o material de los filtros de válvula como en

el tamaño del organismo de muestra, así como en la presión aplicada.

En un aspecto, la invención se refiere a procedimientos que usan un dispositivo microfluídico para el estudio de características fenotípicas o conductuales de organismos de muestra, y para otras aplicaciones, tales como, por ejemplo, el cribado de compuestos químicos/biológicos que tienen una actividad biológica, comprendiendo dicho dispositivo:

- al menos un depósito de entrada adaptado para contener al menos un organismo;
- al menos una cámara de cultivo en conexión fluídica con dicho depósito de entrada; y
- un filtro de válvula ubicado entre dicho depósito de entrada y dicha cámara de cultivo

en el que dicho depósito de entrada se puede conectar operativamente a medios de presión adaptados para generar una presión dentro de dicho depósito de entrada, de manera que empuje su contenido, o al menos una parte de él, dentro de dicha cámara de cultivo.

En una realización, los filtros de válvula del dispositivo microfluídico son filtros de válvula pasivos blandos.

En una realización, los organismos de muestra son organismos translúcidos.

En una realización preferida, el dispositivo microfluídico comprende además un depósito de salida en conexión fluídica con dicha cámara de cultivo y que comprende otro filtro de válvula ubicado entre dicha cámara de cultivo y dicho depósito de salida.

En una realización, el depósito de salida se puede conectar operativamente a medios de presión adaptados para generar una presión dentro de este de manera que extraiga su contenido o al menos una parte de este.

En una realización particular, el dispositivo microfluídico comprende una o más cámaras de cultivo adyacentes o canales de cámaras de cultivo consecutivas, en el que la cámara en conexión directa con el depósito de entrada es la cámara proximal y la cámara en conexión directa con el depósito de salida es la cámara distal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento que usa un sistema que comprende:

- un dispositivo microfluídico como se define anteriormente; y
- medios de presión conectados operativamente a al menos un depósito.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento que usa un sistema para cultivar y analizar una población de organismos de muestra que comprende:

- un sistema como se define anteriormente; y
- medios de detección dispuestos para detectar parámetros específicos o características fenotípicas y/o conductuales de dicha población de organismos de muestra cultivados en las cámaras de cultivo.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para cultivar una población de organismos de muestra usando un sistema como se define anteriormente que comprende la etapa de:

- proporcionar una población de organismos de muestra en un medio de cultivo fluido para el cultivo de los mismos dentro del depósito de entrada;
- aplicar una presión de pulso a un depósito de modo que el medio de cultivo de fluido y al menos un organismo puedan pasar del depósito de entrada a la al menos una cámara de cultivo a través de al menos una válvula de entrada pasiva; y
- cultivar los organismos de muestra aplicando una presión a un depósito de modo que solo el medio de cultivo de fluido pueda pasar a través de la al menos una válvula de entrada pasiva desde el depósito de entrada a todos los elementos del dispositivo en conexión fluídica entre ellos.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para cultivar y analizar una población de organismos de muestra usando un sistema como se define anteriormente que comprende la etapa de:

- proporcionar una población de organismos de muestra y un medio de cultivo de fluido para el cultivo de los mismos dentro de al menos un depósito de entrada;
- aplicar una presión de pulso a al menos un depósito de entrada de modo que el medio de cultivo de fluido y al menos un organismo puedan pasar de al menos un depósito de entrada a la al menos una cámara de cultivo a través de al menos una válvula o válvulas de entrada pasiva
- cultivar los organismos de muestra aplicando una presión a al menos un depósito de entrada de modo que solo el medio de cultivo de fluido pueda pasar a través de la al menos una válvula o válvulas de entrada pasiva desde al menos un depósito de entrada a todos los elementos del dispositivo en conexión fluídica entre ellos; y
- analizar los organismos de muestra detectando parámetros específicos o características fenotípicas y/o

conductuales de los mismos.

En una realización, la presión de pulso de los procedimientos anteriores es tal que solo los organismos de muestra de un tamaño específico pueden pasar a través de los filtros de válvula.

5 La invención se refiere además a un procedimiento para detectar compuestos activos usando un sistema como se define anteriormente que comprende:

- 10 • proporcionar una población de organismos de muestra y un medio de cultivo de fluido para el cultivo de los mismos dentro de un depósito;
- aplicar una presión de pulso a dicho depósito de modo que el medio de cultivo de fluido y al menos un organismo puedan pasar de dicho depósito a la al menos una cámara de cultivo a través de la(s) válvula(s) de entrada pasiva
- proporcionar un compuesto activo para ser detectado en el depósito de entrada;
- aplicar una succión desde el depósito de salida; y
- 15 • monitorear el efecto del compuesto activo sobre el organismo de muestra dentro de la cámara de cultivo en el que la succión es tal que el organismo no puede pasar a través de la(s) válvula(s) de salida pasiva. En una realización del procedimiento de cribado, el depósito de entrada comprende un medio de cultivo adecuado para el cultivo del organismo de muestra. En una realización del procedimiento de cribado, la presión de pulso es tal que solo los organismos de un tamaño específico pueden pasar a través de los filtros de válvula. En una realización particular del procedimiento de cribado, el sistema usado comprende al menos 2 cámaras de cultivo adyacentes, cada una conectada con un depósito de entrada. En una realización particular del procedimiento de cribado, el sistema usado comprende uno o más canales adyacentes de cámaras de cultivo consecutivas, estando conectado cada canal con un depósito de entrada a través de la cámara proximal.

25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un diagrama esquemático de una realización del dispositivo microfluídico.

La figura 2 representa una vista tridimensional esquemática (3D) y una vista superior de la porción del dispositivo microfluídico en el filtro de válvula (i) y una descripción esquemática del mecanismo de válvula de gusano (ii-iv).

30 La figura 3 representa una ilustración esquemática de la selección de nematodos dependiente del tamaño por el mecanismo de válvula de gusano.

La figura 4 representa una vista superior esquemática de una cámara de cultivo cuadrada con (i) múltiples válvulas de entrada y salida y (ii) con un segundo conjunto de válvulas de entrada y salida de sección transversal más pequeña, que pueden usarse para aplicar compuestos químicos a la cámara de cultivo, alimentando a los gusanos con bacterias o eliminando gusanos de menor tamaño de la cámara de cultivo (por ejemplo, la progenie de gusanos).

35 La figura 5 representa otras realizaciones de cultivo de las cámaras conectadas por medio de válvulas de gusano a los depósitos de entrada y salida del dispositivo microfluídico.

La figura 6 representa un diagrama esquemático de un dispositivo microfluídico que consiste en una matriz de 40 cámaras de cultivo 80 distribuidas a lo largo de 8 canales adyacentes y separadas por múltiples filtros de válvula.

La figura 7 representa un diagrama esquemático del sistema microfluídico.

La figura 8 representa una configuración de chip con tinta.

45 La figura 9 representa la difusión de tinta en el canal adyacente, durante varios intervalos de tiempo después de detener un flujo de salida de 4 nL/s.

La figura 10 representa los resultados de la criba de tetramisol. Arriba, respuesta versus tiempo para varias concentraciones probadas; abajo, curva de dosis-respuesta trazada con el valor promedio de gusanos paralizados entre 30 y 40 minutos después de la inyección de tetramisol. Los valores numéricos de los parámetros de un ajuste sigmoidal se muestran en la leyenda.

50 La figura 11 representa una vista general de una realización del dispositivo microfluídico. (a) Imagen del dispositivo microfluídico, tamaño 25 mm x 75 mm (tamaño de portaobjetos de microscopio estándar), incluidas las conexiones microfluídicas laterales, que hacen que el dispositivo sea compatible para la obtención de imágenes con cada microscopio vertical o invertido. (bi) Representación esquemática de la parte central del chip microfluídico, que tiene como partes constitutivas principales: la cámara de cultivo de gusanos, la matriz de incubadora de embriones, cuatro entradas (In1 a In4) y dos salidas (Out1 y Out2). (bii) Ampliación de la cámara de cultivo de gusanos, incluido un dibujo de *C. elegans* adultos jóvenes para comparar el tamaño. La cámara está delimitada por disposiciones específicas de canales microfluídicos, diseñados para diferentes funciones: inyección de gusanos, sincronización de gusanos, *E. coli*/administración de fármacos y transferencia ovular. (biii) Ampliación esquemática tridimensional en una porción de la matriz de la incubadora de embriones. (c) Simulación de procedimiento de elementos finitos (Comsol Multiphysics) de la dinámica de fluidos en la región de la matriz de la incubadora, que muestra el principio de la formación hidrodinámica pasiva de embriones individuales. La velocidad fluidica y las líneas de flujo se calculan para un caudal de 100 nL/s en la entrada In3. (d) Micrografía de una sola incubadora en el molde maestro SU-8/silicio usado para la fundición de PDMS. (e) Micrografía de una sección de la matriz con embriones inmovilizados. (f) Ilustración de la obtención de imágenes multidimensional que se habilita en la matriz de embriones y abarca seis dimensiones: las 3 coordenadas espaciales, el tiempo, el tipo de exposición y el número de embriones en la matriz.

65 La figura 12 representa un modo de operación de una realización del dispositivo microfluídico. (a) Primero se

inyecta una suspensión de 10 µl de gusanos en el tampón M9 en el dispositivo microfluídico a lo largo de la dirección In1-Out1 a un caudal de 500 nL/s. Símbolos usados para las entradas y salidas: punto y flecha = jeringa en uso (por ejemplo, In1); punto = jeringa no en uso (por ejemplo, In2); círculo = válvula abierta (por ejemplo, Out1); cruz y círculo = válvula cerrada (por ejemplo, Out2). El "filtro de sincronización de gusanos" está diseñado para retener dentro de la cámara solo gusanos adultos, seleccionados por su mayor tamaño y sus mejores habilidades de natación (véase la ampliación de la imagen). (b) Posteriormente, el cultivo de gusanos se controla inyectando periódicamente *E. coli* en tampón M9 a lo largo de la dirección In2-Out2, típicamente a un caudal de 50 nL/s. Esto asegura el desarrollo normal de los gusanos en el ambiente líquido y la producción continua de embriones durante su vida adulta (véase la ampliación de la imagen). Opcionalmente, se pueden introducir fármacos o productos químicos en la entrada In4 para el tratamiento de gusanos en chip. (c) La inyección de tampón M9 a un caudal de 200 nL/s a lo largo de la dirección In3-Out2 desencadena la transferencia de todos los huevos presentes en la cámara hacia la matriz de la incubadora, donde son capturados por la hidrodinámica pasiva, como se muestra por la superposición de 13 fotogramas de vídeo en la ampliación. (d) La perfusión de la suspensión de *E. coli* hacia Out1 y Out2 asegura simultáneamente una alimentación adecuada de gusanos dentro de la cámara de cultivo y un posicionamiento estable del embrión dentro de las incubadoras, lo que permite obtener imágenes de lapso de tiempo paralelo de los embriones a resolución celular (véase la ampliación de la imagen).

La figura 13 representa un estudio de la embriogénesis de *C. elegans*. (a) Lapso de tiempo de las principales fases embrionarias de desarrollo con indicaciones de tiempo típicas para T = 25 °C y gusanos de tipo salvaje. (b) Desarrollo embrionario completo desde la captura de huevos en la incubadora hasta la eclosión, como se observa en una secuencia de imágenes por microscopía de campo claro (objetivo de inmersión en aceite de 63 x, NA 1,4) tomadas de una película (1 fotograma por minuto) a intervalos de 45 minutos para una cepa de gusano de tipo salvaje N2 a 25 °C; el tiempo de eclosión define t = 0. (c) Ilustración de las principales fases de desarrollo embrionario -1 célula a frejol; frejol a 1,5 pliegues; 1,5 pliegues a la eclosión, que son claramente distinguibles morfológicamente. (d) Duración de las fases de desarrollo, como se observa para una matriz de 20 embriones para una cepa de gusano de tipo salvaje N2 a 25 °C; (di) variación de la duración del tiempo que el embrión pasa en una incubadora, partiendo de las diferencias en el momento exacto de la puesta de huevos y la captura del embrión; (dii) duración promedio de las fases de desarrollo, como se obtiene de los datos en (di). (e) Imágenes de una matriz completa de 20 embriones tomados 600 minutos después de atraparlos en las incubadoras, que ilustra el desarrollo bloqueado cuando los embriones son depositados por gusanos de tipo salvaje N2 que fueron expuestos en la cámara de cultivo a 2 mM del fármaco contra el cáncer 5 -fluorouracilo (5-FU) en el tampón M9. Los gráficos de barras se expresan como media +SEM, *** p ≤ 0,001.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada presentada en relación con las figuras de los dibujos adjuntos, que forman parte de esta divulgación. Debe entenderse que esta divulgación no se limita a las condiciones o parámetros específicos descritos y/o mostrados en el presente documento, y que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solo a modo de ejemplo y no pretende ser limitativa de la divulgación reivindicada.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un(a)", "y", "el (los)", "la(s)" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una cámara" incluye una pluralidad de dichas cámaras y la referencia a "un organismo" incluye la referencia a uno o más organismos, y así sucesivamente.

Además, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. De forma similar, "comprender", "comprende", "que comprende", "incluir", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitantes. Debe entenderse además que cuando las descripciones de diversas realizaciones usan el término "que comprende", los expertos en la materia entenderán que, en algunos casos específicos, una realización puede describirse alternativamente usando el lenguaje "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

En el marco de la presente divulgación, un "dispositivo microfluídico", "chip microfluídico" o "plataforma microfluídica" es cualquier aparato que está concebido para trabajar con fluidos a escala micro/nanométrica. La microfluídica es la ciencia que se ocupa del flujo de líquido dentro de canales de tamaño micrométrico. Al menos una dimensión del canal es del orden de un micrómetro o decenas de micrómetros para considerarla microfluídica. La microfluídica se puede considerar tanto como una ciencia (estudio del comportamiento de los fluidos en microcanales) como una tecnología (fabricación de dispositivos microfluídicos para aplicaciones tales como lab-on-a-chip (laboratorio en un chip)). Estas tecnologías se basan en la manipulación del flujo de líquido a través de canales microfabricados. La activación del flujo de líquido se implementa mediante fuentes de presión externas, bombas mecánicas externas, microbombas mecánicas integradas o mediante combinaciones de fuerzas capilares y mecanismos electrocinéticos.

La tecnología microfluídica ha encontrado muchas aplicaciones, tal como en la medicina con los laboratorios en un chip porque permiten la integración de muchas pruebas médicas en un solo chip, en la investigación de biología celular porque los microcanales tienen el mismo tamaño característico que las células y permiten dicha manipulación de células individuales y un cambio rápido de fármacos, en la cristalización de proteínas porque los dispositivos microfluídicos permiten la generación en un solo chip de una gran cantidad de condiciones de cristalización

(temperatura, pH, humedad ...) y también muchas otras áreas, tales como el cribado de fármacos, probadores de azúcar, microrreactores químicos o microceldas de combustible.

En términos generales, un chip microfluídico es un conjunto de microcanales grabados o moldeados en un material (vidrio, silicio o polímeros tal como PDMS). Los microcanales que forman el chip microfluídico se conectan entre sí para lograr la función deseada (mezclar, bombear, redirigir y/o permitir reacciones químicas en una célula). Esta red de microcanales atrapados en el chip microfluídico está conectada al exterior mediante entradas y salidas perforadas a través del chip, como una interfaz entre el macromundo y el micromundo. Es a través de estos agujeros que los líquidos (líquidos, gases o combinaciones de los mismos) se inyectan y eliminan del chip microfluídico (a través de tubos, adaptadores de jeringas o incluso agujeros libres en el chip). Un denominado "laboratorio en un chip" (LOC) es un dispositivo que integra una o varias funciones de laboratorio en un solo chip de solo milímetros a unos pocos centímetros cuadrados de tamaño. Los LOC se ocupan del manejo de volúmenes de fluido extremadamente pequeños hasta menos de picolitros.

Los dispositivos microfluídicos más simples consisten en microcanales moldeados en un polímero que está unido a una superficie plana (un portaobjetos de vidrio como ejemplo). El polímero más comúnmente usado para moldear chips microfluídicos es el polidimetilsiloxano (PDMS). El PDMS es un elastómero transparente, biocompatible (muy similar al gel de silicona usado en los implantes mamarios), deformable y económico, fácil de moldear y adherir con vidrio.

En su realización más simple, el dispositivo microfluídico comprende dos elementos, es decir, un depósito de entrada y una cámara de cultivo para el cultivo de organismos de muestra, siendo el depósito operativamente conectable a los medios para aplicar una presión dentro de este. En una realización preferida, el dispositivo comprende además un depósito de salida en conexión fluidica con la cámara de cultivo. Todos los depósitos y cámaras están delimitados o separados de los elementos consecutivos del dispositivo mediante filtros de válvula, que funcionan como un elemento filtrante o de bloqueo para que los organismos de muestra pasen de un elemento del dispositivo a otro, al tiempo que permiten el flujo de fluido (por ejemplo, de aire, gases o líquidos). Sin embargo, se pueden imaginar diferentes disposiciones, como por ejemplo la posibilidad de insertar elementos adicionales entre los depósitos y las cámaras. En una realización muy específica del dispositivo microfluídico, por ejemplo, un elemento serpentina para atrapar y analizar objetos de muestra tales como organismos pequeños o embriones no humanos se coloca entre una cámara de cultivo y un depósito de salida. Todos estos elementos están, en cualquier caso, conectados operativamente entre ellos a través de una línea fluidica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "conectado operativamente", "conectable operativamente" o incluso "que se conecta operativamente", refleja una relación funcional entre dos o más componentes de un dispositivo o sistema, es decir, dicha expresión significa que los componentes reivindicados deben estar conectados de manera tal que realicen una función designada. La "función designada" puede cambiar dependiendo de los diferentes componentes involucrados en la conexión; por ejemplo, la función designada de los medios de presión conectados operativamente a un depósito es la capacidad de aplicar una presión positiva o negativa dentro de dicho depósito de manera que se empuje su contenido, o al menos una parte del mismo. Un experto en la materia entendería y descubriría fácilmente cuáles son las funciones designadas de cada uno de los componentes del dispositivo o del sistema, así como sus correlaciones, sobre la base de la presente divulgación.

Los depósitos y las cámaras de cultivo que componen el dispositivo pueden estar hechos de cualquier material adecuado, preferentemente un material transparente o translúcido que permita un monitoreo visual directo de los organismos de muestra que se van a cultivar. Un dispositivo microfluídico que tiene depósitos transparentes y/o cámaras de cultivo es particularmente útil cuando se pretende acoplarlo con otro sistema de obtención de imágenes para análisis adicionales. Se puede usar cualquier depósito adecuado, tal como botellas, vasos de precipitados o preferentemente placas de (micro)pocillos, tal como por ejemplo placas de (micro)petri o placas de 96/384 pocillos. Muchos depósitos de entrada y/o salida pueden estar presentes en el dispositivo, dependiendo de las necesidades y diseños experimentales. Por ejemplo, se pueden incluir varios depósitos de entrada en el dispositivo, cada uno con diferentes compuestos y/u organismos (medios, compuestos químicos, etc.), así como varios depósitos de salida que se pueden colocar en conexión fluidica con la(s) cámara(s) de cultivo y usar como, por ejemplo, residuo para el medio de cultivo.

Los organismos a estudiar pueden ser organismos unicelulares o multicelulares, o incluso células. En una realización preferida, los organismos de muestra son organismos translúcidos. En el marco de la presente divulgación, por "organismo translúcido" se entiende cualquier entidad biológica, típicamente del orden de unos pocos micrómetros a unos pocos centímetros de tamaño, que tiene características físicas de modo que la luz pueda atravesarlo al menos parcialmente. Estos incluyen, pero no se limitan a, células como células somáticas, bacterias, protozoos, protistas, moneras, arqueas, algas, espermatozoides, ovocitos, así como levaduras, embriones animales o larvas, etc. El uso de embriones humanos en este marco no está incluido en el alcance de la invención. Se pueden prever tipos de organismos de muestra tales como gusanos, preferentemente nematodos como *C. elegans* o larvas de *Danio rerio* y *Xenopus laevis*. Estos organismos se cultivan en un medio de cultivo, generalmente un líquido o gel diseñado para apoyar el crecimiento y la supervivencia de los organismos de muestra deseados. En el caso de nematodos tal como *C. elegans*, el medio de cultivo puede comprender bacterias tal como *E. Coli*. La cámara, o una matriz de cámaras,

está diseñada para realizar cultivos a largo plazo de dichos organismos de muestra gracias a las funciones características del dispositivo y los filtros de válvula en particular.

5 El depósito de entrada está conectado directa o indirectamente (por ejemplo, mediante elementos tubulares o microcanales) operativamente con la cámara de cultivo, o con una llamada cámara "proximal" cuando hay más de una cámara en el dispositivo, a través de un filtro de válvula de entrada. Del mismo modo, la cámara de cultivo está operativamente conectada con el depósito de salida, o con una llamada cámara "distal" cuando hay más de una cámara presente en el dispositivo, a través de un filtro de válvula de salida. Los filtros de válvula también conectan las cámaras entre ellos cuando el dispositivo comprende más de una cámara. En esta alternativa, las cámaras están
10 dispuestas en un canal de cámaras consecutivas, pero incluso se puede prever una matriz de cámaras adyacentes o de canales adyacentes de cámaras consecutivas.

15 Las válvulas actúan como filtros pasivos y pueden estar hechas de cualquier material y forma adecuados, como se detallará más adelante en esta divulgación. Con el término "pasivo" se entiende que las válvulas no están conectadas con un actuador, tal como una microbomba insertada expresamente en el chip para alterar directamente la forma de la válvula. El término "filtro" indica una propiedad estructural de la válvula, es decir, su geometría tridimensional que actúa como una barrera dependiente del tamaño para objetos sólidos suspendidos en un medio fluido.

20 Por su naturaleza y estructura, los filtros de válvula actúan como barreras normalmente cerradas que, en algunas realizaciones, pueden abrirse a tiempo mediante un aumento de presión dentro de un depósito o una cámara. Sin embargo, a diferencia de las válvulas usadas más comunes explotadas en dispositivos microfluídicos, los filtros de válvula no comprenden estructuras tales como diafragmas flexibles de, por ejemplo, materiales poliméricos activados directamente a través de actuadores piezoeléctricos, electrostáticos o (termo)neumáticos. Esto tiene las ventajas de, por ejemplo, simplificar el diseño del chip microfluídico y evitar el control externo (lo que disminuye en gran medida los requisitos de potencia). Una visión general de las microválvulas usadas en dispositivos microfluídicos se puede encontrar en "A review of microvalves", J. Micromech. Microeng. 16 (2006) R13-R39.

25 La acción de filtrado se ejerce a través del diseño particular del filtro de válvula, que se adapta finamente para explotar la naturaleza de los organismos de muestra, la naturaleza del filtro o ambos (véase, por ejemplo, la figura 2).

30 En términos generales, los filtros de válvula pueden estar hechos de cualquier forma y material adecuados, siempre que actúen como una válvula de filtración pasiva para los organismos de muestra elegidos. En algunos aspectos, una válvula de filtración está hecha sustancialmente de un material polimérico. Un material polimérico puede ser en algunos aspectos ventajoso sobre otros materiales en términos de, entre otras cosas, biocompatibilidad, posibilidad de fácil esterilización y manejo en relación con la fabricación, y también podría permitir fabricar todo el dispositivo con un proceso rápido y barato mediante la producción de un artículo de cuerpo monolítico, evitando así cualquier problema de ensamblaje. Por ejemplo, se puede diseñar y construir un molde prefabricado para obtener un dispositivo con las peculiaridades deseadas (por ejemplo, el tamaño y la forma de los filtros de válvula, el tamaño y la forma de los depósitos y similares), y todo el chip puede luego moldearse como un cuerpo integral unitario usando procedimientos de moldeo por inyección bien conocidos. Sin embargo, como será evidente para un experto en la técnica, se puede explotar cualquier técnica adecuada para producir un dispositivo de cuerpo único, tal como, por ejemplo, impresión 3D, fotolitografía y similares.

35 Una lista no exhaustiva y no limitante de materiales poliméricos adecuados para la fabricación de los filtros de válvula comprende poliacrilatos, poliestireno, polipropileno, policarbonatos, polisulfonas, poliésteres, olefinas cíclicas y similares.

40 En alguna realización, la válvula está hecha sustancialmente de un material blando, tal como un material polimérico blando. Un "material blando" es cualquier material que sea flexible, elástico, reversiblemente compresible, maleable, dúctil, elástico y/o plástico. Una lista no exhaustiva y no limitante de materiales blandos adecuados comprende materiales poliméricos tal como silicona (por ejemplo, polidimetilsiloxano -PDMS-), caucho de nitrilo, poliimida, látex, poliuretano, poliisopreno (caucho sintético), cualquier tipo de elastómeros, la familia del Tango de materiales similares al caucho (por ejemplo, TangoPlus o FullCure930), espuma de poliuretano (espuma de caucho), espuma XPS, espuma de poliestireno, espuma fenólica, copolímeros de bloques estirénicos, mezclas de poliolefinas, aleaciones elastoméricas, poliuretanos termoplásticos (TPU), copoliéster termoplástico, poliamidas termoplásticas y similares. En una realización preferida, los filtros de válvula son filtros de válvula pasivos blandos sustancialmente hechos de polidimetilsiloxano (PDMS).

45 Dichos filtros de válvula pueden tener varias formas y tamaños según las necesidades experimentales y el diseño del dispositivo. Por ejemplo, pueden ser pequeños postes embaladas de forma compacta de un material polimérico blando de, por ejemplo, forma triangular, poligonal, cuadrada o rectangular o pueden tener una apariencia de rejilla o malla, adaptados para que el área de filtrado (es decir, el área por la que puede pasar un organismo de muestra) sea sustancialmente no paralela (por ejemplo, perpendicular o ligeramente inclinada) al flujo de los organismos de muestra una vez impulsados por un pulso de presión. También se pueden prever formas alternativas, como una forma de "media luna" o "tipo frejol", que es particularmente conveniente en caso de filtrado selectivo de todos los organismos, excepto los organismos translúcidos de forma redonda (esféricos, elípticos, ovoides, etc.) tales como embriones u

ovocitos animales.

Como se dijo, el dispositivo se puede conectar operativamente a medios para alterar directa o indirectamente la presión dentro de las cámaras de cultivo y los depósitos. La presión aplicada puede ser una "presión positiva", es decir, cuando la presión aplicada aumenta la presión de la cámara interna o del fluido del depósito, o una "presión negativa", es decir, cuando la presión aplicada disminuye la presión de la cámara interna o del fluido del depósito, como en el caso de una succión. Un medio para aplicar una presión generalmente estará acoplado con el depósito de entrada o de salida, ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un tubo de conexión). Los medios adecuados para alterar la presión dentro del dispositivo son bombas o microbombas externas o integradas, combinaciones de fuerzas capilares y mecanismos electrocinéticos, presión hidrostática o simplemente una jeringa. Como será evidente para un experto en la materia, por lo que se dijo anteriormente, la divulgación pretende cubrir también procedimientos que usan un sistema que comprende un dispositivo microfluidico como se definió anteriormente y medios de presión conectados operativamente a un depósito de entrada y/o un depósito de salida adaptado para generar una presión dentro de dicho depósito de entrada y/o salida, de manera que empuje su contenido o al menos una parte del mismo.

Las figuras 1 a 3 representan una realización ejemplar y no limitante y sus características. La figura 1 muestra un diagrama del dispositivo usando un gusano como organismo modelo. El dispositivo tiene un depósito de entrada y uno de salida conectados con la cámara central a través de los filtros de válvula. Dichas válvulas se pueden cruzar de forma selectiva, ya que permiten el paso del flujo de fluido (por ejemplo, del medio de cultivo), al tiempo que evitan que el gusano vaya desde el depósito de entrada a la cámara de cultivo. Sin embargo, un aumento de presión, tal como una presión de pulso, puede comprimir el gusano a través de la válvula de entrada hacia la cámara de cultivo (i), donde el gusano es retenido a continuación por el mismo mecanismo de válvula. En esta situación, el organismo de muestra puede cultivarse y estudiarse durante un período de tiempo suficiente dependiendo de las necesidades experimentales (ii). Se puede usar otro aumento de presión para extraer el gusano de la cámara de cultivo, a través de la válvula de salida en el depósito de salida (iii). El gusano y el medio de cultivo se mueven a través de la cámara y los depósitos introduciendo una diferencia de presión entre su entrada y su salida (por ejemplo, por medio de una bomba de jeringa o por presión hidrostática).

La figura 2 muestra un detalle del filtro de válvula de entrada (i) y del "mecanismo de válvula de gusano" (ii-iv). Cuando las presiones en el fluido en los lados opuestos de la válvula de entrada son esencialmente las mismas, o una eventual diferencia de presión es inferior a un umbral específico, el gusano no puede pasar del depósito de entrada a la cámara de cultivo (ii). Cuando la presión en la entrada de la válvula de entrada supera un umbral específico, el gusano se deforma y puede pasar a través de la válvula. Alternativa o adicionalmente, si el material de la válvula tiene un carácter elástico, este puede deformarse bajo la aplicación de una presión de pulso, facilitando la entrada del gusano en la cámara de cultivo (iii). Una vez que el gusano ha entrado en la cámara de cultivo, se elimina la presión, de modo que el gusano queda confinado dentro de la cámara (iv). El mismo principio se puede aplicar para transferir gusanos desde la cámara de cultivo al depósito de salida, a través de la válvula de salida. El mecanismo de "válvula de gusano" se controla simplemente por la intensidad del flujo que pasa a través de los filtros y usa las propiedades elásticas del cuerpo del gusano y/o del material o la geometría de la válvula. Este mecanismo se atribuye a los siguientes factores: geometría exacta (sección transversal, longitud) de la estructura de filtro, la presión externa aplicada que causa una deformación elástica instantánea del cuerpo del gusano (y/o de la propia válvula) y la capacidad de natación del gusano. Una elección adecuada de la geometría del filtro puede, por ejemplo, garantizar que los gusanos de una edad deseada (por ejemplo: Larvas L1) puedan cruzar una válvula de filtro pasivo solo si la diferencia de presión entre los dos lados de la válvula excede un cierto umbral.

La figura 3a muestra una selección de gusanos dependiente del tamaño. Cuando una población mixta de gusanos está presente en el depósito de entrada (i), una presión pequeña es suficiente para transportar animales de menor tamaño a través de la válvula de entrada (ii), dejando atrás una población sincronizada de adultos en el depósito de entrada (iii). Eventualmente, cuando todas las larvas se filtran de la muestra mixta, se puede usar un procedimiento como se ilustra en las figuras 1-2 para llevar a los adultos a la cámara de cultivo. El mismo principio se puede aplicar para transferir gusanos desde la cámara de cultivo al depósito de salida, a través de la válvula de salida. Como consecuencia, el dispositivo y el mecanismo de válvula de gusano según la invención que lo caracteriza permiten un paso controlado de organismos de un tamaño específico, dependiendo, en el presente ejemplo, de su fase de desarrollo. Esto ofrece la ventaja, a través de un diseño simple, de garantizar la sincronización de la edad del organismo para cada experimento, incluso a partir de suspensiones mixtas de organismos de diferentes edades, evitando así, por ejemplo, en el caso de nematodos de gusanos, la etapa de blanqueo habitual requerido para extraer los huevos.

Además, en ciertas realizaciones, los filtros se pueden usar para extraer gusanos en una determinada fase larval desde un chip (por ejemplo: L1 o L4) y transferirlos a otro chip, para estudios transgeneracionales o mantenimiento continuo de gusanos. Los chips se pueden conectar de manera adecuada operativamente a través de, por ejemplo, elementos tubulares, o un paso intermedio de los gusanos a través de depósitos externos (o placas de pocillos) se pueden usar para la transferencia de gusanos de chip a chip.

Otra posibilidad se basa en la selección de organismos de muestra de diferentes tamaños, así como de diferentes edades cuando existe una correlación entre el tamaño y la edad del organismo, al disponer diferentes filtros de válvula

a lo largo del dispositivo. Por ejemplo, podría imaginarse un dispositivo en el que la primera válvula de filtro permite el paso de toda la población de gusanos desde el depósito de entrada a la cámara proximal, el segundo filtro permite el paso de las larvas L1 y L2 mientras bloquea a los animales adultos, el tercer filtro permite el paso de las larvas L1 mientras bloquea las larvas L2 y así sucesivamente. De esta manera, análisis paralelos en, por ejemplo, características conductuales/fenotípicas en diferentes fases de desarrollo de los organismos de muestra podrían realizarse al mismo tiempo.

Otra alternativa más es la posibilidad de sincronizar una población de organismos de muestra, tal como los nematodos, a partir de la fase embrionaria: mediante el uso, por ejemplo, de filtros de media luna o con forma de frejol en la interfaz de las cámaras de cultivo, un operador podría ser capaz de acuñar embriones de gusanos, y posiblemente cultivarlos y caracterizarlos, al tiempo que se elimina todo el resto, por ejemplo, de una población mixta. Una vez que los embriones se convierten en larvas L1, estas pueden ser cultivadas y/o filtradas en otras cámaras de cultivo para estudios posteriores. De esta manera, las estructuras de filtrado funcionan como una "matriz de incubadora de embriones" para el aislamiento, formación de imágenes y/o fenotipificación de embriones individuales. Esto también puede permitir la realización de estudios transgeneracionales desde las primeras divisiones celulares hasta la fase adulta de varios organismos en paralelo al reiterar el proceso varias veces, a través de la simple optimización de un protocolo para el blanqueo de gusanos en chip dentro de las cámaras de cultivo para aislar una población embrionaria altamente sincronizada en cada cámara (figura 3b).

La figura 4 muestra dos de las posibles alternativas para las válvulas de filtro del dispositivo microfluídico. La figura 4 (i) es una vista superior de una cámara de cultivo cuadrada con múltiples válvulas de entrada y salida. Se muestra un segundo conjunto de válvulas de entrada y salida de sección transversal más pequeña, que se pueden usar para aplicar compuestos químicos a la cámara de cultivo, alimentar a los gusanos con bacterias o eliminar gusanos de menor tamaño de la cámara de cultivo (por ejemplo, la progenie de gusanos) en (ii).

La figura 5 (i) muestra un diagrama de una cámara de cultivo en forma de disco con una válvula de filtro en la entrada y múltiples válvulas de filtro en la salida. La figura 5 (ii) muestra una fotografía de un depósito de entrada conectado a través de múltiples válvulas de filtro a un canal microfluídico. La figura 5 (iii) muestra una fotografía de una larva de nematodos en una parte de la cámara de cultivo que se muestra esquemáticamente en la figura 5 (i).

La figura 6 (i) muestra un diagrama esquemático de un chip microfluídico que consiste en una matriz de 80 cámaras de cultivo distribuidas a lo largo de 8 canales adyacentes y separadas por múltiples válvulas de filtro. En este chip, la diferencia de presión sobre los canales se obtiene aplicando una presión en una sola entrada/salida, que puede usarse para llenar las diferentes cámaras de cultivo con un pequeño número de gusanos y para proporcionar el medio de cultivo o posiblemente compuestos de prueba a las diferentes cámaras de cultivo. Mediante la aplicación posterior de pulsos de presión sobre los canales, el mecanismo de válvula de gusano permite la distribución de un número discreto de gusanos en las diferentes cámaras de cultivo, como se muestra en la figura 6 (ii). En este escenario, el dispositivo se puede usar para realizar análisis paralelos en poblaciones de gusanos en condiciones controladas sobre cada cámara o canal (por ejemplo, para el cribado de fármacos en organismos de prueba).

La invención se refiere además a procedimientos que usan un sistema para cultivar y analizar una población de organismos de muestra. El sistema integra el dispositivo microfluídico y explota sus características únicas para ejecutar cultivos a largo plazo de organismos multicelulares mientras estudia sus características fenotípicas y/o conductuales en diferentes condiciones. Dicho sistema comprende, aparte de un sistema que comprende el dispositivo microfluídico conectado operativamente a medios de presión como se describe previamente, al menos un medio de detección dispuesto para detectar y posiblemente, al mismo tiempo, analizar parámetros específicos o características fenotípicas y/o conductuales del organismo de muestra. Por ejemplo, se puede disponer una fuente de luz para iluminar las cámaras de cultivo del dispositivo donde se cultiva una población de organismos de muestra, y se pueden disponer medios de detección de luz para capturar la luz dispersada o inducida por dichos organismos. En esta realización del sistema, cualquier fuente de luz puede usarse para iluminar las cámaras de cultivo del dispositivo integrado en el sistema. Estas incluyen, pero no se limitan a, luz blanca, luz fluorescente, luz infrarroja, luz UV, luz láser, luz led e incluso luz solar. Una realización simple del sistema se basa en el sistema microfluídico como se describe junto con un microscopio: la luz del microscopio ilumina las cámaras de cultivo que comprenden los organismos de muestra, que se pueden ver y analizar a través de los oculares del microscopio (figura 7). Otra alternativa simple es el acoplamiento del sistema microfluídico con una cámara como medio de detección para, por ejemplo, registrar el movimiento de los organismos de muestra para estudios fenotípicos/conductuales: en esta alternativa, incluso la luz solar puede ser un significado adecuado para iluminar las cámaras de cultivo. Se prevén múltiples lecturas para un sistema de este tipo, como el análisis automatizado de campos brillantes o de imágenes fluorescentes, imágenes asistidas por ordenador a través de un software de "seguimiento de gusanos" y similares.

Se prevén otras alternativas frente a los detectores del sistema, tal como detectores *ad hoc* para, por ejemplo, las detecciones de parámetros como mediciones eléctricas, mediciones de productos químicos, mediciones de temperatura y similares.

Una gran ventaja de los procedimientos de la invención radica en la posibilidad de lograr una automatización completa o casi completa. Esto reduce el tiempo experimental y la intervención humana, así como cualquier problema relacionado con eso, incluida la reducción del sesgo y los errores humanos, la facilidad de manejo de la muestra y el

análisis de datos, un rendimiento que es al menos un orden de magnitud más rápido que el de la operación manual, etc. El flujo de fluidos, la temperatura, la obtención de imágenes, el procesamiento de imágenes, el tratamiento de datos, las lecturas adicionales (tal como, por ejemplo, eléctricas, químicas, etc.), y así sucesivamente, pueden controlarse mediante software y/o aparatos dedicados para el control automatizado de la plataforma. En al menos algunas realizaciones, por ejemplo, el sistema puede incluir un sistema de control de temperatura integrado o un código de procesamiento de imagen automatizado para la extracción directa de datos tras la obtención de imágenes.

Ejemplo 1

Procedimiento para el cribado de compuestos activos mediante el uso del sistema microfluídico

Se pueden obtener importantes ventajas en términos de comprensión de los efectos fisiológicos de los fármacos mediante el estudio de organismos completos durante su desarrollo. *C. elegans*, como modelo para muchas enfermedades humanas y por el que se conocen muchos genes homólogos humanos, es un candidato potencial para la validación clínica de fármacos. Tomando todas las ventajas de *C. elegans* como el organismo de elección, tal como el tamaño pequeño y la facilidad de crecimiento, el hecho de que muchos ortólogos de genes humanos son conocidos en su genoma, su manipulación genética es fácilmente accesible y dominada, sus fases de desarrollo son bien conocidas y caracterizadas, etc., los inventores tenían como objetivo crear una plataforma que permitiera el cribado de fármacos multiplexados durante todo el ciclo de vida de este nematodo.

Usaron un enfoque de micromatriz para llegar a un ensayo de resolución de población pequeña para el cribado de alto contenido, eventualmente con una capacidad de alto rendimiento y con la posibilidad de automatizar las diferentes etapas del análisis. Para aprovechar al máximo los estudios de *C. elegans* en resolución de un solo organismo, los inventores deseaban que el chip microfluídico ofreciera la posibilidad de:

- inyectar muestras de gusanos en el chip;
- hacerlos crecer desde la fase larval hasta la edad adulta;
- lavar la progenie de los gusanos iniciales cuando ponen huevos;
- administrar fármacos en los momentos deseados del ciclo de vida.

Esta plataforma también ha sido usada en diferentes fases de la validación clínica de un fármaco: desde el cribado de una multitud de fármacos para la búsqueda de resultados, hasta el rastreo de una curva de dosis-respuesta para fármacos prometedores, y finalmente para buscar sus objetivos. Los inventores también querían acercarse a un procedimiento para lograr la resolución de un solo gusano para las cribas habilitadas por el chip.

Para satisfacer los objetivos anteriores, uno debe poder alimentar a los gusanos con *E. coli* y deshacerse de la progenie durante el período de puesta de huevos de los adultos, así como evitar la contaminación cruzada de los diferentes fármacos y también elegir el rendimiento que uno quiere lograr. Otro problema era cómo hacer fluir los nutrientes y los fármacos en las cámaras que se suponía que estaban aisladas.

Los inventores crearon un modelo de prueba de concepto con el objetivo de encontrar un procedimiento de cribado que se pueda ejecutar de forma casi automática y que se pueda implementar a mayor escala. El procedimiento elegido es perfectamente escalable a un mayor rendimiento con modificaciones menores. Se ha enfrentado un gran esfuerzo para calibrar el instrumento para que se ajuste adecuadamente con algunos estándares en la ciencia de cribado de fármacos.

Para habilitar cribas de alto contenido a alta resolución, los inventores han desarrollado un chip microfluídico que selecciona la primera fase larval (L1) de este animal. Este chip se basa en un enfoque de micromatriz y se fabricó usando una litografía blanda estándar: está compuesto por varios canales adyacentes y separados por cámaras mediante válvulas de filtro de PDMS que se usan para seleccionar los gusanos y mantenerlos en pequeñas poblaciones aisladas (1-10 gusanos por cámara). Los canales están conectados de tal manera que permiten el control de la alimentación y la administración del fármaco simplemente controlando el flujo de salida total con solo una jeringa. El diseño de esta plataforma y sus modos operativos mejoran enormemente las posibilidades de automatización, lo que la hace adecuada para ser utilizada con cualquier sistema de imágenes y para el acoplamiento con otros estándares en el cribado de fármacos (por ejemplo, la preparación automática de sustancias para administrar).

El diseño final del chip se muestra en la figura 6. Consiste en varios canales (4 u 8) divididos en cámaras (10/canal) por pequeños filtros que consisten en postes de PDMS. Cada entrada se conectó a un depósito, y la salida se llevó a una jeringa. Este diseño es casi completamente simétrico para tratar de asegurar la mayor homogeneidad posible a los fluidos en las diferentes vías: esto aumenta el control del caudal. Las características geométricas de los canales de filtración se optimizaron (100 μm de largo, 8-12 μm de ancho) para seleccionar las fases larvales de *C. elegans* y poder atraparlas en las cámaras. En cuanto a la altura de la estructura, los parámetros a tener en cuenta son esencialmente el tamaño de las muestras biológicas a insertar y el volumen de los reactivos a inyectar. Otros parámetros sensibles implican la relación de aspecto de las cámaras/canales de PDMS. Después de cuidadosas consideraciones, se eligió el valor de 100 μm como una buena compensación. La plataforma microfluídica se ha utilizado para seleccionar directamente gusanos L1 de una población mixta. Esto permitiría evitar la etapa de blanqueo

para extraer los huevos. Como protocolo, se inyectó una población mixta desde la salida del chip hasta alcanzar la cantidad deseada de gusanos antes del primer rango de filtros, y luego se inyectó el líquido a 10-20 $\mu\text{l/s}$ con pulsos de 1-2 segundos: los pulsos a un caudal muy alto hacen que los pequeños filtros de PDMS entre las cámaras se amplíen lo suficiente por un tiempo para permitir que las larvas L1 pasen a través de los mismos. Esto es posible gracias a la explotación de la capacidad hidráulica de los postes de PDMS, que gracias a su relación de aspecto (100 μm de alto, 70 μm de ancho), se comprimen durante los pulsos y restauran su forma cuando se detiene el flujo. Después de 10-20 pulsos, las cámaras se llenan con diferentes poblaciones de larvas L1, con la regla general de que las cámaras cercanas a la salida contienen más gusanos que las cámaras más alejadas. Este es un buen protocolo para obtener larvas L1 de una población mixta, y permite alcanzar una resolución mucho más alta con respecto a las pruebas estándar en placas de agar (1 a 10 gusanos por cámara como promedio). Los gusanos atrapados no pudieron escapar de la cámara simplemente nadando ni con caudales inferiores a 200 nL/s: por lo tanto, para este ajuste particular, este era un límite superior para el caudal que se utilizaría para la alimentación y la administración de fármacos.

Cuando los gusanos son adultos y ponen huevos, se puede usar el mismo protocolo después de la eclosión para lavar las nuevas larvas, permaneciendo finalmente con los mismos gusanos en la cámara desde el principio hasta el final de su ciclo de vida.

Un aspecto fundamental del chip es la prevención de la contaminación cruzada entre cámaras de diferentes canales, que se supone que criban diferentes fármacos o diferentes concentraciones de un fármaco. La solución más automatizable y manejable que se encontró fue tener un caudal impuesto para varias vías fluidicas al usar solo una jeringa. El diseño propuesto lo hace posible por el hecho de que en estas condiciones el número de Reynolds y el número de Peclet son muy bajos y muy altos, respectivamente, y por lo tanto el transporte de masa ocurre esencialmente por advección. Se han realizado simulaciones numéricas para obtener una estimación de los efectos de este fenómeno y se encontró que los buenos caudales para evitar la contaminación cruzada deberían ser superiores a 1 nL/s en la salida.

Este comportamiento se ha probado experimentalmente utilizando tintas de diferentes colores en chips con 4 entradas. Cada entrada se ha conectado a un depósito que contiene la tinta (figura 8), y se succionó con una jeringa de la salida a varios caudales. Los resultados muestran que, al disminuir el caudal de salida, las 4 tintas diferentes que provienen de las diferentes entradas tienden a mezclarse debido al aumento del transporte de masa difusora (no se muestra). Pero también se puede concluir que para un flujo de salida total de 4 nL/s (que corresponde a aproximadamente 1 nL/s que fluye en cada uno de los 4 canales), no hay difusión de retorno del fluido desde las diversas vías, lo cual coincide con el comportamiento fluido simulado. Para cuantificar aún más el fenómeno de difusión en el chip, también se ha estudiado el comportamiento de la difusión de tinta después de detener completamente el flujo. Se tomaron fotografías en serie en diferentes momentos después de detener un flujo de salida de 4 nL/s (figura 9). La difusión es muy lenta y se tarda aproximadamente 1 hora en tener un cambio visible en la concentración de tinta en la primera cámara del canal adyacente.

Para tener una evaluación más precisa de la difusión posterior de un fármaco en varios canales, se realizó un experimento similar al de la tinta, pero esta vez se usó 1 mM de fluoresceína (1 mM) en uno de los canales y agua en los demás. La intensidad de fluorescencia se ha monitoreado en las 4 anticámaras (1 por canal) que estuvieron más cerca de la salida con el tiempo para un flujo de salida total de 1 nL/s. Una imagen de lapso de tiempo no muestra contaminación cruzada dentro de más de 3 h de estudio, incluso a un caudal muy bajo de 1 nL/s. El mismo chip funcionó durante la noche al mismo caudal y a la mañana siguiente no se observó contaminación cruzada.

Un problema en el protocolo de administración de fármacos, en particular para cribas largas que involucran varias fases larvarias, es proporcionar *E. coli* junto con el fármaco para alimentar a los nematodos. Esto es de interés principal porque al administrar fármacos, se debe evitar la contaminación cruzada de los diferentes canales, lo que interferiría con la criba. Como se observó, para caudales lo suficientemente altos, esto no es un problema, porque las vías fluidicas permanecen bien separadas. Pero mantener altos caudales durante mucho tiempo consumiría una gran cantidad de fármaco, que normalmente es muy costoso. Por lo tanto, los inventores querían encontrar un protocolo para optimizar, al mismo tiempo, la alimentación con *E. coli* y la administración del fármaco. *E. coli* se puede perfundir fácilmente en el chip incluso a caudales tan bajos como 4 nL/s. Para asegurarse de evitar la contaminación cruzada, pero con el objetivo de consumir el menor volumen de fármaco posible, se ha elegido administrar el fármaco junto con *E. coli* en un modo de perfusión continua aspirando de 4 a 8 nL/s con una jeringa. Con el fin de evaluar el caudal de los canales individuales en relación con el flujo de salida total impuesto, se midió para cada canal el tiempo de vaciado de los pocillos de 300 μL : se encontró que estos eran iguales dentro de un rango del 6 %.

Dado que con el chip microfluídico es posible cribar durante todo el ciclo de vida de *C. elegans*, es de gran interés encontrar una solución para automatizar los protocolos, permitir la reproducibilidad e incluso prever el acoplamiento con otros estándares en el cribado de fármacos. Un chip de 8 canales se adapta perfectamente a cribas multiplexadas y en serie. Uno puede imaginar cribas complejas que requerirían proporcionar secuencialmente a *C. elegans* con varias sustancias:

- Búsqueda de dianas: 1.º, reducción de genes deseados por interferencia de ARN; 2º, cribado de fármacos; 3.º,

lavado; 4.º, reducción de otros genes por iARN; 5.º, cribado de fármacos; 6.º, lavado; etc.

- Combinación de fármacos administrados en diferentes fases de desarrollo: 1.º, cribado del primer fármaco en L1; 2.º, lavado; 3.º, cribado del segundo fármaco en L2; 4.º, lavado; etc.

5 Es importante destacar que los protocolos estándar para el cribado de fármacos en pocillos evitan por completo la posibilidad de lavar sustancias. Por lo tanto, el sistema ciertamente permitirá mucha más flexibilidad para estudiar la respuesta inducida por fármacos de todas las diferentes fases de las muestras de *C. elegans*. Además, con este chip que se adapta perfectamente a cualquier fase utilizada con portaobjetos de vidrio, ya no habrá necesidad de costosas máquinas de "caja negra" para el registro automático de la señal: eventualmente cualquier laboratorio tendrá la posibilidad de elegir el sistema de obtención de imágenes más adecuado.

10 Una de las grandes ventajas del sistema es la posibilidad de cribar varios fármacos/concentraciones/dianas en paralelo usando solo una jeringa. Por lo tanto, el protocolo se puede dividir en etapas de diferente duración, durante las cuales la jeringa se mueve a diferentes velocidades. Esto permite la perfusión continua necesaria para alimentar a los gusanos y evitar la contaminación cruzada durante la administración del fármaco. Gracias a las válvulas programables, también se puede vaciar automática y rápidamente la jeringa cuando está completamente llena. De este modo, la jeringa puede realizar varios pases de succión para la misma criba sin intervención del operador. Hoy en día, muchos protocolos y robots automatizados permiten preparar placas de 96 pocillos de una manera de alto rendimiento con determinadas sustancias para ser cribadas. Buscando la interacción con dichos estándares, los inventores han usado como depósitos para las cribas las tiras de pocillos tomadas de placas de 96 pocillos.

15 Para demostrar la ventaja de tener pocas muestras de nematodos en una cámara, muchas cámaras para aumentar las estadísticas y varios canales para probar diferentes concentraciones, se ha diseñado un ensayo de motilidad capaz de realizarse en tiempo real y con un campo visual muy amplio. Se han usado varias concentraciones de un fármaco llamado tetramisol, que se sabe que paraliza a los gusanos. El objetivo del experimento fue correlacionar la concentración del fármaco con el número de gusanos paralizados a lo largo del tiempo, y trazar una curva de dosis-respuesta para este fármaco.

20 Las muestras L1 de *C. elegans* de tipo salvaje se inyectaron en el chip con el protocolo descrito anteriormente y se alimentaron durante 2-3 días para obtener gusanos adultos. Se prepararon diluciones en serie de tetramisol en los pocillos de 200 µL de una tira de 12 pocillos. Los pocillos se conectaron en la entrada y se succionaron con una jeringa desde la salida a flujos de salida totales de entre 100-200 nL/s durante 40-80 minutos. El procedimiento se registró en tiempo real para todas las cámaras al mismo tiempo usando un microscopio estereoscópico. Se usó una retroiluminación adecuada en forma de anillo para mejorar el contraste y hacer que los gusanos adultos sean mucho más claros que el fondo.

25 El análisis de la imagen se realizó luego directamente en el vídeo grabado: se contó el número de gusanos paralizados por cámara cada 10 minutos desde el comienzo de la inyección del fármaco, y se calculó el porcentaje total de gusanos paralizados por canal (1 canal = 1 concentración). Como propone la literatura, se consideró que los gusanos estaban paralizados cuando mostraban enrollamiento o absolutamente ningún movimiento. Una ventaja principal del chip con respecto a las cribas estándar en placas o pocillos de agar, y que aumenta la confiabilidad de la criba de motilidad, es que el líquido se perfunde continuamente en el chip. Esto significa que:

- la concentración de fármaco accesible a los gusanos en las cámaras permanece constante durante toda la criba;
- los gusanos son estimulados por el flujo, lo que les induce a moverse; esto evita considerar como paralizado un gusano que no se mueve solo porque está en reposo.

30 Los resultados para las concentraciones probadas se muestran en la figura 10. Como se puede ver, existe una fuerte correlación entre la cantidad de tetramisol administrado y el retraso de la respuesta de los nematodos. Se observó un comportamiento particular para la concentración de 50 µM, que inicialmente parece ser más efectiva que las concentraciones más altas, pero que no tiene un efecto siempre creciente. Esto podría deberse al hecho de que dado el número no muy grande de gusanos en el canal para esta concentración (13 muestras en total), incluso una diferencia de 1-2 gusanos al contar los paralizados puede cambiar el valor porcentual al 15 %.

35 También se trazó una curva dosis-respuesta para este fármaco usando el valor del porcentaje medio de gusanos paralizados entre 30 y 40 minutos después de la inyección de tetramisol (figura 10). Al ajustar esta curva con una función sigmoidea:

$$y = \frac{100}{1 + 10^{\text{H}_{\text{pendiente}}(\text{EC}_{50} - x)}}$$

40 se obtuvo un valor de EC₅₀ de aproximadamente 57 µM y una pendiente de Hill de aproximadamente 0,02 µM. Esta criba se ha realizado con dos chips de 4 canales, pero con un chip de 8 canales, ya que aún se ajusta a la óptica de los microscopios estereoscópicos actuales, se pueden probar hasta 7 concentraciones diferentes al mismo tiempo,

disminuyendo considerablemente el retraso en la obtención de una curva dosis-respuesta completa.

Ejemplo 2

5 **Una plataforma microfluídica automatizada para la formación de embriones de *C. elegans*, fenotipos e imágenes en vivo a largo plazo**

Para los organismos vivos, las condiciones ambientales a las que están sujetos durante la fase embrionaria son cruciales para su posterior desarrollo. *Caenorhabditis elegans* es un organismo modelo atractivo para los estudios de embriogénesis, ya que los embriones se desarrollan en cuestión de solo unas horas. Hasta ahora, la investigación se basaba en protocolos tediosos de manejo manual de modo que era imposible el análisis preciso de las poblaciones con resolución de un solo embrión. Los estudios de la dinámica en tiempo real del desarrollo embrionario requieren un procedimiento de manejo suave del embrión, la posibilidad de imágenes en vivo a largo plazo durante la embriogénesis completa, así como de la paralelización que proporciona las estadísticas de una población, mientras se mantiene la resolución de un solo embrión. Los inventores describen un enfoque automatizado que cumple plenamente estos requisitos para los embriones de *C. elegans*. La plataforma microfluídica desarrollada utiliza hidrodinámica pasiva pura para realizar cultivos de gusanos en chip, a partir de los cuales se pueden obtener poblaciones de embriones sincronizados, e inmovilizar estos embriones en micromatrices de incubadoras para obtener imágenes ópticas de alta resolución a largo plazo. El procedimiento se puede usar generalmente para la expresión de proteínas y los estudios de desarrollo a nivel embrionario, pero también puede proporcionar pistas para comprender el proceso de envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad en particular. La plataforma microfluídica no solo permite la selección automática de adultos de una población mixta de gusanos y su posterior cultivo en chip, sino que también permite la captura y el estudio automáticos, en condiciones perfectamente controladas, de los embriones que depositan.

25 Fabricación del chip microfluídico

Los dispositivos microfluídicos se prepararon mediante litografía suave usando moldes SU-8 de 2 capas. En resumen, se usó fotolitografía convencional para modelar una capa de fotorresistencia SU-8 de 35 µm de espesor en obleas de 4 pulgadas. A continuación, se modeló una capa SU-8 de 85 µm de espesor encima de la primera. El molde de silicio se cortó en cubitos en microchips de 15 mm X 18 mm, que se insertaron en la parte inferior de un molde de aluminio/polimetilmetacrilato (PMMA) para la colada de PDMS. Se utilizaron pasadores de acero de 1,5 mm de diámetro para definir las conexiones laterales del dispositivo para la inserción del tubo externo. Se desgasificó una mezcla de PDMS líquida (relación de peso base:reticulante de 10:1), se inyectó en el molde y se curó a 100 °C durante 1 h. Tras la extracción del molde, cada chip de PDMS se unió mediante activación por plasma a un cubreobjetos de vidrio de 150 µm de espesor. A continuación, el chip se conectó a un tubo externo y se encerró en un soporte de PMMA (figura 11a), diseñado para la observación del dispositivo a través de cualquier microscopio vertical o invertido y con cualquier tipo de objetivo.

40 Control del sistema y funcionamiento del dispositivo microfluídico

Un sistema de control ambiental de microscopía de células vivas (Visitron, Puchheim, Alemania) permitió controlar la temperatura del chip durante toda la duración de cada experimento. Las operaciones microfluídicas se controlaron usando el software de control de bomba de jeringa Nemesys (Cetoni, Korbussen, Alemania). Experimentalmente, el chip microfluídico se llenó primero con solución Pluronic F127, se incubó durante 30 minutos dentro del dispositivo, para evitar que la *E. coli* se adhiriera y se acumule dentro de los microcanales. Pocos gusanos de una población no sincronizada se suspendieron en 10 µL de tampón M9 y se succionaron en un tubo microfluídico, que luego se conecta al dispositivo. A partir de este momento, el sistema está completamente controlado por software, a través de las etapas secuenciales automáticas descritas en la figura 12.

50 Operación automatizada de la plataforma

En cada experimento, los gusanos y los embriones se manipulan mediante secuencias de operaciones totalmente automatizadas (figura 12). Primero se inyecta una suspensión de gusano en el dispositivo microfluídico a través del puerto superior (In1 de la figura 12a) y se dirige hacia el "filtro de sincronización de gusano" abriendo la válvula en "Out1". La geometría del chip está optimizada para retener dentro de la cámara de cultivo de gusanos solo gusanos adultos simplemente seleccionando el caudal correcto para la inyección de muestra. En la práctica, a un caudal de 500 nL/s, en unas pocas decenas de segundos, todas las larvas presentes en la suspensión se eliminan directamente del chip, mientras que los gusanos adultos se mantienen dentro de la cámara debido a su mayor tamaño y sus mejores habilidades de natación/resistencia contra el flujo (ampliación de la figura 12a). De forma alternativa, se puede inyectar una suspensión de larvas L1-L4 a un caudal de 100 nL/s para retener solo las larvas L4 dentro de la cámara. Eventualmente, el número de gusanos capturados se puede adaptar ejecutando una "etapa de lavado" opcional, donde se inyecta el tampón M9 durante unos segundos a lo largo de la dirección In1-Out1 a caudales más altos (1 a 5 µl/s). Tras el aislamiento de una población definida de gusanos dentro de la cámara, los gusanos se cultivan y pueden tratarse eventualmente en chip con fármacos o productos químicos específicos (figura 12b). Para el cultivo/tratamiento de gusanos, se inyecta una suspensión de *E. coli* en la cámara a una velocidad deseada, a través de la dirección In2-

Out2, mientras que se pueden introducir fármacos o productos químicos en el chip a concentraciones controladas e instantes precisos del ciclo de vida de los gusanos. A continuación, se usa un simple aumento de la velocidad de flujo dentro de la cámara a lo largo de la dirección In3-Out2 para transferir los huevos presentes en la cámara hacia la matriz de la incubadora de embriones. En la práctica, un flujo de 200 nL/s de tampón M9 permite recuperar todos los huevos presentes en la cámara y aislar cada uno de ellos en una única microincubadora mediante captura hidrodinámica pasiva hasta completar el llenado de la matriz (figura 12c). A continuación, se inicia una formación de imágenes por lapso de tiempo en paralelo, ya sea para la matriz completa o escaneando cada embrión individual a alta resolución, a la velocidad de fotogramas deseada, el aumento y las longitudes de onda de luz, dependiendo del análisis de interés (figura 12d). Durante la formación de imágenes en vivo, se aplica un flujo lento de 5-10 nL/s de tampón M9 a lo largo de la dirección In3-Out2 para asegurar un posicionamiento estable de los embriones en la matriz. Opcionalmente, para estudios secuenciales en poblaciones de embriones producidos por los mismos gusanos en diferentes períodos de su vida adulta completa, el cultivo de gusanos se puede mantener en la cámara mediante la perfusión de *E. coli* desde In2 dentro del chip. En este caso, las válvulas en Out1 y Out2 se dejan abiertas, y las diferentes resistencias hidrodinámicas de las dos direcciones ortogonales dan como resultado una división del flujo entre las dos salidas, con la mayor parte del líquido fluyendo a través de Out1. Esto establece un flujo lento a través de la matriz de la incubadora, asegurando un posicionamiento estable de los embriones durante largos períodos, al tiempo que reduce la acumulación de *E. coli* en el área de la matriz, lo que podría comprometer los resultados de las imágenes fluorescentes de embriones, debido a la autofluorescencia de las bacterias de *E. coli*.

20 Adquisición y procesamiento de imágenes

El chip microfluídico se integró en un microscopio invertido (Axio Observer, Zeiss) equipado con dos sistemas de iluminación: (i) un sistema de iluminación LED precisExcite de alta potencia (Visitron, Puchheim, Alemania) para imágenes de campo claro y (ii) un sistema de iluminación Lambda DG4 (instrumentos Sutter, Novato, CA, EE. UU.) para imágenes de fluorescencia. El microscopio tenía una fase xy motorizada, equipada con un controlador piezoeléctrico ASI para desplazamiento en z (Visitron, Puchheim, Alemania) y el proceso de obtención de imágenes automatizado se controló usando el software de adquisición de imágenes VisiView Premier (Visitron, Puchheim, Alemania). Para comenzar el proceso de obtención de imágenes automatizado, la posición del primer huevo en la matriz se estableció como punto inicial del escaneo de fase xy, mientras que las ubicaciones de los otros huevos se determinaron automáticamente por la interdistancia entre incubadoras adyacentes (118 μm). Se estableció un "programa de longitud de onda" en el software, para cambiar automáticamente entre los modos de obtención de imágenes de campo brillante y fluorescente, controlando ambos sistemas de iluminación. Los programas de "lapso de tiempo" y "posición de fase" se configuraron para realizar automáticamente el escaneo y la obtención de imágenes sobre la matriz completa a una velocidad deseada, lo que resultó en imágenes paralelas de lapso de tiempo de todos los embriones. Para evitar los efectos de fototoxicidad durante estos experimentos de obtención de imágenes de fluorescencia, el tiempo de exposición del embrión a la luz de excitación fluorescente ($t < 100$ ms) se minimizó y las imágenes se registraron en un solo plano focal del microscopio (es decir, en un solo valor z), a pesar de la posibilidad de tomar pilas z con la configuración propuesta. El movimiento del embrión dentro de su cáscara de huevo durante la fase de contracción a veces podría introducir modulaciones instantáneas en la intensidad fluorescente recolectada, debido al posicionamiento dependiente del tiempo de la larva en desarrollo dentro del volumen focal del objetivo del microscopio, pero se mantuvieron relativamente pocas variaciones de la intensidad fluorescente promedio del embrión en un plano xy dado. Se escribió una secuencia de comandos sencilla de Matlab (Mathworks, Natick, MA, EE. UU.) para reordenar la gran cantidad de datos de cada experimento de acuerdo con las coordenadas xz de la imagen, el tiempo, la longitud de onda de la luz y el tiempo de exposición. El procesamiento de imágenes se realizó con el software Fiji.

50 Diseño de plataforma y operación automatizada

La robustez y la automatización del sistema dependen completamente de la hidrodinámica pasiva, sin necesidad de ningún componente activo en el chip, tal como las válvulas integradas. Este enfoque permite simplificar los protocolos fluidicos y minimizar significativamente las restricciones de fabricación del dispositivo, que simplemente consiste en un chip microfluídico de polidimetilsiloxano (PDMS) monolítico, sellado a un cubreobjetos de vidrio de 150 μm de espesor. El chip microfluídico presenta dos componentes principales: una "cámara de cultivo de gusanos" y una "matriz de incubadora de embriones" (figura 11a, bi). El control de flujo externo a través de cuatro entradas independientes se logra a través de bombas de jeringa controladas por ordenador, mientras que dos válvulas externas se usan para abrir y cerrar dos salidas separadas. La cámara de cultivo de gusanos está delimitada por disposiciones de canales microfluídicos específicos para generar distribuciones de flujo uniformes en la cámara y para filtrar entidades de diferente tamaño (figura 11bii): un "filtro de inyección de gusanos", para la inserción suave de suspensiones mixtas de gusanos en la cámara; un "filtro de sincronización de gusanos", para seleccionar la edad de la población de gusanos que se va a analizar, reteniendo solo gusanos adultos o larvas L4 dentro de la cámara; un "filtro de administración de *E. coli*/fármacos", para introducir de manera homogénea soluciones de alimentación y tratamiento dentro de la cámara; un "filtro de transferencia de embriones", para desplazar de manera confiable los embriones de la cámara a la matriz de la incubadora de embriones tras poner los huevos. La matriz de la incubadora de embriones consiste en un canal serpentina en el que cada par de ramas está conectado por microcompartimentos aislados, diseñados específicamente para la captura de embriones de *C. elegans* y su obtención de imágenes de alta resolución a través del cubreobjetos de vidrio (figura 11biii). Los embriones, que se transfieren a la matriz de la incubadora de embriones, se colocan

automáticamente en las microincubadoras mediante captura hidrodinámica pasiva (figura 11c). El diseño de esta sección del chip está optimizado de acuerdo con las reglas generales de microfluidos y las necesidades específicas relacionadas con las características de los embriones

5 *C. elegans*. En general, el diseño fluídico da como resultado una mayor eficiencia de captura y un posicionamiento estable de embriones individuales, con un rendimiento sin precedentes en términos de control y confiabilidad del mecanismo de captura de objetos no esféricos. La distribución del caudal dentro de la matriz debe garantizar la captura de un solo embrión para cada microincubadora. Dado que el número de embriones disponibles está limitado por la producción de huevos dentro de la cámara, se debe establecer una eficiencia perfecta del procedimiento de captura hidrodinámica para recuperar todos los huevos. Al mismo tiempo, sin embargo, la alta eficiencia de captura se asocia típicamente a presiones fluídicas más altas a través de las microincubadoras. Por lo tanto, las fuerzas ejercidas sobre los huevos incubados también deben considerarse para evitar que el flujo introduzca tensiones mecánicas no deseadas en los embriones capturados.

15 La geometría de las microincubadoras desempeña un papel crucial para el rendimiento del sistema, por lo que se han fabricado y probado diferentes tipos de microincubadoras. Para obtener imágenes de lapso de tiempo en paralelo de alta resolución de toda la población de embriones y el procesamiento automatizado de imágenes, todos los embriones deben estar perfectamente dispuestos en posiciones estables y mantenerse correctamente alineados y bien orientados durante varias horas. El tamaño y la forma de la incubadora se optimizaron principalmente de acuerdo con estas necesidades, con un diseño final con incubadoras semicirculares alargadas, que tienen 35 μm de ancho, 38 μm de largo y 35 μm de alto (figura 11d). Usando estas dimensiones, los embriones individuales pueden posicionarse y alinearse de manera confiable dentro de la matriz de la incubadora (figura 11e). Toda la matriz de incubadoras presenta 20 microincubadoras, que se llenan progresivamente con embriones tan pronto como se depositan naturalmente. Este número se elige para proporcionar estadísticas de datos significativas para cada experimento, mientras se mantiene un buen nivel de sincronización de edad entre todos los embriones en la matriz. Para un cultivo de gusanos, que está en la cima de su producción de huevos, el llenado completo de las matrices de la incubadora generalmente toma alrededor de 1 hora. A continuación, se estudia toda la población de embriones usando imágenes multidimensionales totalmente automatizadas, que cubren seis dimensiones independientes: las 3 coordenadas espaciales, el tiempo de desarrollo, la duración de la exposición (campo brillante, fluorescente) y el número de embriones en la matriz (figura 30 11f).

Análisis automatizado de la morfogénesis embrionaria

Un sistema de control ambiental de microscopía mantiene una temperatura constante en el chip (típicamente 25 °C) durante toda la duración de cada experimento. Se utiliza una fase de posicionamiento xy automatizada para escanear secuencialmente todas las posiciones de interés en la matriz de la incubadora de embriones. Los embriones se pueden monitorear a resolución celular a través de un objetivo de inmersión en aceite NA 1.4 de 63x, lo que permite una observación y análisis precisos de las fases de morfogénesis embrionaria de *C. elegans* (figura 13a) durante todo el período de tiempo, desde la captura del huevo hasta la eclosión (figura 13b). Se pueden distinguir dos eventos clave con cambios morfológicos claramente diferentes en la forma del embrión: (i) la aparición de la llamada "fase de frejol", el comienzo de la morfogénesis (figura 13c, arriba), y (ii) la aparición de la "fase de 1,5 pliegues", seguido del inicio de la contracción (figura 13c, medio). Junto con la eclosión de los huevos (figura 13c, abajo), estos cambios morfológicos podrían detectarse mediante códigos de reconocimiento de patrones controlados por software, para la automatización completa del procesamiento de imágenes. La plataforma permitió una medición precisa de la duración de estas fases para embriones individuales de tipo salvaje N2 a 25 °C (figura 13di). La aparente variabilidad es una indicación de las variaciones en el momento exacto de la puesta de huevos (y la posterior captura) de cada embrión, lo que representa otro fenotipo interesante para estudiar también con este procedimiento. La duración promedio de las fases de desarrollo podría monitorearse con buena precisión, incluso a partir de este experimento de matriz única (figura 13dii). Además, como los gusanos pueden cultivarse y mantenerse en el mismo chip durante varios días, demuestra la capacidad del dispositivo para ser empleado para estudiar los cambios relacionados con la edad en la reproducción de gusanos y el desarrollo de la progenie.

Finalmente, la posibilidad de un tratamiento químico o farmacológico en chip automatizado se ha validado exponiendo a los gusanos al fármaco anticancerígeno 5-fluorouracilo (5-FU). Este compuesto induce la detención del ciclo celular y la apoptosis de las células de la línea germinal en *C. elegans*. Los gusanos de tipo salvaje se aislaron en la cámara de cultivo en la fase larval L4 y se trataron en chip con 5-FU a una concentración de 2 mM, mientras se cultivaban a 25 °C hacia la fase adulta. Posteriormente, los embriones fueron transferidos a la matriz de la incubadora y monitoreados durante 12 horas. Todos los embriones murieron prematuramente, lo que demuestra la eficacia de la exposición al fármaco de los gusanos en la cámara de cultivo del chip (figura 13e). En la plataforma, una población embrionaria de *C. elegans* bien definida y sincronizada puede aislarse de un cultivo de gusanos en chip y estudiarse de forma totalmente automatizada con una resolución espacial y temporal extremadamente alta. El dispositivo permite la operación y el análisis a nivel de organismo único, preservando así la identidad de cada embrión individual, al tiempo que proporciona estadísticas de la población completa.

65 Se ha demostrado, a través del dispositivo, la capacidad de analizar con precisión la dinámica en tiempo real de las diferentes fases del desarrollo embrionario, monitorear la expresión de proteínas vivas en embriones en desarrollo

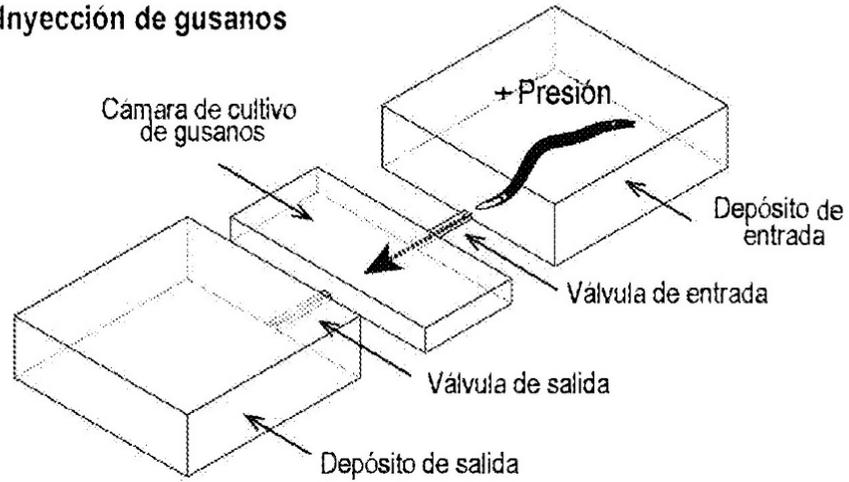
- 5 durante la embriogénesis completa y realizar estudios sistemáticos que aborden cuestiones destacadas de la biología del desarrollo. En el futuro, debido a la alta versatilidad del diseño de la plataforma, su capacidad de obtención de imágenes en vivo se puede ampliar fácilmente para incluir otros tipos de microscopías, como la microscopía de contraste de interferencia diferencial, para la obtención de imágenes en vivo de campo claro de alto contraste y la microscopía confocal para lograr una extrema resolución espacial. El procesamiento de imágenes mejorado por ordenador se puede utilizar para ampliar aún más las posibilidades analíticas de esta plataforma para el cribado embrionario en tiempo real y la fenotipificación, o incluso el linaje celular automatizado y el perfil de expresión en los embriones en desarrollo.
- 10 Al igual que en la plataforma, los gusanos se cultivan directamente en el chip y los embriones se analizan mediante la puesta espontánea de huevos, se conserva toda la información relacionada con el proceso de reproducción natural, manteniendo el vínculo entre los padres y la progenie. Por lo tanto, la plataforma también es adecuada para investigar las propiedades transgeneracionales de los embriones y, con alguna adaptación del diseño microfluídico, incluso estudiar la descendencia y las huellas epigenéticas en las sucesivas generaciones de gusanos. Los dispositivos para
- 15 nematodos parásitos relacionados pueden diseñarse fácilmente reajustando el tamaño de la incubadora, por ejemplo, para estudiar los efectos de los fármacos antiparasitarios. Finalmente, se podría esperar que se usen diseños microfluídicos similares para llevar a cabo la obtención de imágenes en vivo de una multitud de eventos de desarrollo, como la gastrulación y la morfogénesis de los tejidos durante la embriogénesis en otras especies de nematodos u otros organismos modelo.

REIVINDICACIONES

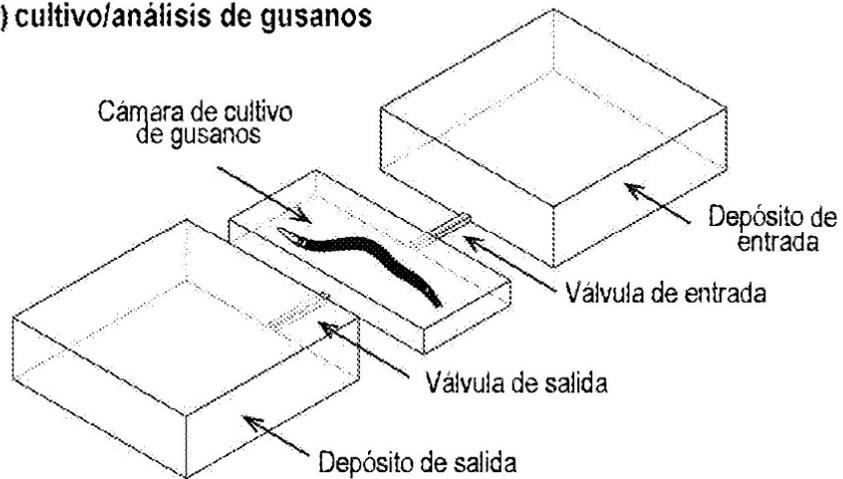
1. Un procedimiento para cultivar una población de organismos de muestra que comprende:
- 5 • proporcionar una población de organismos de muestra en un medio de cultivo de fluido dentro de al menos un depósito de entrada;
 - aplicar al menos una presión de pulso a al menos un depósito de modo que el medio de cultivo de fluido y al menos un organismo de muestra pueda pasar de al menos un depósito de entrada a al menos una cámara de cultivo a través de al menos una válvula de entrada pasiva; y
 - 10 • cultivar los organismos de muestra aplicando una presión a al menos un depósito de modo que solo el medio de cultivo de fluido pueda pasar a través de la(s) válvula(s) de entrada pasiva desde al menos un depósito de entrada a todos los elementos del dispositivo en conexión fluidica entre ellos.
2. Un procedimiento para cultivar y analizar una población de organismos de muestra que comprende:
- 15 • proporcionar una población de organismos de muestra en un medio de cultivo de fluido dentro de al menos un depósito de entrada;
 - aplicar al menos una presión de pulso a al menos un depósito de modo que el medio de cultivo de fluido y al menos un organismo de muestra puedan pasar de al menos un depósito de entrada a al menos una cámara de cultivo a través de la(s) válvula(s) de entrada pasiva;
 - 20 • cultivar los organismos de muestra aplicando una presión a al menos un depósito de modo que solo el medio de cultivo de fluido pueda pasar a través de la(s) válvula(s) de entrada pasiva desde al menos un depósito de entrada a todos los elementos del dispositivo en conexión fluidica entre ellos; y
 - analizar los organismos de muestra detectando parámetros específicos o características fenotípicas y/o conductuales de los mismos.
 - 25
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la presión de pulso es tal que solo los organismos de muestra de un tamaño específico pasan a través de la(s) válvula(s) de entrada pasiva.
4. Un procedimiento para cribar compuestos activos que comprende:
- 30 • proporcionar una población de organismos de muestra y un medio de cultivo de fluido para el cultivo de los mismos dentro de un depósito;
 - aplicar una presión de pulso a dicho depósito de modo que el medio de cultivo de fluido y al menos un organismo pasen de dicho depósito a la al menos una cámara de cultivo a través de la(s) válvula(s) de entrada pasiva
 - 35 • proporcionar un compuesto activo para ser cribado en al menos un depósito de entrada;
 - aplicar una succión desde al menos un depósito de salida; y
 - monitorear el efecto del compuesto activo en el organismo de muestra dentro de la cámara de cultivo
- 40 en el que la succión es tal que el organismo de muestra no puede pasar a través de la(s) válvula(s) de salida pasiva.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que al menos un depósito de entrada comprende un medio de cultivo para el organismo de muestra.
6. El procedimiento de las reivindicaciones 4 o 5, en el que la presión de pulso es tal que solo los organismos de muestra de un tamaño específico pueden pasar a través de la(s) válvula(s) de entrada pasiva.
7. El procedimiento de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el sistema comprende al menos 2 cámaras de cultivo adyacentes, cada una conectada con un depósito de entrada.
- 50 8. El procedimiento de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el sistema comprende uno o más canales adyacentes de cámaras de cultivo consecutivas, estando conectado cada canal con un depósito de entrada a través de la cámara proximal.

FIG. 1

(i) Inyección de gusanos



(ii) cultivo/análisis de gusanos



(iii) extracción de gusanos

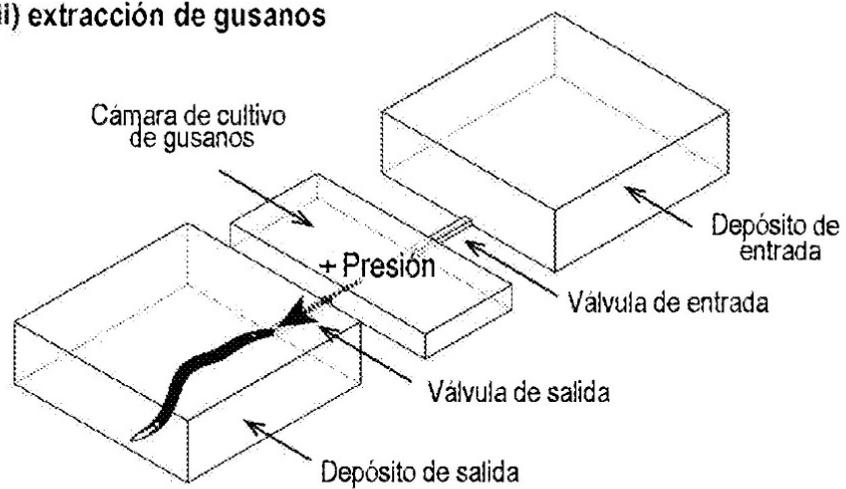


FIG. 2

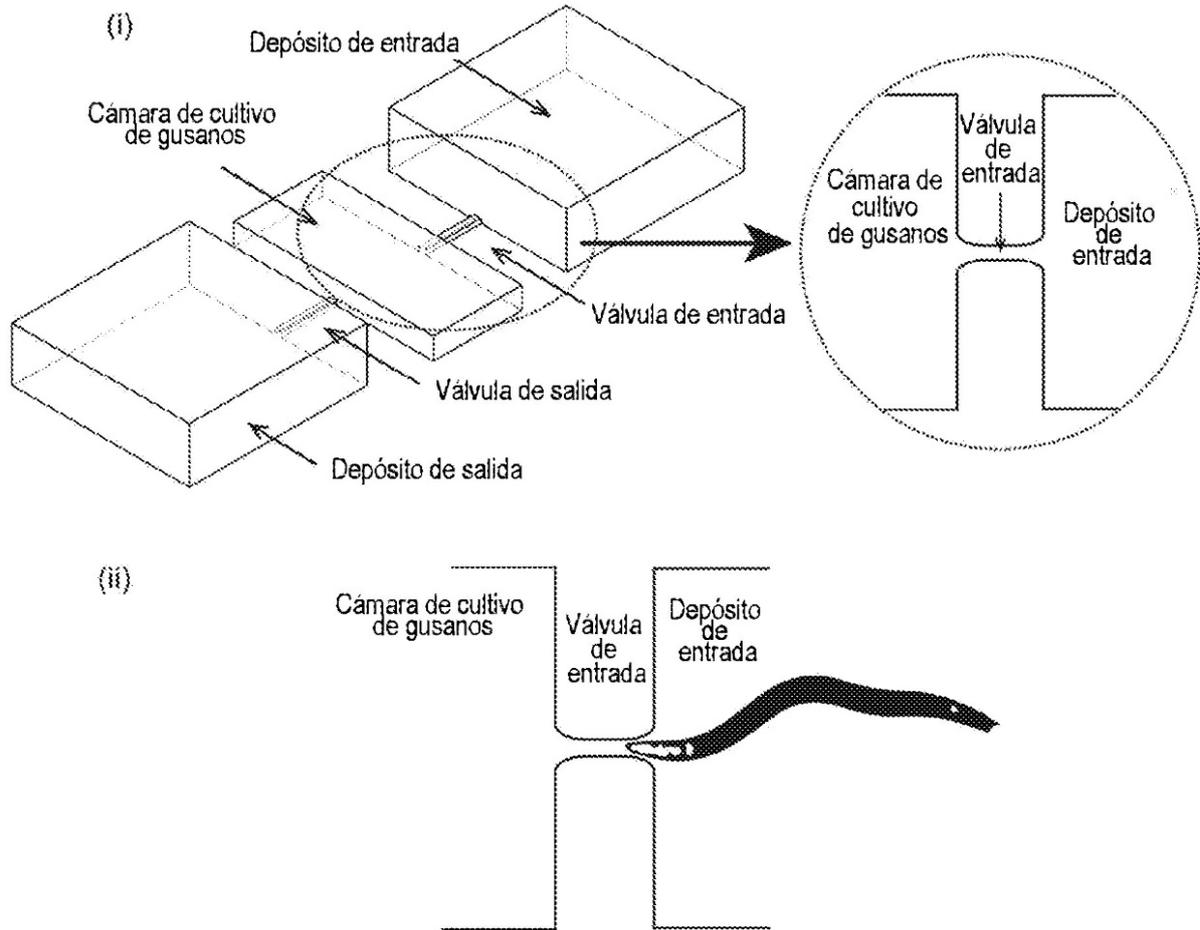
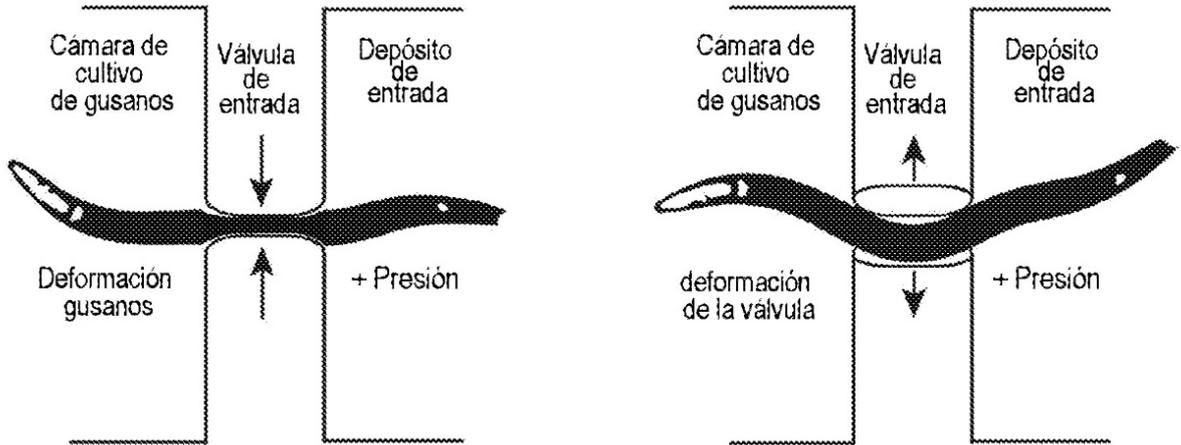


FIG. 2 (continuación)

(iii)



(iv)

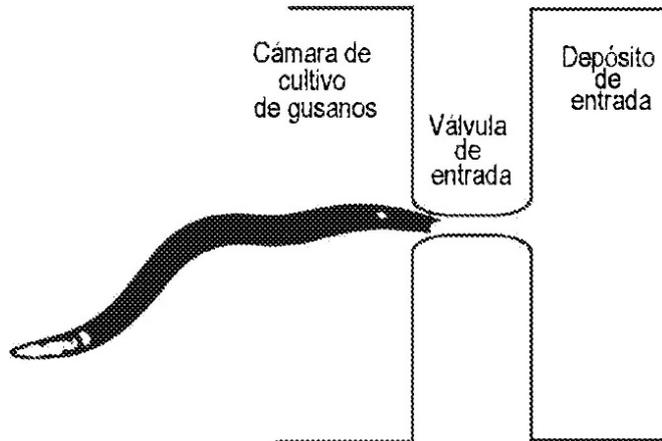


FIG. 3

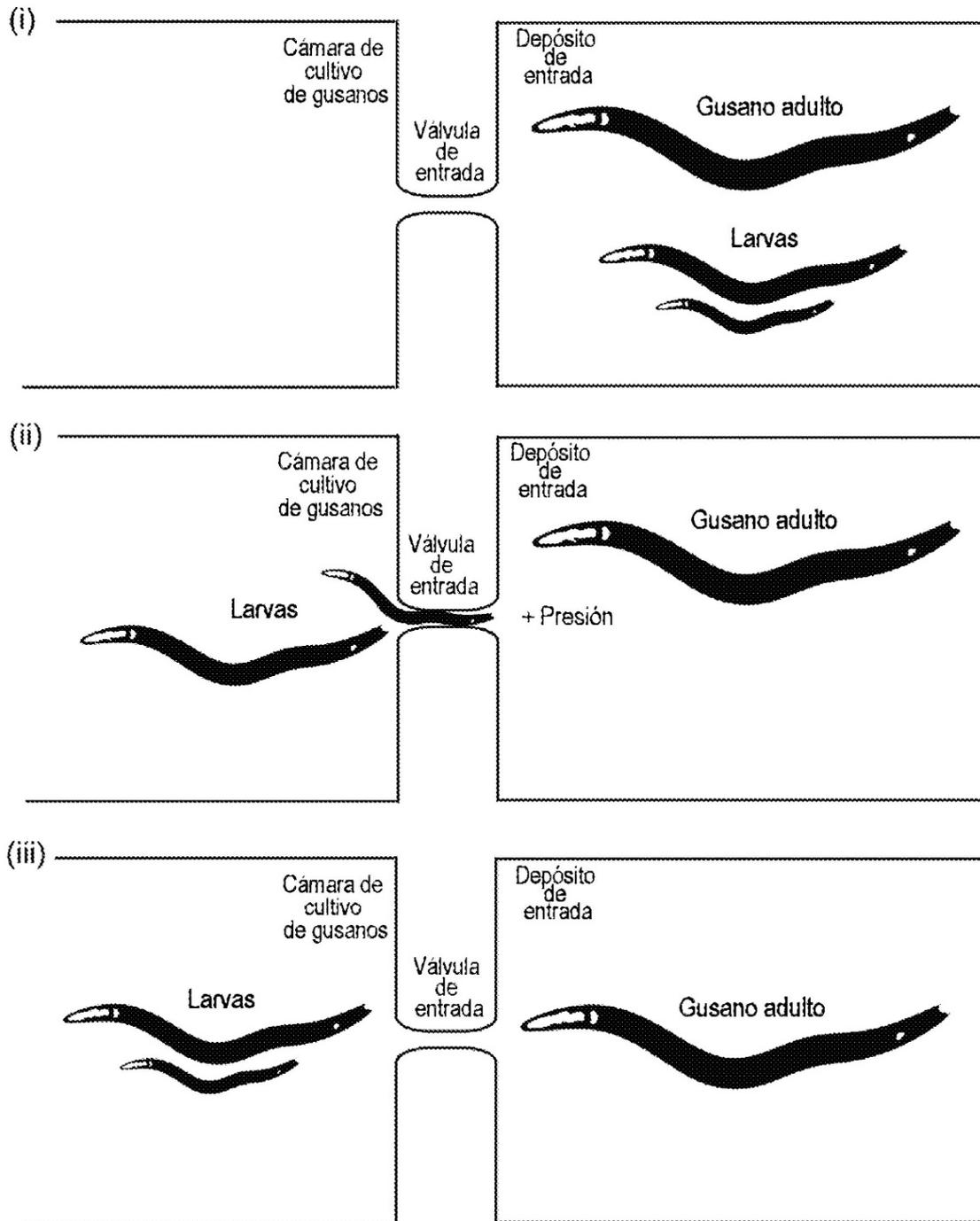


FIG. 4

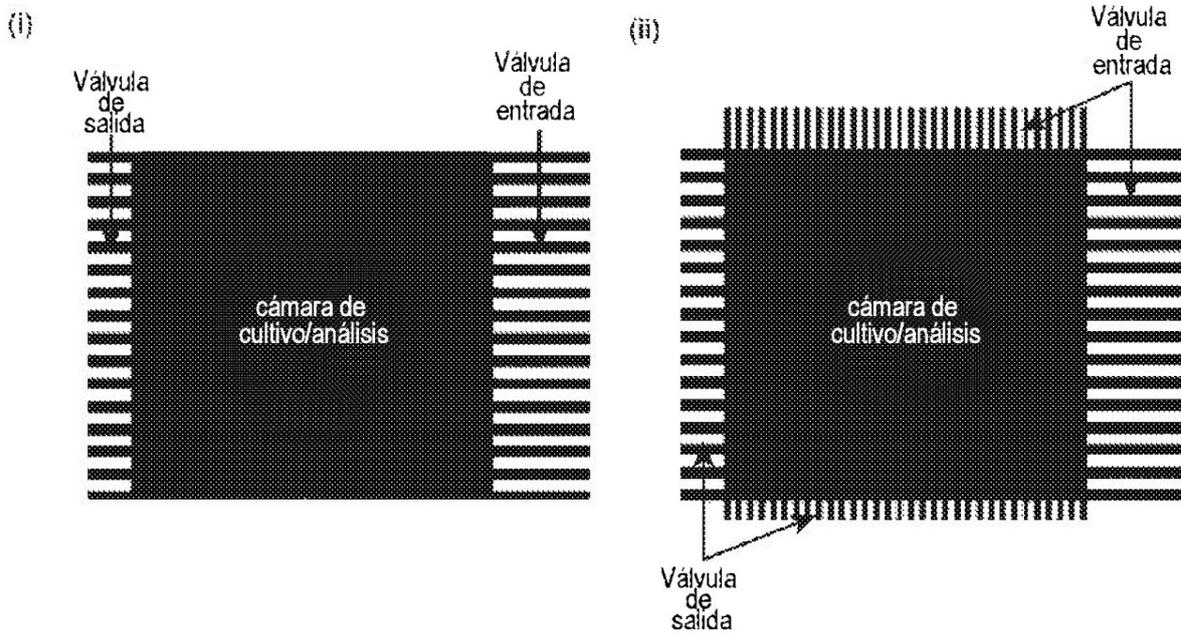


FIG. 5

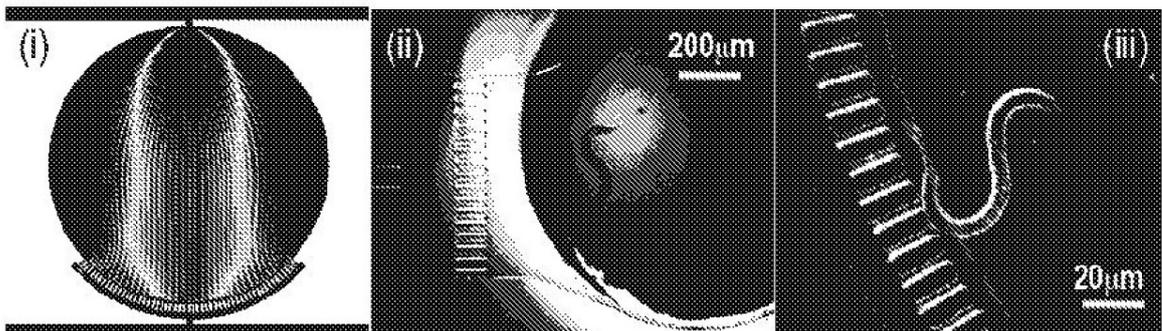


FIG. 6

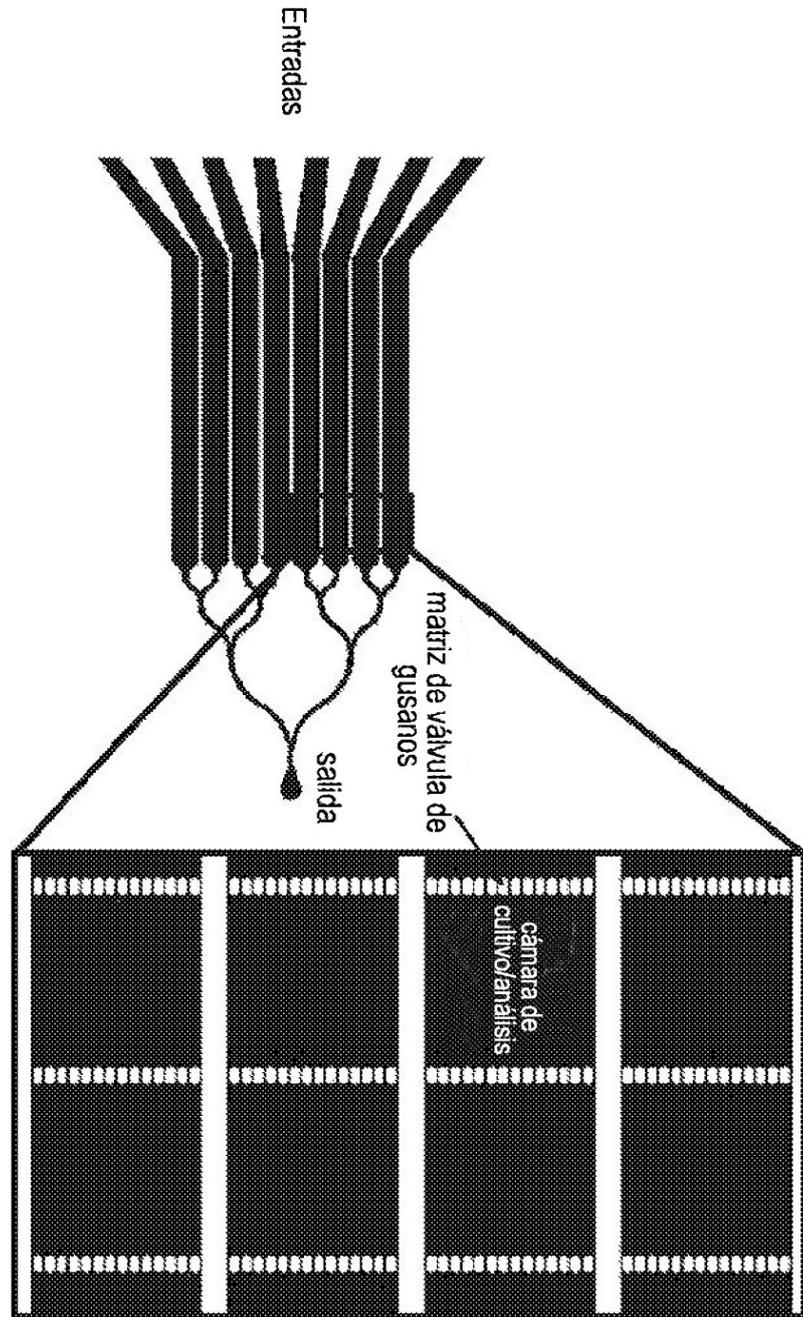


FIG. 7

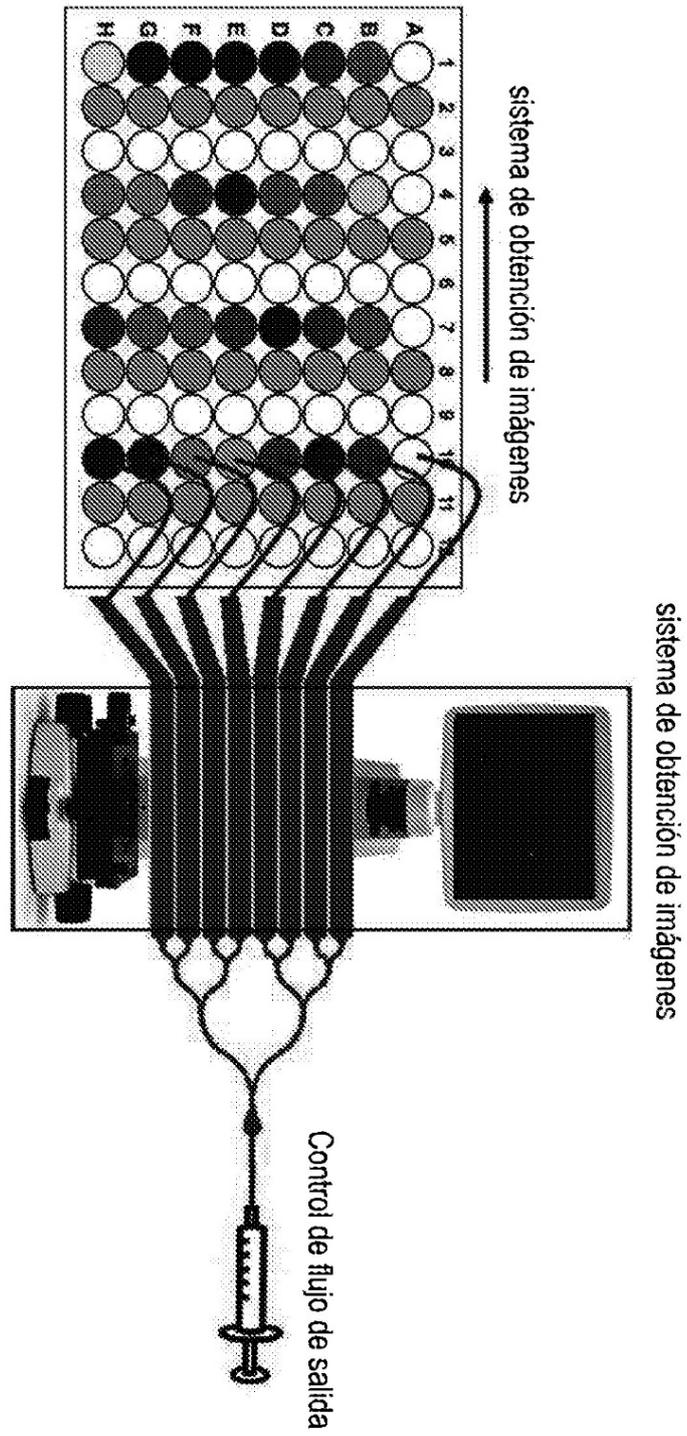


FIG. 8

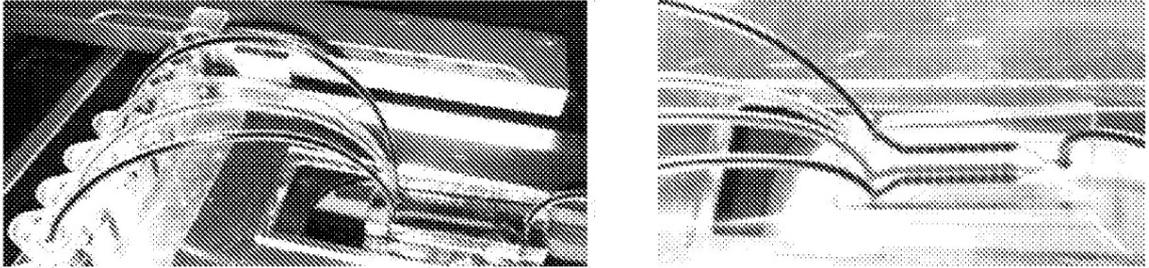


FIG. 9

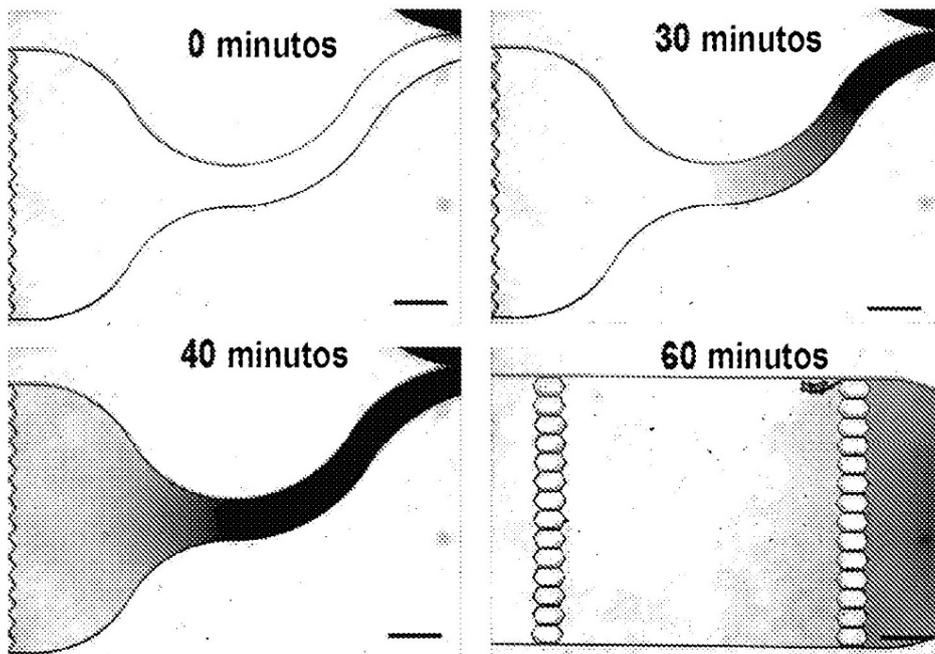


FIG. 10

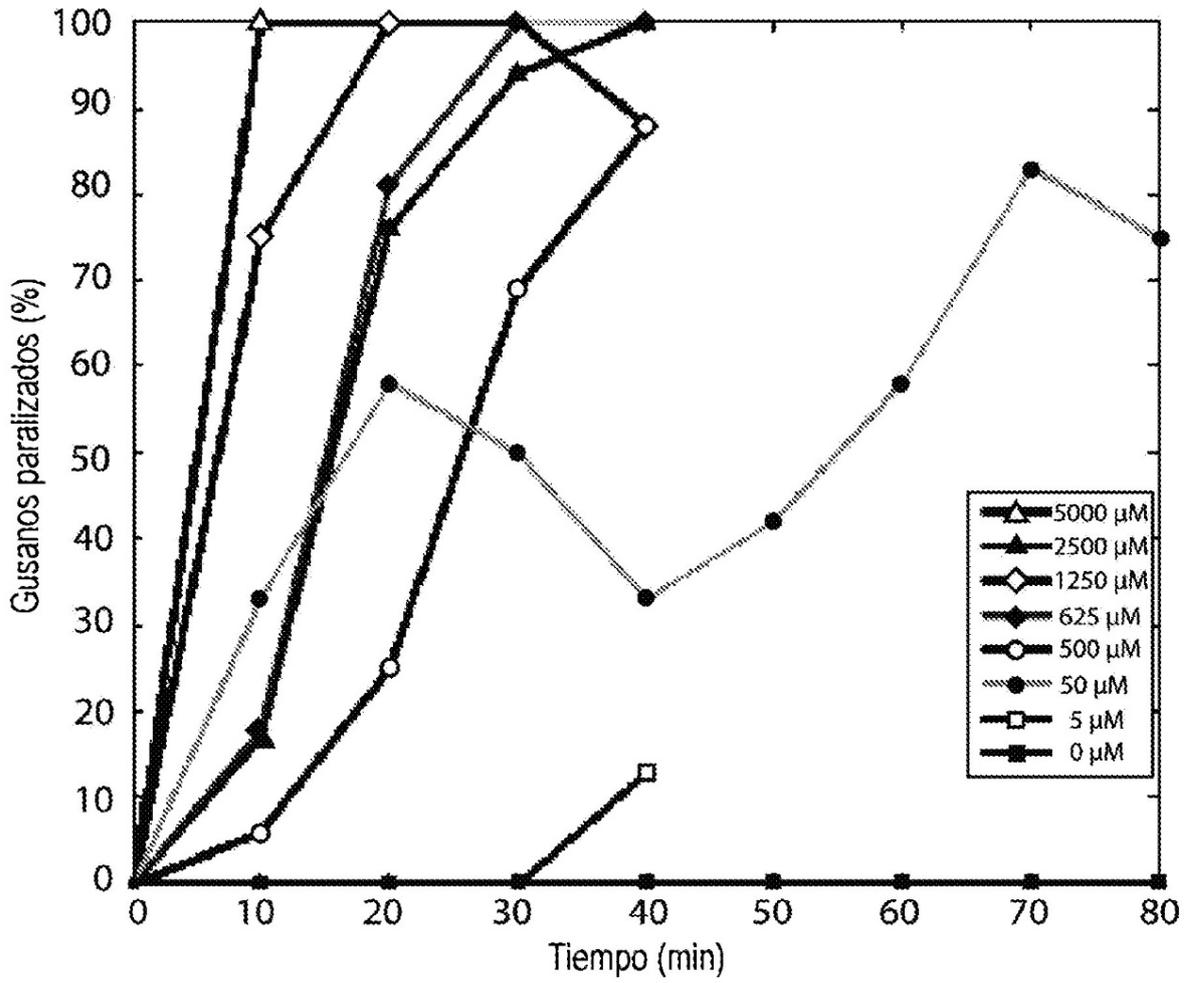


FIG. 10 (continuación)

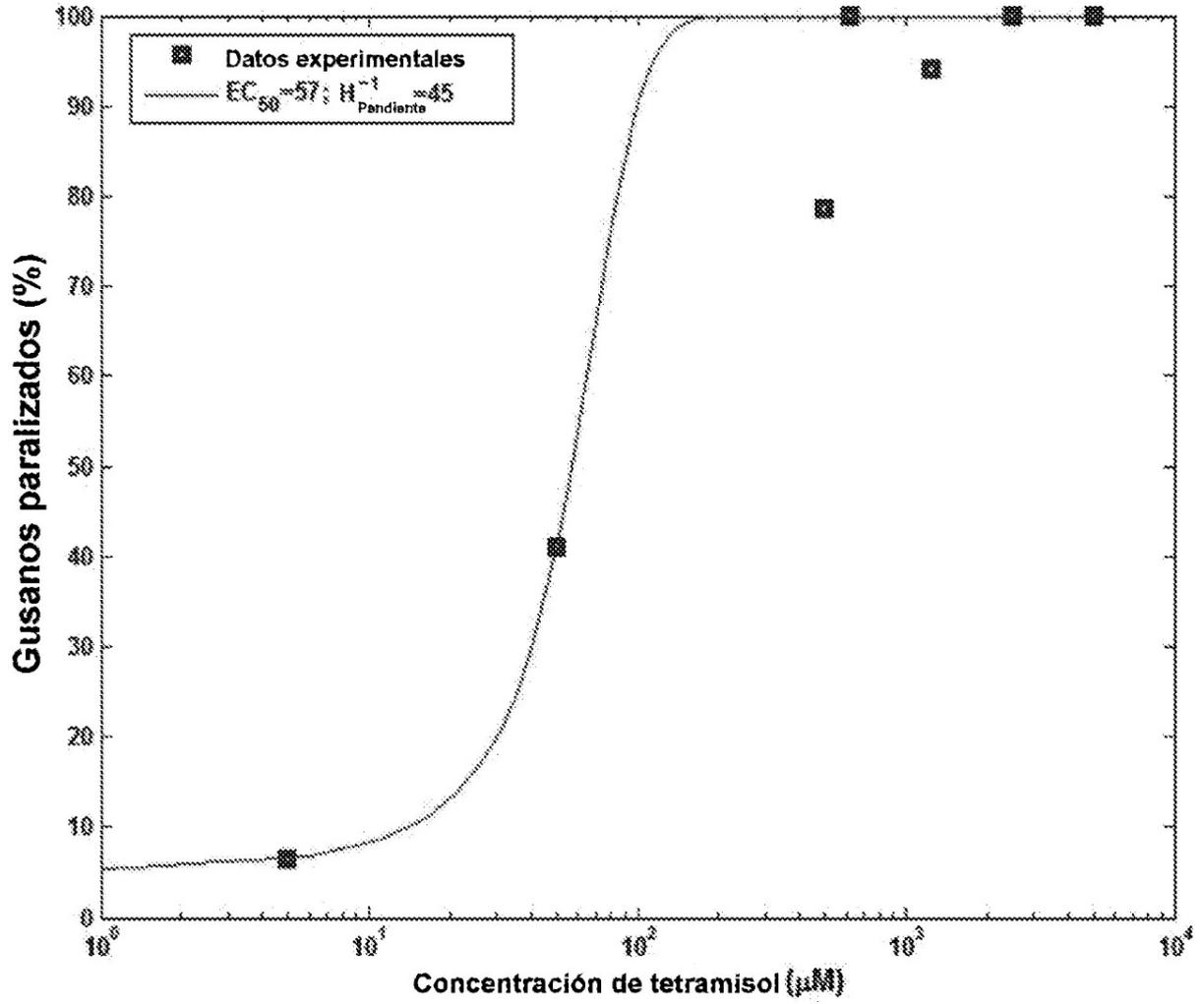


FIG. 11

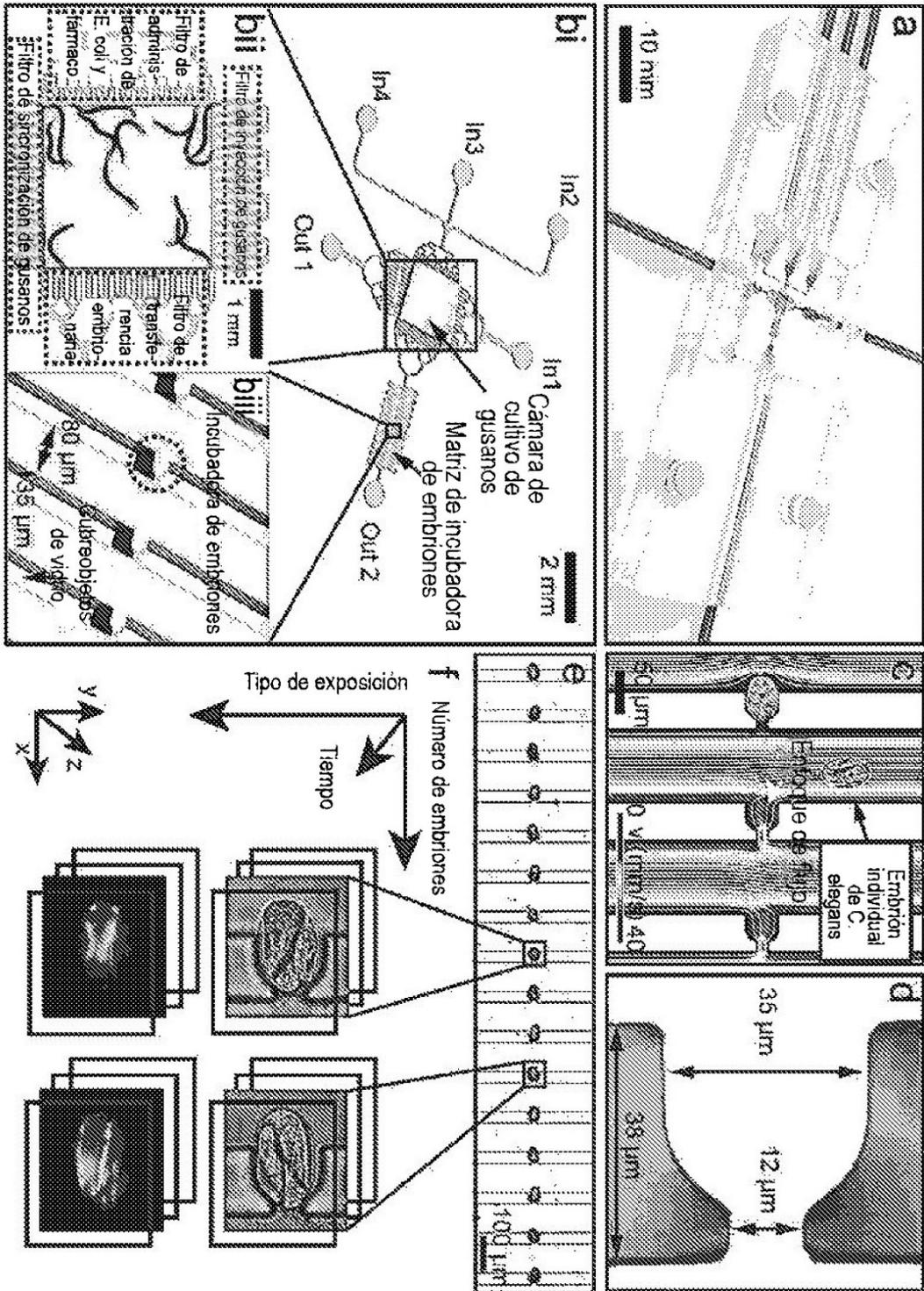
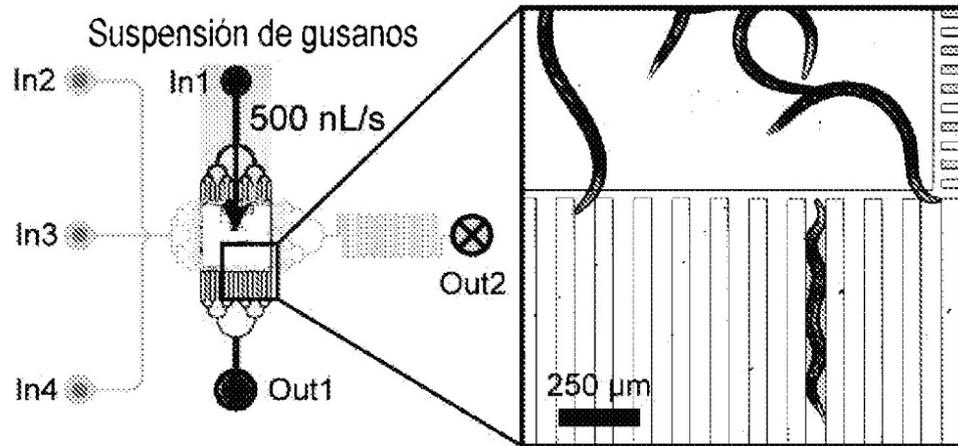


FIG. 12

a Sincronización de población de gusanos



b Cultivo/tratamiento de gusanos en chip

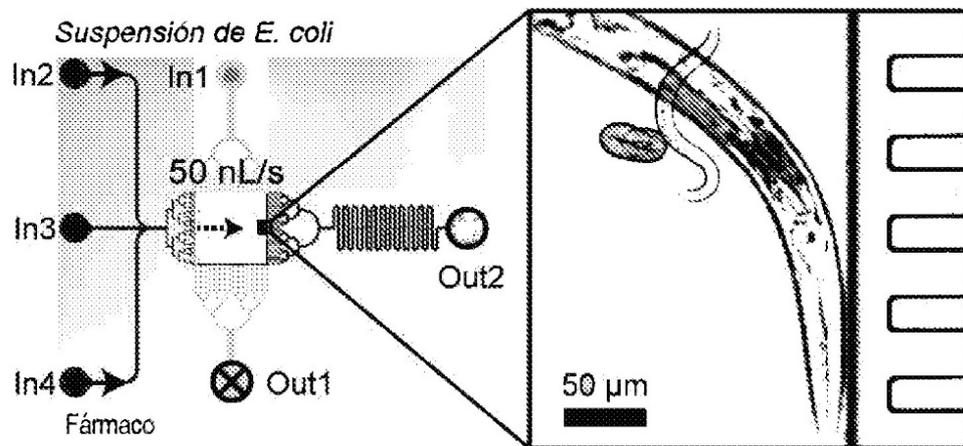


FIG. 12 (continuación)

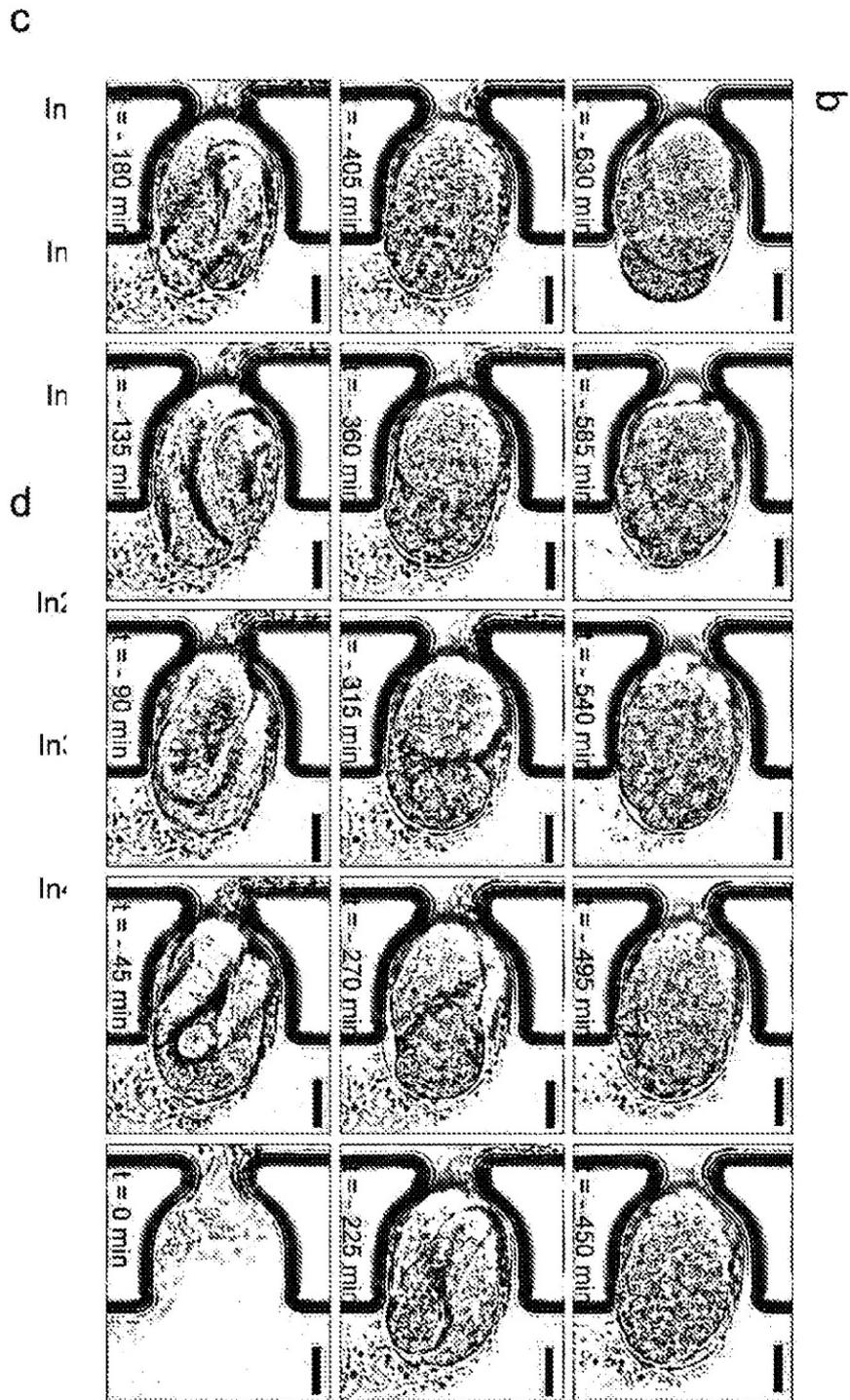


FIG. 13

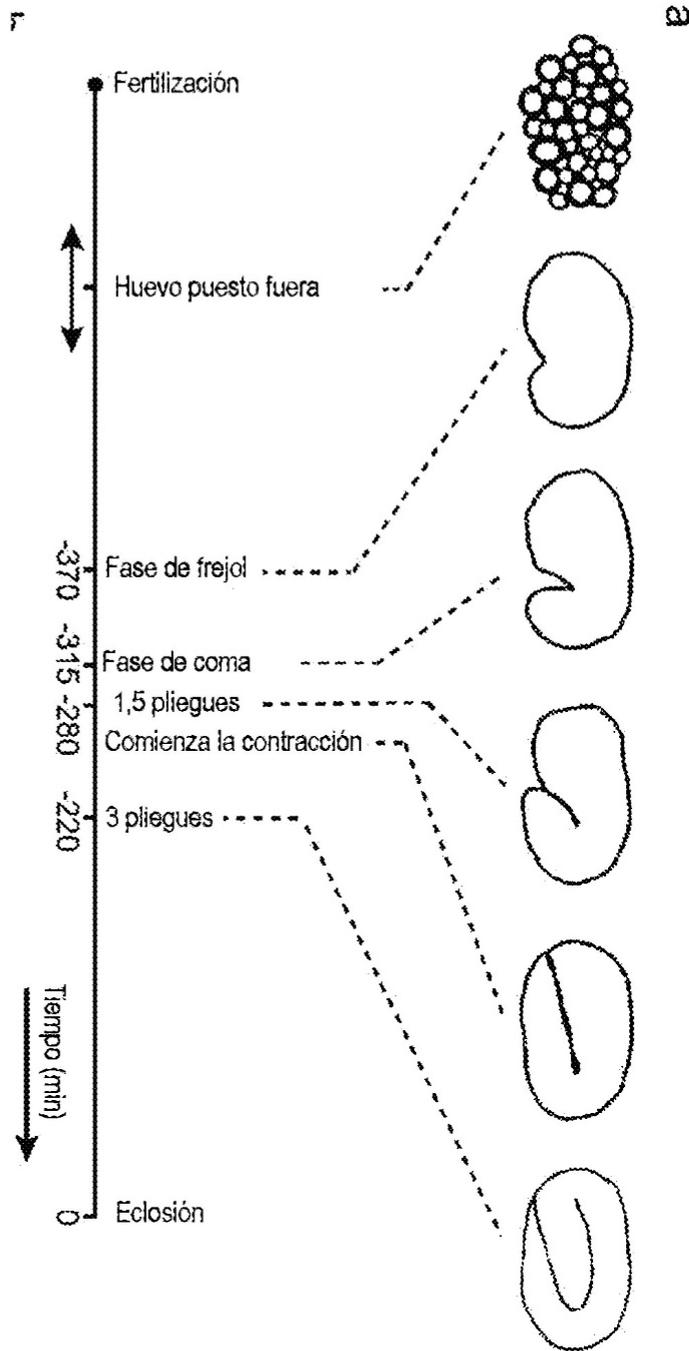


FIG. 13 (continuación)

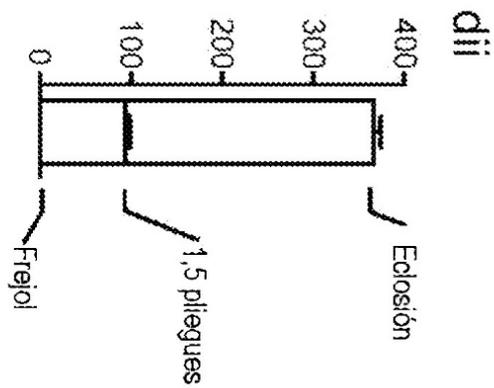
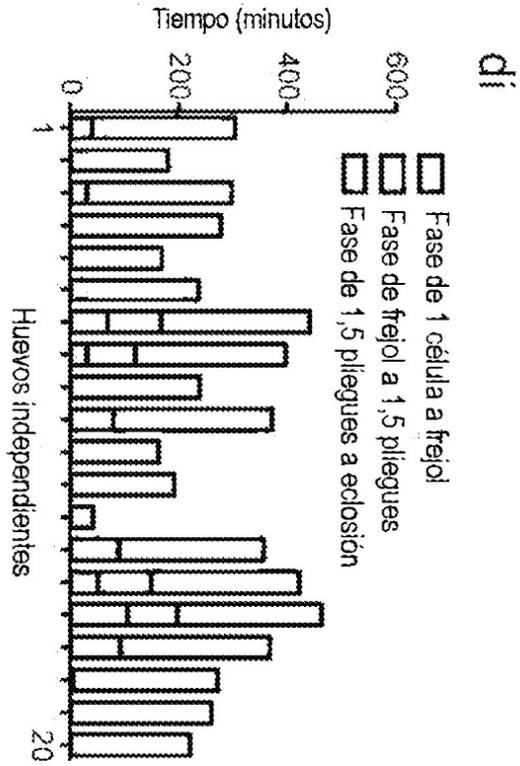
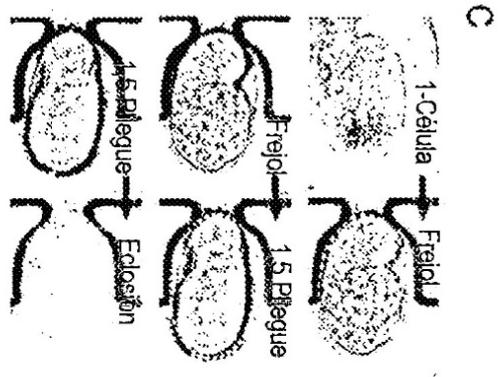


FIG. 13 (continuación)

