

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 827**

51 Int. Cl.:

G06K 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2010 PCT/US2010/031055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10120898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2010 E 10765101 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2419862**

54 Título: **Sistema para evaluar la eficacia de los glóbulos rojos almacenados utilizando redes microvasculares**

30 Prioridad:

14.04.2009 US 386108

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

30.11.2020

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY
(100.0%)**

**One Silber Way
Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

**SHEVKOPLYAS, SERGEY;
YOSHIDA, TATSURO y
BITENSKY, MARK**

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 796 827 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

5 Sistema para evaluar la eficacia de los glóbulos rojos almacenados utilizando redes microvasculares

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 1. Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a un sistema y a un procedimiento para la medición de la eficacia de los glóbulos rojos almacenados utilizando dispositivos microvasculares. Más particularmente, la presente invención se refiere a dispositivos microvasculares que simulan las redes capilares y su función fisiológica y dispositivos de medición que miden los criterios de una muestra de sangre previamente almacenada para determinar la eficacia de la muestra antes de la transfusión.

20 2. Descripción de la técnica relacionada

25 En los últimos años, varios estudios clínicos han cuestionado seriamente la seguridad y la eficacia de la transfusión de glóbulos rojos (RBC por sus siglas en inglés de "Red Blood Cells") almacenados en una variedad de situaciones clínicas [Koch et al. 2008; Weinberg et al. 2008; Murphy et al. 2007, 2008; Zimrin y Hess 2009]. Durante el almacenamiento refrigerado, los glóbulos rojos pierden ATP, membrana y volumen, cambian de forma, demuestran una reducción significativa de la deformabilidad y, como resultado, pueden no ser aptos para la circulación [Hess y Greenwalt 2002; Zimrin y Hess 2009; Timmouth y Chin-Yee 2001].

30 Si se transfunden, estas células pueden disminuir el suministro local de oxígeno al retrasar el flujo sanguíneo a través de vasos más grandes y al tapar o eludir los capilares de las redes microvasculares y, en última instancia, causar isquemia de tejidos y órganos terminales críticos [Murthy et al. 2007; Tsai et al. 2004]. Hasta ahora, los médicos no han podido predecir qué tan bien los glóbulos rojos de un dispositivo particular de sangre almacenada perfundirán la microvasculatura del paciente que recibe la transfusión.

35 La solicitud de patente WO2004/078029 describe una unidad de red que comprende una entrada de unidad de red única y una salida de unidad de red única y una pluralidad de microcanales, en donde al menos un microcanal principal se ramifica en dos microcanales secundarios de diámetro y ancho desiguales, el ángulo de ramificación es de 90 grados con relación al eje principal del canal principal, la unidad de red comprende además al menos un microcanal convergente que converge desde dos microcanales en un ángulo de 90 grados con respecto al eje de al menos uno de los microcanales convergentes.

45 Además, la solicitud también describe un sistema que comprende unidades de red dispuestas en paralelo y servidas por una matriz de distribución ascendente y una matriz de salida descendente. El documento "Direct measurement of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device" ["Medición directa de la deformabilidad eritrocitaria alterada en la perfusión de la red microvascular en un dispositivo microfluídico"] (S. Shevkoplyas et al.) en *Lab Chip*, 2006, 6, 914-920 desvela una unidad de red con una topología similar a la microcirculación real.

50 Los glóbulos rojos humanos (RBC) son discos bicóncavos de 8 μm de diámetro altamente deformables llenos de una solución concentrada de hemoglobina y ajustados por la evolución para realizar su tarea principal: el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. Para lograr lo anterior, los glóbulos rojos deben pasar a través de las intrincadas redes de vasos sanguíneos microscópicos que impregnan cada tejido y órgano del cuerpo humano. Al navegar a través de las redes microvasculares (vasos que varían de 100 a 3 μm de diámetro) a hematocritos fisiológicamente altos, los glóbulos rojos deben sufrir una amplia gama de deformaciones. Tales deformaciones incluyen plegamiento en capilares pequeños y deformaciones de corte en grandes vasos de la microcirculación. La eficiencia del suministro de oxígeno en todo el cuerpo está determinada por el nivel de perfusión de las redes microvasculares, que a su vez depende de la aptitud microvascular de los glóbulos rojos.

55 Hasta la fecha, se ha desarrollado una gran cantidad de técnicas experimentales destinadas a cuantificar la capacidad de los glóbulos rojos para deformarse en diversas condiciones, incluyendo ectocitometría, aspiración de micropipetas, filtración a través de un filtro de policarbonato o malla de níquel, filtración de un solo poro, arrastre con pinzas ópticas y pasajes a través de conjuntos paralelos de microcanales capilares.

60 Cada uno de estos procedimientos permite examinar el comportamiento de los glóbulos rojos en respuesta

a un modo particular de deformación. Si bien proporciona información valiosa sobre las propiedades reológicas de los glóbulos rojos en el nivel más básico, estas mediciones no pueden predecir qué tan bien una muestra de glóbulos rojos perfundirá las redes de microvasos en hematocritos fisiológicamente altos y la importancia clínica de estas mediciones sigue siendo controvertida.

5

En consecuencia, existe la necesidad de un sistema que ayude a los médicos a evaluar la eficacia potencial y la toxicidad de una muestra de sangre de glóbulos rojos almacenados antes de la transfusión midiendo la capacidad de los glóbulos rojos perfundidos de redes microvasculares artificiales y microfabricadas que están estructuradas para simular la vasculatura humana.

10

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sistema de acuerdo con la reivindicación 1 que evalúa la capacidad de los glóbulos rojos para perfundir redes microvasculares directamente, en el que un dispositivo de red microvascular artificial está estructurado para simular la estructura de la vasculatura humana. La red microvascular está estructurada de tal manera que el dispositivo de red microvascular incluye una pluralidad de microcanales que están dimensionados y estructurados como capilares de la vasculatura.

20

Según la presente invención, se proporciona además un procedimiento según la reivindicación 7.

El sistema para evaluar la aptitud microvascular de una muestra de glóbulos rojos almacenados. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 tiene un dispositivo de red y más de una unidad de red. La unidad de red tiene una sola entrada y una única salida para la muestra y una pluralidad de microcanales. La pluralidad de microcanales recibe la muestra desde la entrada única y drena la muestra hacia la salida única. El sistema incluye además un dispositivo de análisis que recibe el dispositivo de red en el mismo. El dispositivo de análisis incluye un sensor para capturar mediciones relacionadas con la muestra y un procesador capaz de comparar las mediciones capturadas con las mediciones correspondientes almacenadas en una base de datos de glóbulos rojos frescos y saludables para determinar la aptitud microvascular de los glóbulos rojos almacenados.

30

El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 para evaluar la aptitud microvascular de una muestra de glóbulos rojos almacenados incluye las etapas para obtener y almacenar mediciones de una pluralidad de muestras de glóbulos rojos sanos y frescos. El procedimiento incluye además hacer fluir una muestra de glóbulos rojos almacenados a través de un dispositivo de red y detectar mediciones relacionadas con los glóbulos rojos almacenados. Las medidas se comparan para determinar la aptitud microvascular de los glóbulos rojos almacenados.

40

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra un dispositivo de red microvascular no según la presente invención.

50

La figura 2 ilustra una vista despiezada de una parte del dispositivo de red microvascular, de la figura 1, que no es de conformidad con la presente invención.

Las figuras 3a y 3b ilustran una vista superior y lateral, respectivamente, del dispositivo de red microvascular de acuerdo con la figura 1.

55

Las figuras 4a y 4b ilustran un dispositivo de red microvascular más grande, de acuerdo con la presente invención.

Figura 5 ilustra un dispositivo de red microvascular incorporado en un dispositivo de análisis que mide la tasa de flujo general a través de la red, los flujos de microcanales en microcanales y los hematocritos en microcanales, para una muestra en la red microvascular, que no es de conformidad con la presente invención.

60

La figura 6 ilustra un dispositivo de red microvascular, que incluye un depósito de residuos que no es de conformidad con la presente invención.

65

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE EL INVENTO

5 Con referencia a las figuras y, en particular, a la figura 1, se muestra un dispositivo de red microvascular, al que generalmente se hace referencia con el número de referencia 10. El dispositivo de red de microcanal 10 tiene un componente moldeado 15 con una unidad de red 20 moldeada en el mismo y que está dimensionada y estructurada para imitar la vasculatura humana interna. El componente moldeado 15 descansa directamente sobre el portaobjetos 30, un sustrato, que es un portaobjetos recubierto para garantizar un cierre hermético con el componente moldeado 15.

10 El dispositivo de red de microcanal 10 tiene un puerto de entrada 5 y un canal de entrada 8 para recibir una muestra de sangre 22. El dispositivo de red de microcanal 10 tiene un puerto de salida 25 y un canal de salida 27 que están asociados operativamente con una fuente de vacío 35 para simular el flujo sanguíneo real in vivo. El dispositivo de red 10 tiene una pluralidad de microcanales 50 que simulan los capilares de la vasculatura humana.

15 Con referencia a la figura 2, que muestra una vista ampliada del dispositivo de red 10, se muestra una pluralidad de microcanales 50. El dispositivo de red 10 tiene un único puerto de entrada 5 y un único puerto de salida 25 a través del cual fluye toda la muestra de sangre 22. Cada uno de la pluralidad de microcanales 50 es un microcanal primario 51 que alimenta y se ramifica en dos microcanales secundarios 55 o es un canal de convergencia 60 que resulta de la convergencia de dos microcanales secundarios 55. Los canales primarios 51 tienen un área de sección transversal mayor que Los microcanales secundarios 55 y los canales de convergencia 60 tienen un área de sección transversal mayor que los microcanales secundarios 55 que alimentan los canales de convergencia 60.

20 En un ejemplo, el dispositivo de red 10 incluye treinta y cuatro microcanales de 6 μm de profundidad y 70 a 6 μm de ancho, bifurcados en un ángulo de 45°, en relación con la entrada de los dos canales bifurcados o secundarios 55. También se podría usar un número diferente de microcanales 50 que tienen una variedad de dimensiones. En la realización más simple, los microcanales 50 del dispositivo de red microvascular artificial 10 están interconectados de una manera que imita la topología general de la microvasculatura real. Un ángulo de bifurcación 70 o un ángulo de convergencia 75 es un ángulo de 45°, aunque el rango tanto para el ángulo de bifurcación 70 como para el ángulo de convergencia podría variar de aproximadamente 20° a 80°.

25 El ángulo de bifurcación 70 se mide en relación con el ángulo en el que diverge del eje del canal principal 50. Un ángulo de convergencia 75 se mide en relación con el eje en el que los canales secundarios 55 convergen con un canal de convergencia 60. El ángulo de 45° imita o replica la vasculatura humana interna. En donde una red de microcanales se suministra en canales secundarios en ángulos de 90°, suministrada en tres canales secundarios o fuera un canal completamente recto, la vasculatura humana real no se replicaría con precisión y no arrojaría resultados fiables en análisis posteriores.

30 Con referencia a la figura 3a, el puerto de entrada 5 y el puerto de salida 25, preferiblemente, tienen forma de lágrima. El canal de entrada 8, que replica una arteriola, y el canal de salida 27, que replican una vénula, son de longitud corta, pero son mucho más anchos que los microcanales 50. El tamaño relativo del canal de entrada 8 y el canal de salida 27 es significativamente mayor, y por lo tanto tendrá una menor resistencia fluidica que los microcanales 50.

35 Los microcanales 50 pueden ser de sección transversal variable, tales como rectangular o circular o cualquier forma similar. Con referencia a las figuras 3a y 3b, la longitud de los microcanales 50, la región que incluye los microcanales 51, 55 y 60, es de aproximadamente 1800 μm , aunque la región podría ser más grande o más pequeña. La longitud del canal de entrada 8 y el canal de salida 27 es de aproximadamente 300 μm , aunque la longitud puede variar. El puerto de entrada 5 y el puerto de salida 25 tienen forma de lágrima y son sustancialmente más grandes que los otros componentes del dispositivo de red 10.

40 Las dimensiones del puerto de entrada 5 y el puerto de salida 25 son de aproximadamente 5000 μm de longitud y 500 μm de profundidad. Las muestras preferidas para usar en el dispositivo de red 10 se pueden seleccionar del grupo que consiste en: células, microorganismos y cualquier combinación de los mismos suspendidos en una solución apropiada. Las muestras preferidas son sangre entera, glóbulos blancos con o sin plasma (diluido o sin diluir), y lo más preferiblemente glóbulos rojos y plaquetas con o sin plasma (diluido o sin diluir).

45 En una realización adicional según la presente invención mostrada en las figuras 4a y 4b, el dispositivo de red 101 es más grande y una unidad de red 105 que tiene más microcanales 501 que el dispositivo de microcanales 10. Sin embargo, el dispositivo de red 101 también tiene un único canal de entrada 151 y un único canal de salida 251.

50

55

60

65

La red 101 se puede usar para mejorar rendimiento al tener una mayor sensibilidad. El dispositivo de red 101 está estructurado de la misma manera que el dispositivo de red 10. Por lo tanto, también replica la vasculatura humana al tener microcanales bifurcantes.

5 Otras realizaciones de la red pueden imitar las redes microvasculares reales de tejidos específicos y órganos terminales (que incluyen, entre otros, corazón, retina del ojo, cerebro, riñón), las redes microvasculares de dichos tejidos y órganos en diversas fases de desarrollo así como de tumores. La información morfológica con respecto a las dimensiones geométricas de los microvasos de las redes microvasculares de estos órganos y la información topológica sobre cómo se conectan estos microvasos para formar estas redes se utilizaría y fabricaría una red microvascular artificial con todas las características específicas del órgano.

15 Hay tres medidas principales que son significativas para la medición de la perfusión de sangre para el análisis antes de la transfusión. Una de esas medidas, que es opcional, es la tasa de flujo general Q_{tot} . La tasa de flujo general a través de la red proporciona una evaluación general de qué tan bien una muestra de glóbulos rojos almacenados puede perfundir el dispositivo de red microvascular 10, 101. La tasa general de flujo de la muestra de sangre a través de la red se determina, por ejemplo, midiendo la tasa de flujo de glóbulos rojos en el canal de entrada 8 a la salida 27 del dispositivo de red 10.

20 La medición de la tasa general de flujo de la muestra de sangre a través del dispositivo de red 10, 101 proporciona una medición integradora del rendimiento de la muestra. Cualquier cambio en la resistencia fluidica de la red al flujo sanguíneo debido a una reducción (o una mejora) en la aptitud microvascular de la muestra 22 se reflejará en esta medición. Con referencia a la figura 1, el dispositivo de red 10 que tiene un puerto de entrada 5 y un puerto de salida 25, la velocidad de flujo en el puerto de entrada 5 (arteriola) y la velocidad de flujo en el puerto de salida 25 (vénula) son idénticas. La tasa general de flujo de la muestra de sangre en el dispositivo de red 10 se determina midiendo la velocidad promedio de la muestra mediante análisis de imagen cuadro por cuadro.

30 Se utiliza un sensor para capturar con precisión imágenes (cuadros) del canal a intervalos conocidos. Las regiones dentro de las paredes del canal de dos cuadros secuenciales se correlacionan de forma cruzada para determinar hasta qué punto los glóbulos rojos en un microcanal han cambiado (en promedio) en el intervalo de tiempo entre los dos cuadros secuenciales. Para calcular la velocidad promedio de los glóbulos rojos en el canal se divide la distancia a la que los glóbulos rojos se han desplazado o recorrido y por el intervalo de tiempo.

35 Con referencia a la figura 5, el dispositivo de red 10 (y 101) es preferiblemente un elemento desechable de un cartucho o casete 90 que se inserta en un dispositivo de análisis 200 que puede realizar mediciones en la muestra de sangre que fluye a través de la pluralidad de microcanales 50 de microvascularización dispositivo de red 10. El dispositivo de análisis 200 contiene un receptáculo 201 que recibe el dispositivo de red 10 para su análisis. El dispositivo de análisis 200 contiene preferiblemente un sensor 205, que es capaz de capturar cuadros o datos relacionados con la muestra a medida que fluye a través de los microcanales 50. El dispositivo de análisis 200 tiene un dispositivo de memoria 210 en el que los cuadros o datos capturados pueden almacenarse para su posterior reproducción como video y para el análisis.

45 El sensor 205 captura imágenes o cuadros de sangre en al menos dos ubicaciones a lo largo del dispositivo de red 10. Los flujos se pueden medir realizando un análisis de imagen cuadro por cuadro de las películas de alta velocidad del flujo sanguíneo en la red mediante el sensor 205 contenido dentro del dispositivo de análisis 200. El dispositivo de análisis 200 también tiene un procesador 220 para realizar los cálculos relacionados con los cuadros o datos capturados. El sensor es preferiblemente una de una cámara digital CCD o CMOS, un par de fotodiodos y un transductor ultrasónico que están configurados para detectar la muestra a medida que pasa a través del dispositivo 10, 101.

55 Adicionalmente, el dispositivo de análisis 200 puede capturar y almacenar datos de medición en una base de datos del dispositivo de memoria 210 que incluye mediciones de una pluralidad de muestras de sangre sanas para fines de comparación con una muestra de sangre almacenada para determinar la aptitud vascular de la muestra almacenada. La pluralidad de muestras de sangre saludable son cientos de muestras de sangre fresca y saludable. Las mediciones almacenadas de muestras sanas se pueden almacenar opcionalmente de acuerdo con las características del individuo del que se toma la muestra sana para una comparación adicional con las muestras almacenadas.

60 En una realización específica, el sistema de adquisición de imágenes consistía en un microscopio Olympus BX51 con una cámara CMOS digital de alta velocidad (Silicon Video 2112; de Epix, Inc.) y una placa de captura de fotogramas (PIXCI D2X; de Epix, Inc.) montada en una PC dedicada (Dimension XPS D300, de Dell).

65 Las secuencias de cuadros se capturaron en la memoria de un ordenador [computador] y se guardaron en el disco duro (XCAP-Lite; de Epix, Inc.) para su análisis utilizando software personalizado escrito en

MATLAB (de Mathworks, Inc.) o en C ++ (Microsoft Visual C ++ 6.0; de Microsoft, Corp.). El equipo compatible también se usaría con un fotodiodo o un dispositivo de ultrasonido. El mismo análisis se realiza con medios distintos a la cámara digital, por ejemplo analizando la señal de un fotodiodo o utilizando medios de ultrasonido para medir la velocidad promedio de la muestra de glóbulos rojos en el microcanal.

5

Una medida adicional que es crítica para la determinación de la eficacia de la sangre almacenada, y que es el tema de la presente invención, es la medición de la velocidad del flujo sanguíneo en cada microcanal 50 Q_i del dispositivo de red 10. Los flujos en los microcanales 50 de tamaño capilar individuales proporcionan una medida de qué tan bien los glóbulos rojos almacenados pueden alcanzar los vasos más pequeños de la microvasculatura para completar el suministro de oxígeno. La medición de la distribución de las tasas en los canales microvasculares 50 de la red 10 proporciona un tipo de información mucho más detallada y diferente con respecto al rendimiento microvascular de la muestra de sangre que la tasa de flujo general Q_{tot} . Una reducción en las tasas de flujo capilar (con respecto a una muestra de sangre fresca) indicaría que se está analizando una mala calidad de la sangre almacenada, incluso si la tasa de flujo general a través de la red es aproximadamente la misma. El flujo de la muestra de sangre 22 en los microcanales 50 se mide de la misma manera que se mide la tasa de flujo general Q_{tot} .

10

15

Una tercera medida de la aptitud de la sangre almacenada es el tubo de hematocrito Hct_i en los microcanales capilares de la red. La medición del hematocrito es opcional. Los hematocritos de tubo proporcionan una medida independiente adicional de qué tan bien los glóbulos rojos almacenados pueden alcanzar los microcanales 50, 501 de los dispositivos microvasculares 10, 101. Cuando esta medición se combina con las mediciones de la velocidad de flujo capilar Q_i , la capacidad de transporte de oxígeno y otras características bioquímicas de los glóbulos rojos almacenados de la muestra 22, se proporciona una estimación de la tasa real de suministro de oxígeno a los tejidos.

20

25

El hematocrito de tubo en un canal en un microcanal 55 de la figura 1, por ejemplo, se determina midiendo mediante el análisis de la imagen de la transmisión de luz azul (415 ± 15 nm) que pasa a través de ella. Debido a que la hemoglobina dentro de los glóbulos rojos de la muestra 22 adsorbe muy bien la luz azul, los glóbulos rojos aparecen oscuros cuando se iluminan con luz azul y su concentración de volumen en el canal (es decir, el hematocrito del tubo) se correlaciona bien con la "oscuridad" del canal. Debido a la hemoglobina, los glóbulos rojos aparecen oscuros a la luz azul: el uso de un filtro azul de paso de banda estrecho (415 ± 15 nm) para que coincida con la banda de absorción Soret de la hemoglobina facilita la medición del hematocrito de tubo en microcanales 55, por ejemplo, del dispositivo 10.

30

35

Por lo tanto, Q_{tot} , la tasa total de flujo a través del dispositivo de red 10, Q_i , flujo en microcanales particulares y Hct_i , el hematocrito de tubo en cada microcanal individual del dispositivo 10 proporciona información valiosa sobre la aptitud de los glóbulos rojos en una muestra 22. El diferencial de presión a través de la red 10 se mantiene constante durante la medición. Para diferentes mediciones, la presión a través de la red 10 podría variar entre diferentes mediciones y durante una medición individual.

40

Estas tres mediciones realizadas utilizando el dispositivo de análisis y los dispositivos de red 10, 101 de la presente descripción son parte de una serie de parámetros que permiten la estimación de la eficacia de una muestra de sangre almacenada.

45

Para determinar la aptitud microvascular de una muestra de sangre almacenada, la aptitud microvascular de la sangre fresca y saludable se utiliza como estándar para la comparación con muestras de sangre almacenadas previamente antes de la transfusión. Por lo tanto, los rangos reales de estas tres mediciones se determinarán experimentalmente pasando sangre fresca, normal y saludable a través de la red 10 para obtener un conjunto de valores predeterminados o estándar para sangre saludable. Las tres mediciones de sangre sana, fresca y normal de cientos de individuos se pueden almacenar y utilizar como estándar para mediciones posteriores. Las mediciones de muestras de glóbulos rojos almacenados siempre se compararán con este estándar normal.

50

55

Por lo tanto, para medir la capacidad de los glóbulos rojos almacenados para perfundir redes microvasculares (denominado "aptitud microvascular" en este texto), se pasa una muestra de glóbulos rojos almacenados a un hematocrito fisiológicamente alto a través del dispositivo de red de microcanales 10 bajo un diferencial de presión constante desde el puerto de entrada 5 a puerto de salida 25. La perfusión de la muestra 22 se evalúa midiendo: (i) los flujos (Q_i) en los microcanales y, opcionalmente, (ii) velocidad general de flujo a través de la red (Q_{tot}) para la diferencia de presión constante o variable entre la entrada y la salida, y (iii) el hematocrito del tubo (Hct_i) de los microcanales.

60

La medición de la perfusión de la red para la muestra 22 se compara luego con los valores estándar previamente establecidos para los glóbulos rojos sanos frescos para determinar el nivel de aptitud microvascular de la muestra de glóbulos rojos almacenados en relación con los glóbulos rojos frescos normales. Por lo tanto, la comparación proporciona una indicación cualitativa de la muestra almacenada de glóbulos rojos en relación con los glóbulos rojos frescos para acceder al microvascular.

65

Los glóbulos rojos 22 de la muestra se lavaron preferiblemente tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS por sus siglas en inglés de "*phosphate buffered saline*") y se pasaron a través de un filtro de leucorreducción para reducir la concentración de glóbulos blancos (WBC por sus siglas en inglés de "*white blood cells*") y plaquetas. Las células lavadas se diluyeron en tampón GASP (que contenía 9 mM Na₂HO₄, 1,3 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, 5,5 mM glucosa y albúmina de suero bovino al 1%, pH 7,4, osmolaridad 290 mmol / kg), o en otros tampones. El hematocrito de la muestra 22 en GASP se ajusta a un valor específico (a menudo 40%), el tamaño de la muestra fue 20µl y los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Lo anterior no excluye la posibilidad de diferentes tamaños de la muestra, diferentes hematocritos y también mediciones de ejecución a diferentes temperaturas.

Además de las etapas de lavado opcionales, se puede introducir un químico o fármaco para observar sus efectos en la alteración de la deformabilidad de los glóbulos rojos en la muestra 22. Una reacción química inducida por un fármaco puede provocar cambios sutiles en la fluidez o las propiedades mecánicas de la muestra 22, a saber, en la membrana de los glóbulos rojos o citosol eritrocitario. Los dispositivos 10,101 pueden evaluar los efectos de estos tratamientos sobre la deformabilidad y perfusabilidad. También se debe tener en cuenta que la sangre de algún individuo podría comportarse de manera diferente al promedio de la población bajo tratamiento químico externo. Por ejemplo, un fenotipo de deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa relativamente común se vería gravemente afectado por un estrés oxidativo que puede ser introducido por el tratamiento con medicamentos antipalúdicos como la primaquina, y puede cambiar significativamente la capacidad de los glóbulos rojos tratados para perfundir el microvascular red de dispositivo.

Rango de presión diferencial a lo largo de la red, la diferencia de presión desde la entrada a la salida varía de 0 mmHg a 250 mmHg (340 cmH₂O). El límite más alto corresponde a la presión arterial sistólica en la hipertensión severa (fase 4). En la parte venosa de la circulación sistémica, la presión sanguínea es normalmente de unos 10 mmHg (14 cmH₂O). La diferencia de presión entre la arteriola (entrada) y la vénula (salida) de un lecho microvascular es normalmente del orden de 30 mmHg (40 cmH₂O).

El flujo general Q_{tot} y el flujo individual Q_i en cada red de microcanales 50 se mide cada uno, en los dispositivos en unidades dimensionales de microlitros por minuto (uL / min). Un rango normal para cada medición se determina por los valores de los glóbulos rojos sanos normales frescos y puede ser de 0 uL / min a 100 uL / min. El rango normal puede depender de la red específica utilizada en la medición.

La siguiente tabla proporciona los rangos normales de hematocrito de la muestra (hematocrito sistémico) para sujetos de varias edades. El hematocrito de tubo en los microcanales 50, 51, 55 y 60 de la red microvascular puede ser mayor y menor que el valor del hematocrito de la muestra.

GAMA NORMAL DE TUBOS PARA HEMATOCRITO SISTÉMICO (Hct)

Recién nacidos	55% - 68%
Una (1) semana de edad	47% - 65%
Un (1) mes de edad	37% - 49%
Tres (3) meses de edad	30% - 36%
Un (1) año de edad	29% - 41%
Diez (10) años de edad	36% - 40%
Hombres adultos	42% - 54%
Mujeres adultas	38% - 46%

Los dispositivos de red de microcanales 10, 101 incluyen varios microcanales interconectados 50, 501 que funcionan en regímenes de flujo de archivos múltiples o únicos con una amplia gama de tasas de flujos. La muestra 22 que tiene glóbulos rojos que fluyen a través de los dispositivos de red de microcanales 10, 101 en el hematocrito natural sufriría todas las formas de deformación: plegado y cizallamiento en los microcanales 50, 501 bajo una variedad de condiciones de flujo diferentes, similares a la microcirculación real. La información proporcionada por el dispositivo de análisis 200 permite una interpretación directa por parte de los médicos que toman la decisión con respecto a la transfusión y, por lo tanto, podría producir un valor clínico inmediato.

Los dispositivos de red microvascular 10, 101 de la presente solicitud tienen aplicabilidad para el estudio de

- afecciones patológicas. Por lo tanto, la muestra de los glóbulos rojos en los que los glóbulos rojos son más rígidos debido a la diabetes mellitus, los glóbulos rojos que están infectados con formas parasitarias como la malaria, los glóbulos rojos que muestran anomalías genéticas, como las que se encuentran en la talasemia y la anemia falciforme, por ejemplo, también se pueden utilizar. Además, las células que muestran los cambios de enfermedades metabólicas o parasitarias y otros procesos patológicos que implican los elementos formados y cualquier combinación de los mismos, también pueden estudiarse usando los dispositivos de red microvascular 10, 101 de la presente descripción.
- Para fabricar los dispositivos de red 10, 101, se usa una oblea de silicio maestra. La configuración del dispositivo de red microvascular 10 se transfiere a una oblea de silicio maestra (no se muestra) usando una grabadora láser directa (Heidelberg DWL 66, de Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH) y grabado iónico reactivo (proceso Bosch, Unaxis SLR 770 ICP Deep Silicon Etcher, de Unaxis USA Inc). La oblea maestra también se puede fabricar usando fotolitografía de fotorresistencia SU-8 u otro material fotosensible. Las características de la oblea de silicio son inversas en relación con el diseño de la red 20 del dispositivo de red 10. Las áreas empotradas de la oblea maestra corresponden a los microcanales 50 del dispositivo de red 10. La oblea maestra fabricada de esta manera puede ser moldeada de forma repetida muchas veces para producir dispositivos microfluídicos en materiales como, por ejemplo, poli(dimetilsiloxano) (PDMS, producido por GE Silicones como RTV 615 A/B, o por Dow Corning como Sylgard 184).
- El patrón en la oblea maestra se imprime en PDMS vertiendo el prepolímero PDMS sobre la oblea maestra y permitiendo que se cure en un horno a la temperatura de 65 °C durante la noche. Para eliminar la réplica PDMS de la oblea maestra, la réplica se corta con un bisturí y luego se despegue de la oblea maestra. La réplica PDMS se coloca luego sobre una superficie limpia del portaobjetos 30 con las características moldeadas hacia arriba para convertirse en el componente moldeado 15.
- El puerto de entrada 5 y el puerto de salida 25 se crean al ubicar los canales de entrada y salida de la red 20 moldeados en el PDMS y perforar a través del componente superior en estos lugares con un punzón afilado y cilíndrico (como un punzón de biopsia desechable). El puerto de salida 25 está conectado a un depósito de recogida de residuos con un tubo de PE, de modo que la muestra de sangre fluye desde el depósito de entrada, a través de la red, y existe el dispositivo a través de la salida en la parte superior del dispositivo. En esta realización, el portaobjetos 30 no debe perforarse previamente con un orificio pasante para la salida.
- El componente moldeado 15 contiene el techo real y las paredes laterales de los microcanales de la red 20. El componente moldeado 15 está sellado al portaobjetos 30 para formar un dispositivo microfluídico completo. Para ensamblar el dispositivo de red 10, el componente moldeado 15 y el portaobjetos 30 recubierto con PDMS se exponen a plasma de aire durante 100 segundos (limpiador / esterilizador de plasma, de Harrick Scientific Corporation), se fijan juntos y se colocan en un horno a 65 °C durante 15 minutos para completar la unión covalente de las dos superficies de contacto.
- Inmediatamente después del ensamblaje, el dispositivo de red 10 se llena con una solución acuosa de mPEG-silano al 1% (p / vol) (Laysan Bio, Inc.), y luego se lava e incuba con tampón GASP (albúmina de suero bovino al 1% (BSA por sus siglas en inglés de "*bovine serum albumin*"), 9 mM Na₂HPO₄, 1,3 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, glucosa 5,5 mM, pH 7.4, 290 mmol / kg) para pasivar las paredes de los canales y evitar la adhesión de las células sanguíneas a las paredes.
- En una realización alternativa mostrada en la figura 6, el puerto de salida 25 no está perforado a través del componente moldeado 15 como se muestra en la figura 1. En contraste, el componente moldeado 15 está sellado al portaobjetos 30 que tiene un orificio pretaladrado de 2 mm 80. En esta realización particular, el extremo distal del canal de salida 28 se coloca directamente sobre el orificio 80, que sirve como puerto de salida y conecta el dispositivo de red de microcanales 10 a un gran depósito de recogida de residuos 85. El diferencial de presión a través del dispositivo de red 10 en esta realización se regula ajustando los niveles relativos de líquido en el depósito de recogida de residuos 85 y el depósito de entrada del dispositivo 10. Esta realización permite realizar la modificación del diferencial de presión a través de la red 10 para que el comportamiento de la muestra en deformación y cizallamiento se pueda medir en base a varios diferenciales de presión.
- El sustrato del dispositivo de red microvascular se compone de vidrios, plásticos, polímeros, metales, cerámicas, materiales orgánicos, materiales inorgánicos y cualquiera sus combinaciones. Un sustrato preferido será el transparente y que usa fácilmente la formación de microcanales. El dispositivo tiene preferiblemente una pluralidad de microcanales que tienen cada uno un diámetro o ancho (y también una profundidad) de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 100 micrómetros.
- Sin embargo, ni el sustrato de la invención ni el material del microcanal se limitan a ningún material específico, sino que pueden usar cualquier material que satisfaga los requisitos estructurales y funcionales de la invención. Por ejemplo, se puede emplear cualquier material que se pueda convertir en redes de

microcanales. Se puede utilizar un amplio espectro de materiales para fundición de canales. El material del microcanal preferiblemente no es hostil a las células sanguíneas, especialmente a los glóbulos rojos, y opcionalmente puede unir material lubricante que puede ser útil para facilitar el movimiento celular. Por ejemplo, se pueden usar PEG, mPEG-silano y similares para recubrir microcanales.

5

El sistema modelo prototipo tiene aplicaciones en una variedad de estudios de redes microvasculares. Esto incluiría estudios sobre la robustez de la función de red en presencia de recuentos elevados de glóbulos blancos o agregados celulares. Los primero es una respuesta fisiológica a la infección bacteriana o una manifestación patológica de transformación neoplásica de precursores de leucocitos. Lo último ocurre en asociación con diabetes u otros estados hipercoagulables y puede causar o acompañar oclusiones vasculares que pueden dañar los tejidos cardíacos o cerebrales.

10

Utilizando las capacidades de generación de patrones disponibles, se puede estudiar una variedad de diseños y complejidades de redes microvasculares. Las simulaciones por ordenador [computador] han demostrado que el descremado de plasma y el efecto Fahraeus-Lindqvist podrían explicar completamente las oscilaciones temporales no lineales en el flujo sanguíneo microvascular en ausencia de regulación biológica. Esta pregunta puede estudiarse directamente y simularse con el dispositivo de la invención.

15

Algunos agentes reguladores microvasculares, como el NO, tienen efectos documentados sobre la deformabilidad de los glóbulos rojos que podrían afectar la dinámica del flujo microvascular e incluso servir como un mecanismo independiente para su regulación. La dinámica no lineal del flujo sanguíneo local y su regulación dinámica a nivel local también se estudian y simulan directamente con el dispositivo de la invención. Al modificar el dispositivo para incluir un puerto de inyección de fármacos, se pueden obtener mediciones más precisas de las relaciones de respuesta a la dosis y las latencias de los efectos de dichos agentes reguladores sobre las propiedades y los comportamientos de los glóbulos rojos en las redes microvasculares. La presente invención también es una herramienta de validación útil para simulaciones informáticas anteriores y modelos teóricos.

20

25

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Si bien se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación. Todas las publicaciones, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los procedimientos de los materiales y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

30

35

Aunque la presente invención describe en detalle ciertas realizaciones, se entiende que existen variaciones y modificaciones conocidas por los expertos en la materia que están dentro de la invención. Por consiguiente, la presente invención pretende abarcar todas las alternativas, modificaciones y variaciones que están dentro del alcance de la invención como se establece en las siguientes reivindicaciones.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema que comprende:
- (a) un dispositivo de red que comprende:
- una sola entrada del dispositivo de red (151);
- 10 una sola salida del dispositivo de red (251);
- y un medio de presión de aspiración para proporcionar el movimiento de la muestra líquida a través del dispositivo de red; y
- 15 más de una unidad de red (105) en comunicación fluida con la entrada del dispositivo de red única y la salida del dispositivo de red única,
- en donde más de una de las unidades de red (105) está en paralelo y cada una de las
- 20 unidades de red comprende una pluralidad de microcanales que comprenden:
- (i) una entrada de la unidad de red única en comunicación fluida con la entrada del dispositivo de red única y una salida de la unidad de red única en comunicación fluida con la salida del dispositivo de red única;
- 25 (ii) al menos un microcanal primario ramificado en dos microcanales secundarios con diámetro o ancho desiguales, al menos uno de los dos microcanales secundarios ramificados en un ángulo de 20° a 80°, medido en relación con el eje de al menos uno de los canales primarios y
- 30 (iii) al menos un microcanal convergente que converge desde dos microcanales en un ángulo de 20° a 80°, medido con relación al eje de al menos uno de los microcanales convergentes; y
- (b) un dispositivo de análisis que comprende:
- 35 (i) uno o más sensores para capturar una medición relacionada con una muestra de glóbulos rojos, en donde la medición es la velocidad de flujo del microcanal (Q_i), en donde la tasa de flujo sanguíneo se mide en cada microcanal (50) del dispositivo de red (10), y
- 40 (ii) un procesador que comprende un dispositivo de memoria configurado para comparar las mediciones capturadas con mediciones almacenadas en una base de datos de glóbulos rojos sanos para determinar la aptitud microvascular de la muestra de glóbulos rojos.
- 45 2. El sistema de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de red está moldeado de al menos un material seleccionado del grupo que consiste en: vidrio, plástico, polímero, metal, cerámica, material orgánico, material inorgánico y cualquier combinación de los mismos.
- 50 3. El sistema de la reivindicación 1, en el que cada una de la pluralidad de microcanales tiene un diámetro o ancho en el intervalo entre aproximadamente 6 μm a aproximadamente 63 μm .
4. El sistema de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de memoria está configurado además para almacenar datos de medición del flujo de microcanal, para la comparación con la muestra de glóbulos rojos.
- 55 5. El sistema de la reivindicación 1, en el que uno o más de los sensores se seleccionan del grupo que consiste en una cámara, un par de fotodiodos, un transductor ultrasónico y combinaciones de los mismos, para obtener imágenes de la muestra que fluye en la pluralidad de microcanales.
- 60 6. El sistema de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de microcanales comprende microcanales seleccionados del grupo que consiste en microcanales que tienen secciones transversales dimensionalmente heterogéneas a lo largo de cualquiera de los microcanales y microcanales que tienen secciones transversales dimensionalmente homogéneas a lo largo de cualquiera de los microcanales, o
- en donde el dispositivo de red comprende además un sustrato.
- 65 7. Procedimiento para evaluar la aptitud microvascular de una muestra de glóbulos rojos que comprende:

- obtener y almacenar mediciones de una pluralidad de muestras de glóbulos rojos sanos;
- 5 hacer circular una muestra de glóbulos rojos a través de un dispositivo de red y detectar mediciones relacionadas con la muestra de glóbulos rojos con un dispositivo de análisis; y
- comparar las mediciones obtenidas de la pluralidad de muestras de glóbulos rojos sanos con mediciones derivadas de la muestra de glóbulos rojos con el dispositivo de análisis para determinar la aptitud microvascular de la muestra de glóbulos rojos;
- 10 en donde la medición es la velocidad de flujo del microcanal (Q_i), en donde la tasa de flujo sanguíneo se mide en cada microcanal (50) del dispositivo de red (10), y
- en donde el dispositivo de red comprende:
- 15 (a) una sola entrada de dispositivo de red (151);
- (b) una única salida de dispositivo de red (251); y
- 20 (c) más de una unidad de red (105) en comunicación fluida con la entrada del dispositivo de red único (151) y la salida de dispositivo único (251) que comprende una pluralidad de microcanales,
- en el que más de una de las unidades de red (105) están en paralelo y cada una de las
- 25 más de una de las unidades de red comprende una pluralidad de microcanales que comprenden
- (i) una entrada de unidad de red única en comunicación fluida con la entrada del dispositivo de red única y una salida de unidad de red única en comunicación fluida con la salida del dispositivo de red única;
- 30 (ii) al menos un microcanal primario ramificado en dos microcanales secundarios de diámetro o ancho desiguales, al menos uno de los dos microcanales secundarios ramificados en un ángulo de 20° a 80° , medido en relación con el eje de al menos uno de los canales primarios y
- 35 (iii) al menos un microcanal convergente que converge desde dos microcanales en un ángulo de 20° a 80° , medido con relación al eje de al menos uno de los microcanales convergentes.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la obtención circula la pluralidad de muestras de glóbulos rojos sanos a través del dispositivo de red y detecta las mediciones a partir de una pluralidad de muestras de glóbulos rojos sanos con el dispositivo de análisis.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en donde el dispositivo de análisis comprende:
- uno o más sensores que capturan imágenes de la muestra que circula en los dispositivos de red;
- un dispositivo de almacenamiento que almacena las imágenes; y
- 50 un procesador que accede a las imágenes desde el dispositivo de almacenamiento y calcula la medición derivada de las imágenes de los glóbulos rojos sanos y los glóbulos rojos almacenados.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que uno o más de los sensores se seleccionan del grupo que consiste en una cámara, un par de fotodiodos, un transductor ultrasónico y combinaciones de los
- 55 mismos para obtener imágenes de la muestra que circula en la pluralidad de microcanales.
11. El sistema de la reivindicación 1, en el que la muestra de glóbulos rojos se selecciona del grupo que consiste en sangre fresca y glóbulos rojos almacenados, o
- 60 en donde la muestra de glóbulos rojos es sangre entera.
12. El sistema de la reivindicación 1, en el que el ángulo es de 45° .
- 65 13. El procedimiento de la reivindicación 7, en donde el ángulo es 45° .

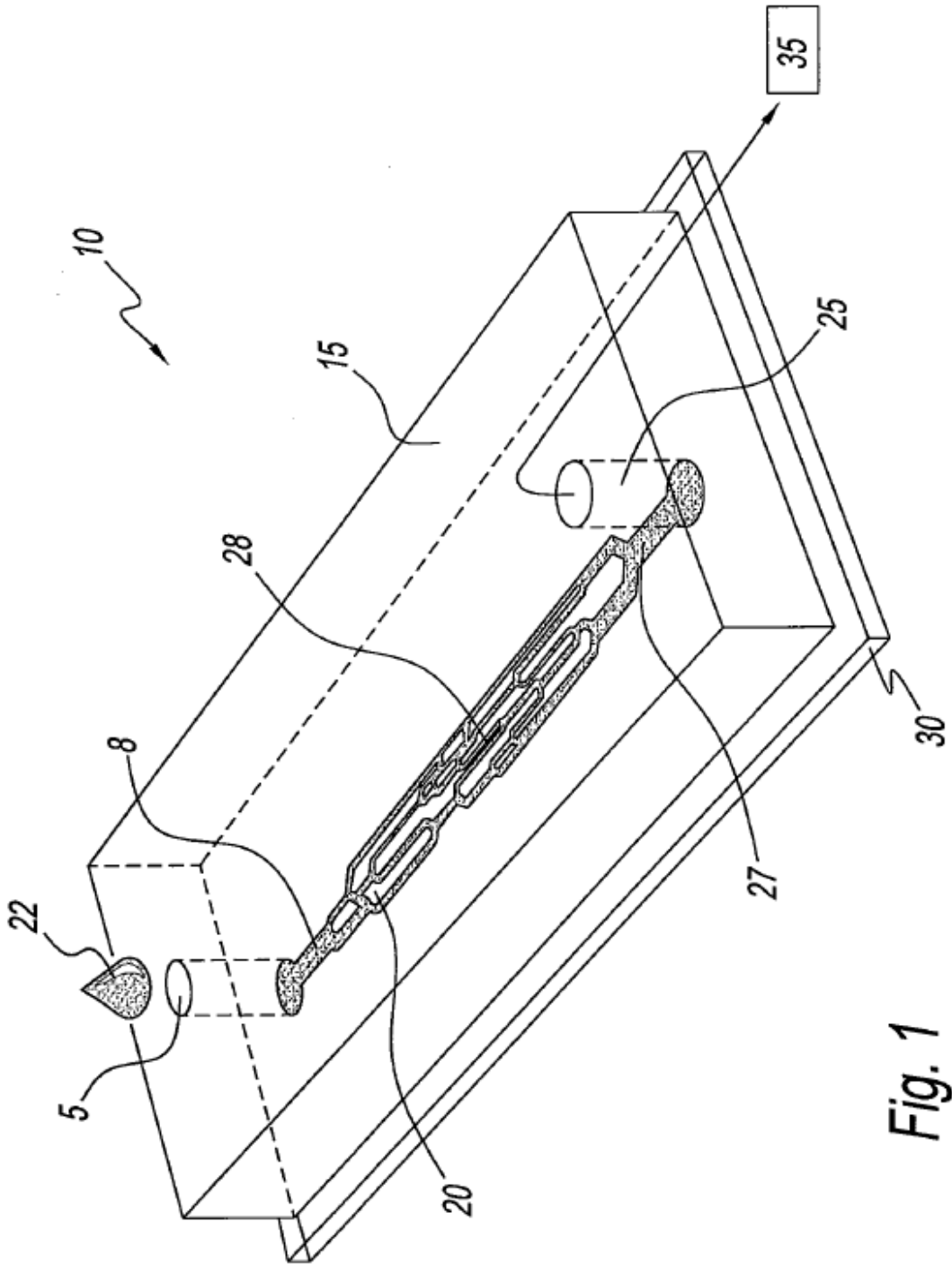


Fig. 1

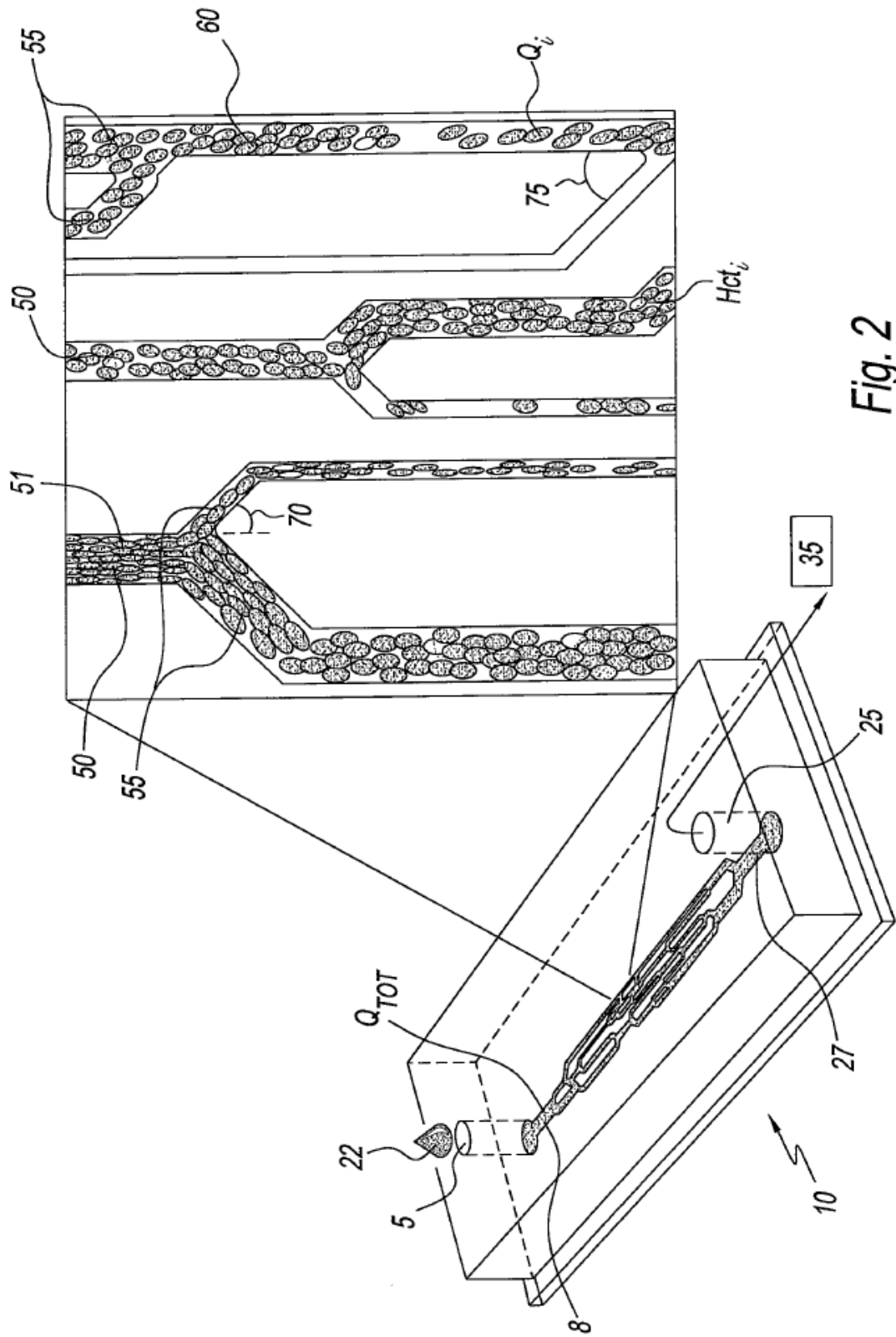


Fig. 2

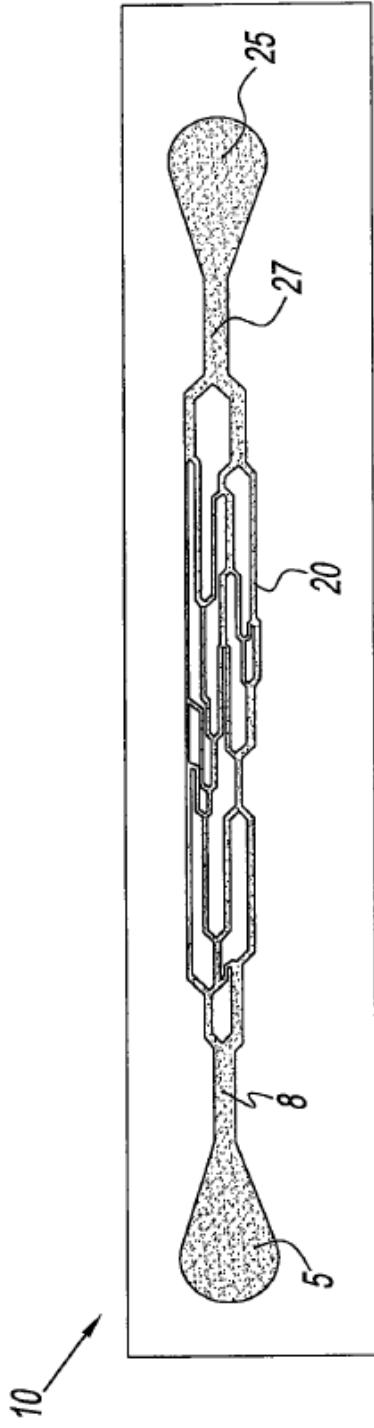


Fig. 3A

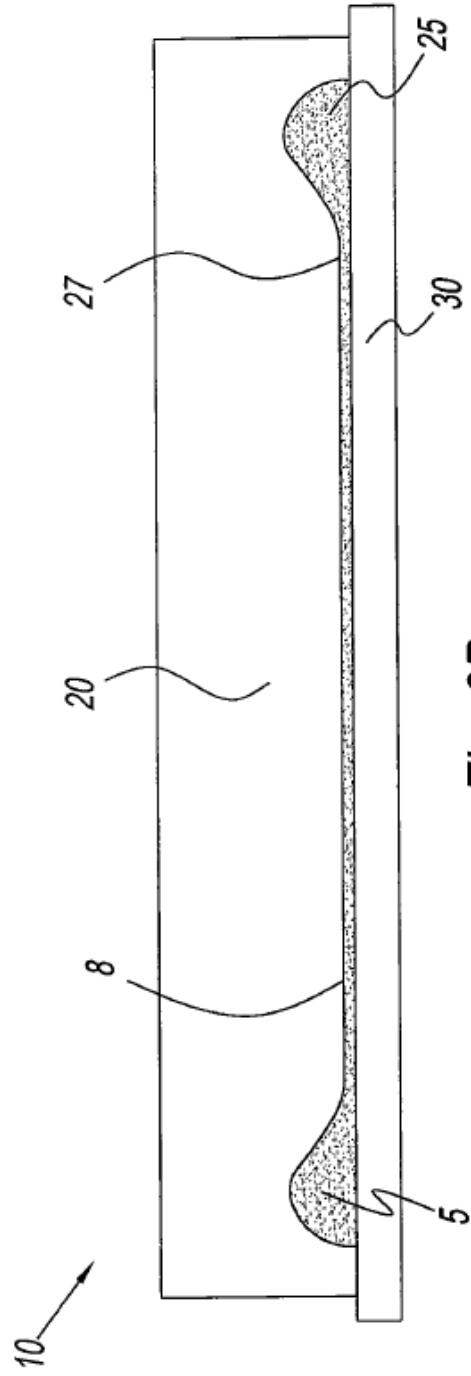


Fig. 3B

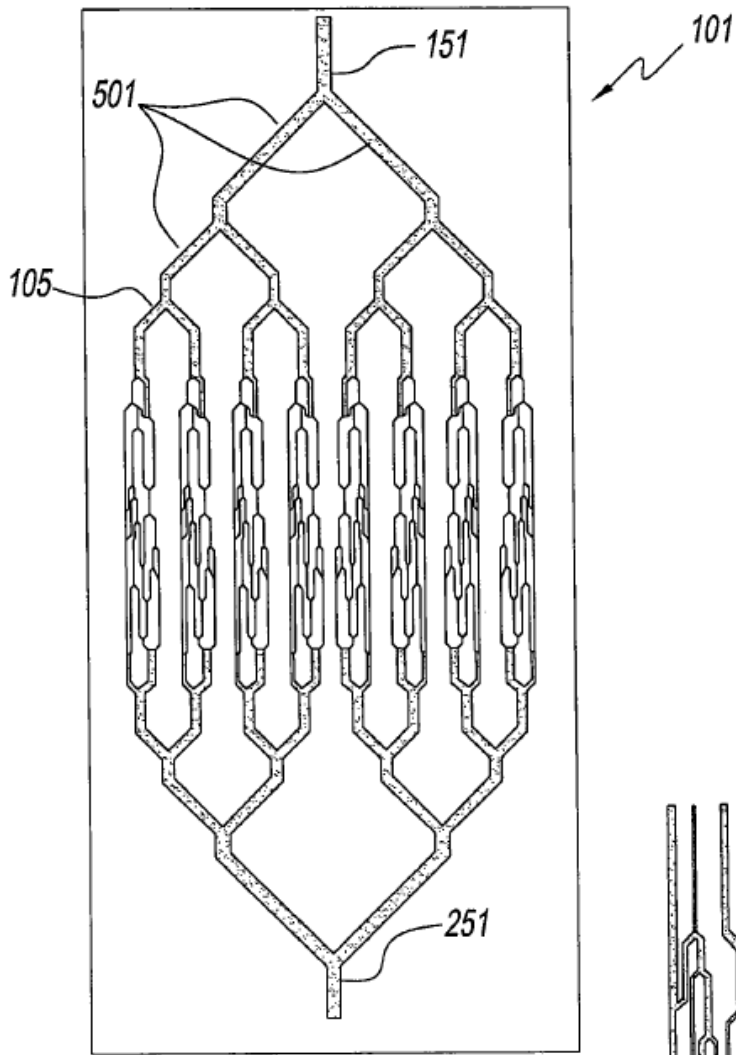


Fig. 4A

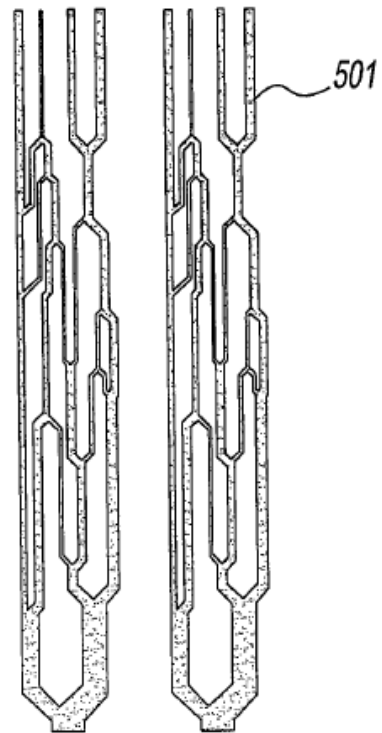


Fig. 4B

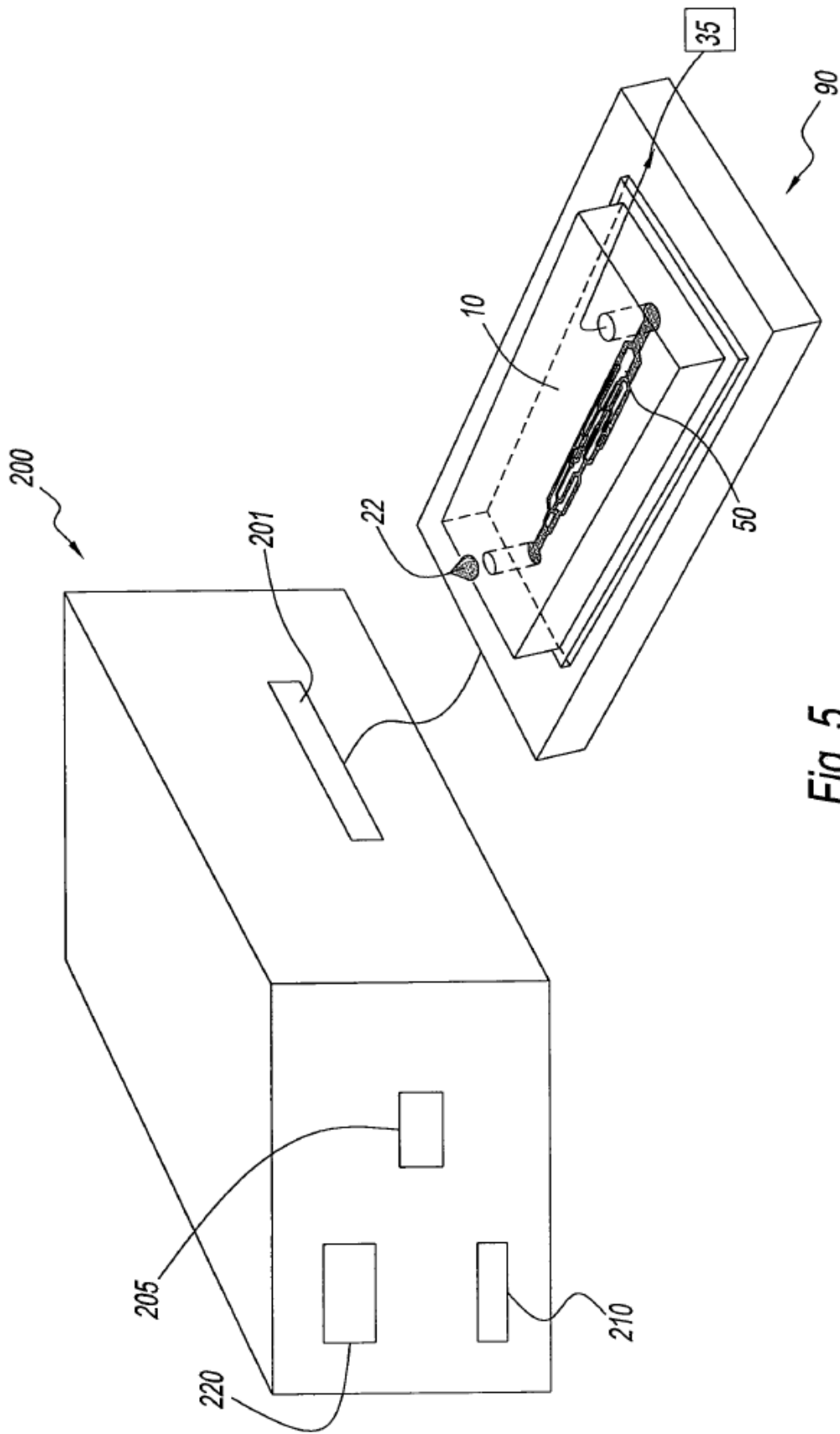


Fig. 5

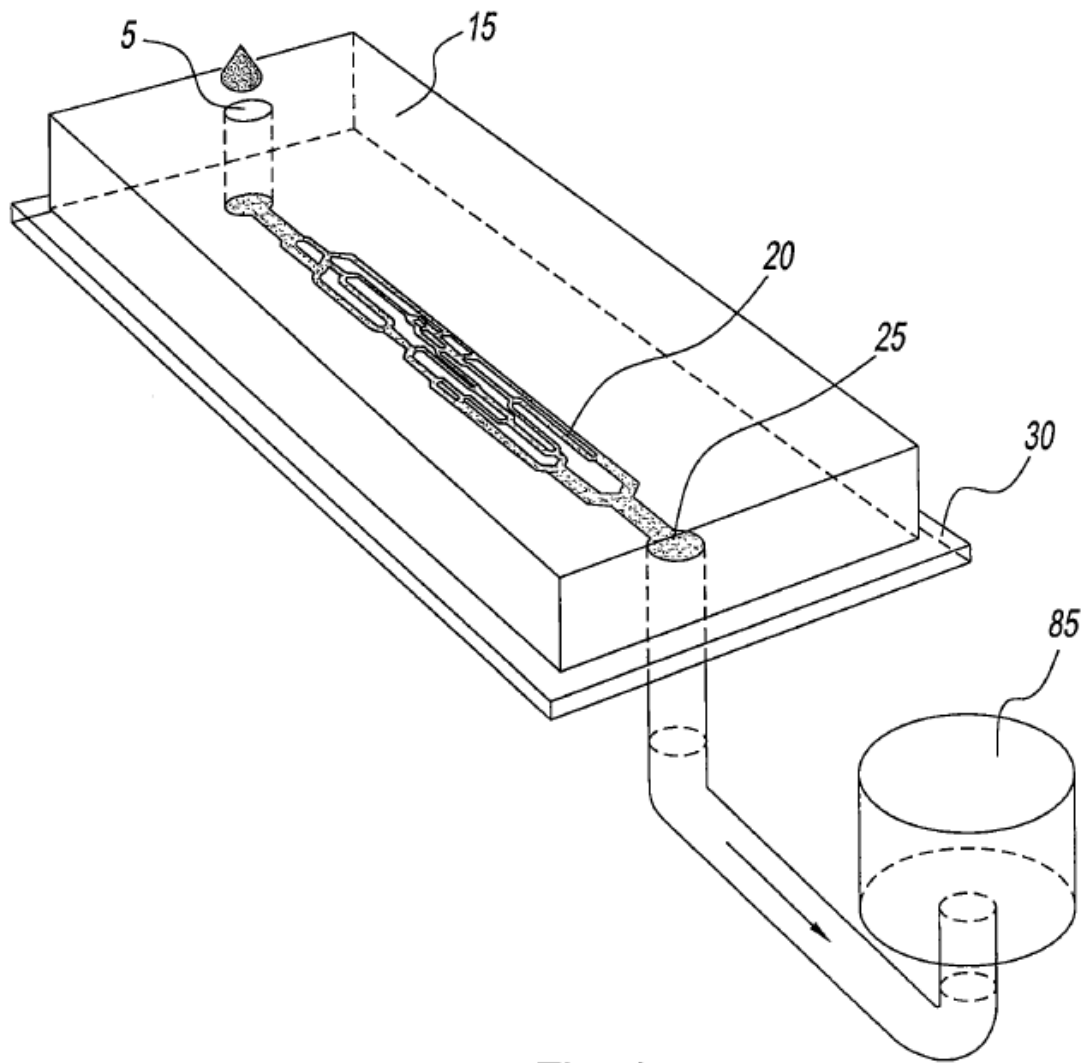


Fig. 6