



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 0720067-6 A2**



(22) Data de Depósito: 10/12/2007  
(43) Data da Publicação: 17/12/2013  
(RPI 2241)

**(51) Int.Cl.:**  
**C12M 3/00**

**(54) Título:** DISPOSITIVO DE ANÁLISE CELULAR E  
MÉTODOS DE OPERAR E DE FABRICAR UM  
DISPOSITIVO DE ANÁLISE CELULAR

**(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 12/12/2006 EP 06125880.2

**(73) Titular(es):** Koninklijke Philips Electronics N.V.

**(72) Inventor(es):** Dirkjan B. Van Dam, Erik R. Vossenaar, Ian  
French, Judith M. Rensen, Marc W. G. Ponjee, Mark T. Johnson,  
Simone I. E. Vulto, Thomas J. De Hoog

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & Cia.

**(86) Pedido Internacional:** PCT IB2007054994 de 10/12/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/072166de  
19/06/2008

# “DISPOSITIVO DE ANÁLISE CELULAR E MÉTODOS DE OPERAR E DE FABRICAR UM DISPOSITIVO DE ANÁLISE CELULAR”

## CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção trata de um método e aparelho para analisar células, e mais especificamente para analisar células em um fluido.

## FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 A análise de células pode ser realizada de diferentes maneiras. Entre as técnicas conhecidas para análise de células se inclui a inspeção óptica de uma amostra contendo as células (*e.g.* dispor uma gota de sangue entre placas de vidro de um microscópio)m deformação mecânica da célula, e contagem de células a base de laser (de outro modo conhecida como citometria de fluxo). Embora com freqüência muito precisos, estes métodos são limitados em âmbito e versatilidade.

15 O empreender a análise de células para investigar parâmetros de células é importante em relação a uma técnica de manipulação de célula designada de Eletroporação. A Eletroporação é uma técnica que utiliza um campo elétrico para criar poros em uma membrana celular para que moléculas (tais como drogas ou genes) possam ser transferidas para o interior da célula.

20 A eletroporação é importante no contexto de gene terapia porque o transporte controlado de DNA para o interior de uma célula é requerido. Embora vetores virais reconhecidamente constituam uma maneira muito eficiente de empreender administração de genes a uma célula, o uso de vetores virais não está isento de riscos (D.J. Wells, *Gene Therapy 11*, pp 1363, 2004). Alternativas não virais tal como eletroporação, por conseguinte, 25 são de especial interesse porque podem evitar a necessidade por agentes químicos adicionais ou materiais para abrir as membranas celulares. A eletroporação também apresenta a vantagem de poder reduzir a possibilidade de contaminação celular.

Nos dispositivos que são tipicamente usados para

eletroporação, múltiplas células em um fluido de suspensão são eletroporadas de imediato. Exemplos dos ditos dispositivos são os geradores de eletroporação dos Sistemas de Administração Molecular BTX ou do Sistema de Eletroporação de Cloning Gun<sup>®</sup> da Tritech Research. Estes dispositivos, todavia, não são ideais porque o campo elétrico varia dentro do conjunto de dispositivo. Como uma consequência desta deficiência, tipicamente 90% das células não sobrevive ao método de eletroporação.

Atualmente, o mecanismo de eletroporação não é perfeitamente entendido. É conhecido, todavia, que o selecionar uma forma de onda elétrica apropriada pode otimizar o método (Huang em Rubinski, *Sensors & Actuators A* 89, pp 242m 2001). Os ditos parâmetros de eletroporação ideais são dependentes do tipo de célula. Assim, a otimização dos parâmetros de eletroporação tem de ser realizada para cada tipo de célula individual.

A utilização de técnicas de análise conhecidas, inclusive daquelas acima mencionadas, a análise e a otimização de propriedades de célula é um método laborioso e consumidor de tempo. Por conseguinte há conveniência em criar uma técnica de análise celular aperfeiçoada para a inspeção e/ou análise controlada de células de tal modo que as propriedades de eletroporação das células possam ser investigadas. Há também conveniência em habilitar a dita análise a ser empreendida utilizando um único dispositivo e/ou método.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da invenção, é apresentado um dispositivo de análise celular para investigar as propriedades de eletroporação de células em suspensão em um fluido, o dispositivo compreendendo:

primeiro e segundo substratos mutuamente espaçados;

um primeiro conjunto de eletrodos formado sobre uma superfície do primeiro substrato;

pelo menos um eletrodo formado sobre a superfície do segundo substrato confrontando o primeiro conjunto de eletrodos, o pelo menos um substrato e o primeiro conjunto de eletrodos desse modo definindo os limites superior e inferior de um volume de análise para receber o fluido, o

5 volume de análise compreendendo um conjunto de partes de volume; e

o conjunto de circuito disposto para modificar a amplitude ou duração de uma tensão aplicada ao pelo menos primeiro conjunto de eletrodos de modo a gerar e modificar um campo elétrico em uma ou mais partes volumétricas do dispositivo.

10 Assim, um aparelho é previsto para analisar as propriedades de eletroporação de células, no qual o campo elétrico pode ser controlado na base de uma célula individual. Outrossim, o aparelho pode ser usado para determinar parâmetros de eletroporação ideais para uma pluralidade de células utilizando um único método de medição.

15 De acordo com outro aspecto da invenção, é apresentado um método de operar um aparelho de análise celular para investigar as propriedades de eletroporação de células suspensas em um fluido, o aparelho compreendendo dois substratos mutuamente espaçados com um volume de análise definido entre eles e o volume de análise compreendendo um conjunto

20 de partes de volume, e o método compreendendo a etapa de gerar campos elétricos de diferentes amplitudes ou durações em uma ou mais partes volumétricas do dispositivo com o fluido disposto no seu interior.

De acordo com ainda outro aspecto da invenção, é apresentado um método de fabricar um dispositivo de análise celular para investigar as

25 propriedades de eletroporação de células suspensas em um fluido, o método compreendendo as etapas de:

formar um primeiro conjunto de eletrodos sobre uma superfície de um primeiro substrato;

formar pelo menos um eletrodo sobre a superfície de um

segundo substrato confrontando o primeiro conjunto de eletrodos, espaçar o primeiro substrato e segundo substratos mutuamente com as superfícies em relação confrontante, o pelo menos um eletrodo e o primeiro conjunto de eletrodos desse modo definindo os limites superior e inferior de um volume de análise para receber o fluido, o volume de análise compreendendo um conjunto de partes de volume; e

proporcionar um conjunto de circuito para modificar a amplitude ou duração de uma tensão aplicada ao pelo menos primeiro conjunto de eletrodos de tal modo que um campo elétrico possa ser gerado ou modificado em uma ou mais partes de volume do dispositivo.

De acordo com outro aspecto da invenção, é apresentado um método de fabricar um dispositivo de análise celular para investigar as propriedades de eletroporação de células em suspensão em um fluido, o método compreendendo as etapas de:

desmontar uma tela a cristal líquido; e  
remover o material de cristal líquido.

A invenção, por conseguinte, assegura uma redução no tempo e mão de obra requerida para investigar os parâmetros de eletroporação de células. Além disso, os parâmetros podem ser usados para aperfeiçoar o rendimento de um método de eletroporação.

O dispositivo de análise pode ser uma construção a base de matriz ativa. Também o dispositivo pode habilitar as células a serem eletricamente transportadas e aprisionadas usando o fenômeno físico conhecido de dieletroforese (DEP), eletroforese, eletrosmose ou eletrohidrodinâmica.

### DESCRIÇÃO SUCINTA DOS DESENHOS

Exemplos da invenção passam a ser descritos em detalhe com referência aos desenhos, de acordo com os quais:

A fig. 1 mostra um dispositivo de análise de célula matriz de

acordo com uma modalidade da invenção;

A fig. 2 é uma vista em seção transversal tomada ao longo da linha X-X da fig. 1 que ilustra o dispositivo sendo usado para analisar as propriedades de eletroporação de células em suspensão em um fluido;

5 A fig. 3 mostra um dispositivo de análise de célula matriz de acordo com uma modalidade alternativa da invenção;

A fig. 4 é um diagrama de circuito esquemático do dispositivo mostrado na fig. 1;

10 A fig. 5 ilustra a operação do dispositivo da fig. 3 de acordo com uma modalidade da invenção;

A fig. 6 é um diagrama de temporização de pulsos seletivos para a operação do dispositivo ilustrado na fig. 5;

A fig. 7 ilustra uma modificação do diagrama de circuito mostrado na fig. 4; e

15 A fig. 8 ilustra a operação do dispositivo da fig. 3 de acordo com outra modalidade da invenção.

Numerais de referência idênticos se reportam a elementos idênticos através de sua totalidade.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

20 Reportando-se à fig. 1, é ilustrado um dispositivo de análise celular baseado em matriz de acordo com uma primeira modalidade da invenção. O dispositivo de análise celular compreende primeiro 10 e segundo 12 substratos dispostos em relação paralela e mutuamente espaçada, na qual o primeiro substrato 10 é posicionado verticalmente abaixo do segundo substrato 12.

25 Um primeiro conjunto de eletrodos 14a-14d é previsto sobre a superfície voltada para cima do primeiro eletrodo 10. Os eletrodos 14a-14b do primeiro conjunto de eletrodos 14 são genericamente alongados e se estendem na direção lateral sendo indicados genericamente pela seta designada “L”) e

são de tal modo dispostos que eles são substancialmente paralelos e mutuamente espaçados (a direção longitudinal sendo indicada genericamente pela seta designada “M”).

Um exemplo de um material apropriado para os eletrodos é o óxido de estanho índio (ITO). Naturalmente, qualquer outro material apropriado pode ser usado para formar os eletrodos, tais como Pt, Au, Ti, Ta etc. Opcionalmente, os eletrodos poderiam ser cobertos por uma delgada camada dielétrica de maneira a prevenir a corrosão do eletrodo ou a ocorrência de eletrolise em fluidos de base aquosa.

Um segundo conjunto de eletrodos 16a-16f (doravante designado de segundo conjunto de eletrodos 16) é previsto sobre a superfície voltada para baixo do segundo substrato 12. Em outros termos, o segundo conjunto de eletrodos 16 é formado sobre a superfície do segundo substrato 12 que confronta o primeiro substrato 10 e seu primeiro conjunto de eletrodos 14. Os eletrodos 16a-16f do segundo conjunto de eletrodos 16 são genericamente alongados, se estendem na direção longitudinal, e são de tal maneira dispostos que eles são substancialmente paralelos e mutuamente espaçados.

Assim, os conjuntos de eletrodos definem os limites superior e inferior de um volume de análise 18 no qual um fluido contendo células pode ser disposto para análise. A parte do volume entre um cruzamento de um eletrodo 14a do primeiro conjunto de eletrodos 14 e um eletrodo 16f do segundo conjunto de eletrodos 16 define uma parte do volume de análise (ilustrado pela região sombreada designada “P”).

A configuração de matriz resultante (designada de uma “matriz passiva” no campo de tecnologia de Tela a Cristal Líquido) por conseguinte tem um conjunto de eletrodos de fileira em um lado do volume, e um conjunto de eletrodos de coluna no outro lado do volume. Na modalidade ilustrada na fig. 1, os eletrodos de fileira são os eletrodos do primeiro

conjunto de eletrodos 14, e os eletrodos de coluna são os eletrodos do segundo conjunto de eletrodos 16.

Um circuito ativador de voltagem (não mostrado) é eletricamente ligado com o primeiro 14 e o segundo 16 conjunto de eletrodos e adaptado para modificar a amplitude e a duração de uma tensão aplicada aos conjuntos de eletrodos. A aplicação de uma tensão tanto a um eletrodo 14a do primeiro conjunto de eletrodos 14 como a eletrodo 16f do segundo conjunto de eletrodos 16 gera um campo elétrico na parte de volume P entre o cruzamento dos eletrodos. Assim, as propriedades de eletroporação de uma célula suspensa em um líquido e posicionada dentro da parte de volume P pode ser investigada gerando um campo elétrico na parte de volume P. Em outras palavras, posicionando uma célula na parte de volume P e aplicar uma tensão nos eletrodos que se cruzam para definir a parte de volume P, a célula pode ser eletroporada. Uma vez completada a eletroporação, a célula pode ser inspecionada ou investigada conforme necessário. Um método de investigação deste tipo pode incluir as etapas de inspecionar opticamente a célula eletroporada ou medir parâmetros da célula tal como sua impedância.

Assim, aplicando uma tensão a um eletrodo específico no primeiro conjunto de eletrodos 14 e a um eletrodo no segundo conjunto de eletrodos 16, um campo elétrico pode ser gerado em uma parte específica do volume de análise 18. A parte do volume de análise 18 dentro da qual o campo elétrico é gerado corresponderá ao sítio de cruzamento dos eletrodos ao qual uma tensão é aplicada. Por conseguinte, será apreciado que partes do volume de análise 18 podem ser endereçadas aplicando tensões ao primeiro 14 e ao segundo 16 conjuntos de eletrodos. Um método de endereçamento deste tipo pode ser controlado por dispositivos de controle apropriados de maneira a gerar um campo elétrico em uma ou mais partes de volume conforme possa ser requerido.

Tensões de diferentes amplitudes e/ou durações podem ser

aplicadas aos eletrodos de cada conjunto. Desta maneira, campos elétricos de diferentes magnitudes e duração podem ser gerados em mais de uma parte de volume ao mesmo tempo. Mais de uma célula pode, por conseguinte, ser eletroporada de uma vez, na qual os parâmetros de eletroporação podem  
5 diferir entre as células.

Uma maior compreensão deste método pode ser obtida reportando-se à fig. 2. A fig. 2 é uma vista em seção transversal ao longo da linha X-X da fig. 1 e ilustra o dispositivo de análise sendo usado para eletroporar células 20 suspensas em um fluido 22.

10 O fluido 22 contendo células 20 para análise é previsto no volume de análise 18. De preferência, pelo menos um do primeiro 10 e segundo 12 substratos é formado com um sistema fluídico (não ilustrado) para dirigir o fluido 22 para um sítio de preferência no interior do volume de análise 18. Por exemplo, um sistema fluídico deste tipo pode ser formado de  
15 pelo menos um canal que é previsto no substrato ao longo do qual o fluido 22 é guiado para fluir. Alternativamente, os canais podem ser formados sobre o substrato usando, por exemplo, uma camada fotocondutiva tal como SU-8. Além disso, as células 20 no interior do fluido podem ser posicionadas entre eletrodos opostos usando o fenômeno físico conhecido de dielectroforese  
20 (DEP), eletroforese, eletro-osmose ou eletro-hidrodinâmica.

DEP é um fenômeno físico pelo qual partículas neutras, quando submetidas a campos elétricos não uniformes, tempo estacionários (CC), temporalmente variáveis (CA), experimentam uma força líquida dirigida no sentido de sítios com intensidade de campo crescente (pDEP) ou  
25 decrescente (dDEP). A intensidade da força dielectroforética, além de sua direção, depende fortemente das propriedades dielétricas e condutivas das partículas, e do meio em que o corpo é imerso Naturalmente, deve ser compreendido que estas propriedades podem também variar em função da frequência para campos elétricos de CA. Informações adicionais acerca da

teoria de DEP podem ser encontradas em uma publicação por H.A. Pohl intitulada “Dielectrophoresis” (Cambridge University Press, Cambridge, 1978), o conteúdo da qual é aqui incorporado a título de referência.

Aplicando uma tensão ao eletrodo 16d do segundo conjunto de eletrodos ao mesmo tempo em que tensões de diferentes durações e/ou magnitudes são aplicadas aos primeiros 14a e segundos 14b eletrodos do primeiro conjunto de eletrodos 14, primeiras 20a e segundas células 20b posicionadas nas primeiras 24 e segundas 26 partes de volume, respectivamente, são eletroporadas sob diferentes campos elétricos. Assim, uma comparação entre os resultados do método de eletroporação para as primeiras 20a e segundas células 20b pode ser feita. Este conceito pode ser estendido para eletroporar qualquer número de células suspensas em um líquido, no qual cada célula é posicionada em uma diferente parte de volume e cada parte de volume é definida entre o cruzamento de um eletrodo no primeiro conjunto de eletrodos 14 e um eletrodo no segundo conjunto de eletrodos 16.

Variando a duração e/ou a amplitude da tensão aplicada aos eletrodos dos conjuntos de eletrodos, uma pluralidade de células pode ser eletroporada sob diferentes parâmetros de eletroporação usando um único procedimento de eletroporação. Em outras palavras, as propriedades de eletroporação de múltiplas células podem ser investigadas gerando campos elétricos de diferentes amplitudes ou durações em uma ou mais partes de volume do dispositivo de análise.

A estrutura básica do dispositivo mostrado na fig. 1 é composta de dois substratos substancialmente planos que são separados por um estreito intervalo. Embora não essencial para a invenção, a espessura de uma separação dessa natureza pode ser definida por espaçadores (não mostrados) interpostos entre os primeiro 10 e segundo 12 substratos. Outrossim, é contemplado que a distância entre os substratos tipicamente

seria da ordem de 5 a 50  $\mu\text{m}$ , e de preferência na faixa de 10 a 30  $\mu\text{m}$ .  
Todavia, também deve ser entendido que o dispositivo pode ainda  
compreender dispositivos de ajuste para ajustar o espaçamento entre o  
primeiro 10 e segundo 12 substratos. Desta maneira, o dispositivo pode servir  
5 para diferentes dimensões de células.

Aqueles versados na técnica também apreciarão que o  
dispositivo da fig. 1 tem uma estrutura similar àquela de uma tela de cristal  
líquido de matriz passiva convencional (LCD), no qual o cristal líquido foi  
removido dentre os substratos. Por conseguinte, é contemplado que a  
10 tecnologia e técnicas conhecidas atualmente usadas para fabricar LCDs de  
matriz passiva podem ser usadas para fabricar um dispositivo de análise  
celular de acordo com uma modalidade da invenção.

Reportando-se a seguir à fig. 3, um dispositivo de análise  
celular matriz de acordo com uma modalidade alternativa da invenção é  
15 ilustrado. O dispositivo de análise celular compreende primeiro 30 e segundo  
32 substratos dispostos em relação paralela e mutuamente espaçada, o  
primeiro substrato 30 sendo posicionado verticalmente abaixo do segundo  
substrato 32. Embora não essencial para a invenção, a distância de separação  
pode ser definida por espaçadores (não mostrados) interpostos entre o  
20 primeiro 30 e segundo 32 substratos. Alternativamente, o dispositivo pode  
compreender dispositivos de ajuste para ajustar o espaçamento entre os  
primeiro 30 e segundo 32 substratos. Desta maneira, o dispositivo pode  
atender a diferentes dimensões de células.

Um primeiro conjunto de eletrodos 34 (doravante designado  
25 de primeiro conjunto de eletrodos) é previsto sobre a superfície voltada para  
cima do primeiro substrato 30. Os eletrodos 34 do primeiro conjunto de  
eletrodos são dispostos para formar uma matriz compreendendo fileiras e  
colunas de eletrodos mutuamente espaçados 34. Os eletrodos 34 são  
estruturas de película delgadas convencionais formadas de ITO.

Naturalmente, quaisquer outras técnicas de fabrica e material apropriadas podem ser usadas para formar os eletrodos.

Um único eletrodo em forma de placa 36 (designado a seguir de eletrodo comum 36) é previsto sobre a superfície voltada para baixo do segundo substrato 32. Em outros termos, o eletrodo comum 36 é formado sobre a superfície do segundo substrato 32 que confronta o primeiro conjunto de eletrodos. O eletrodo comum 36 é uma estrutura de película delgada formada de ITO e de tal maneira disposto que cobre uma parte substancial da superfície inferior do segundo substrato 32. Desta maneira, o eletrodo comum 36 é posicionado verticalmente acima do primeiro conjunto de eletrodos de tal modo que cobre a totalidade dos eletrodos 34 no primeiro conjunto de eletrodos.

Assim, o eletrodo comum 36 e o primeiro conjunto de eletrodos respectivamente definem o limite superior e inferior de um volume de análise 38 no qual uma célula contendo fluido pode ser disposta para análise. A parte do volume de análise entre o eletrodo comum 36 e um eletrodo 34 do primeiro conjunto de eletrodo define uma primeira parte do volume de análise (como ilustrado pela região sombreada designada "P").

Embora não essencial para a invenção, o segundo substrato 32 e o eletrodo comum 36 são pelo menos parcialmente transparente. Desta maneira, o líquido previsto no volume de análise pode ser opticamente investigado usando o olho nu ou equipamento óptico apropriado posicionado no exterior do dispositivo. Naturalmente, o primeiro substrato 30 e seus respectivos eletrodos 34 podem em vez disso ser pelo menos parcialmente transparentes em uma modalidade alternativa da invenção.

Um conjunto de circuito ativador de tensão (não mostrado) é eletricamente conectado com o primeiro conjunto de eletrodos através dos condutores de fileira 40, condutores de coluna 42 e um conjunto de elementos de comutação 44. Os condutores de fileira 40, os condutores de coluna 42 e os

elementos de comutação 44 são delgadas estruturas de película e formadas sobre a superfície superior do primeiro substrato 30 nos espaços previstos entre os eletrodos 34 do primeiro conjunto de eletrodos. Além disso, conforme mencionado no parágrafo precedente, estas estruturas de película delgada podem ser pelo menos parcialmente transparentes para adicionalmente simplificar a inspeção óptica do volume de análise. Tipicamente, as estruturas de película delgada podem somente cobrir uma parte relativamente pequena da área superficial e podem ser formadas de materiais não transparentes tal como Al e Si amorfo, etc.

Cada eletrodo 34 do primeiro conjunto de eletrodos é eletricamente conectado com um condutor de fileira 40 e um condutor de coluna 42 através de um elemento de comutação 44. A configuração de matriz resultante (comumente conhecida como uma “matriz ativa” no campo da tecnologia de Tela de Cristal Líquido) é fundamentalmente diferente de uma simples estrutura de matriz passiva pelo fato de que em uma matriz ativa, o esquema de endereçamento e a ativação elétrica de cada parte do volume não são acoplados. Em outras palavras, cada parte de volume é isolada do restante do volume de análise e conectada com o sistema eletrônico de endereçamento exclusivamente através de um elemento de comutação. Assim, cada parte de volume tem seu próprio elemento de comutação para regular o campo elétrico. Cada parte de volume pode, por conseguinte, ser individualmente endereçada durante um curto tempo e a seguir substancialmente isolada das partes de volume restantes durante o restante do quadro temporal.

Dois tipos principais de elementos de comutação são comumente usados em diodos matriz ativos (e.g., *Metal Insulator-Metal* (MIM) NIP, PIN e Shottky) e transistores (TFT: Transistor de Película Delgada). Os transistores de película delgada (TFTs) são amplamente usados como elementos de comutação em LCDs devido ao seu desempenho óptico superior. Todavia, os diodos têm a vantagem de serem relativamente simples

de fabricar. Na modalidade da fig. 3, os elementos de comutação são TFTs e o número de TFTs é o mesmo que o número de partes de volume apresentadas pelo dispositivo.

Reportando-se à fig. 4, cada TT 44 é conectado eletricamente comum condutor de fileira 40 e condutor de coluna 42 do dispositivo. Mais especificamente, os TFTs 44 cada um têm seu eletrodo fonte conectado com um condutor de coluna 42, seu eletrodo porta conectado com um condutor de fileira 40 e seu eletrodo dreno conectado com um eletrodo 44 do primeiro conjunto de eletrodos.

Quando um TFT 44 é endereçado eletricamente por seu respectivo condutor de fileira 40 e condutor de coluna 42, o eletrodo selecionado 34 no dispositivo (*isto é*, uma parte de volume endereçada) é carregado pela corrente fonte-dreno do TFT 44 quando é ativado. Em outras palavras, no estado ‘ativado’, um elemento de comutação de TFT 44 confere uma resposta fortemente não-linear a um sinal de endereçamento, que permite o carregamento rápido (tipicamente 2 a 10  $\mu$ s) de um capacitor de parte de volume composto de um eletrodo 34 do primeiro conjunto de eletrodos e do eletrodo comum 36d do segundo substrato 32.

No estado “inativo”, a carga elétrica é mantida sobre o eletrodo 34, que se torna isolado do restante das partes de volume do dispositivo. Isto assegura um estado estável para o campo elétrico estabelecido na parte de volume

Um scanner de fileira 46 (que pode de outro modo ser designado de um scanner de seleção) é previsto para sequenciar através de fileiras do conjunto TFT (ligado ou desligado) dos TFTs ao longo de uma fileira. Também, um excitador de coluna 48 (que pode de outro modo ser designado de um scanner de dados) é previsto para sequenciar através de colunas e prestar tensões apropriadas para os TFTs. De preferência, os dados são fornecidos a todas as colunas simultaneamente em um método de

endereçamento designado de uma linha de cada vez.

Quando uma fileira  $R_i$  é endereçada, todos os eletrodos porta dos TFTs daquela fileira são ativados. Quando as colunas  $C_1, C_2, C_3$ , etc. são munidas de um sinal de ativação e todas as outras colunas são munidas de um  
 5 sinal de inativação (tal como mesma tensão conforme está presente sobre os eletrodos comuns), somente as partes de volume  $R_iC_i, R_iC_2, R_iC_3$ , etc. são ativadas (isto é, todos os eletrodos na fileira receberão uma tensão de sua coluna).

O dispositivo mostrado na fig. 4 contém  $m$  colunas e  $n$  fileiras.  
 10 O scanner de fileira 46 progressivamente examina o conjunto TFT ativando ou desativar os TFTs na fileira 1, sucedida pela fileira 2, e através de e terminando com a fileira  $n$ . Quando a fileira 1 é selecionada, o ativador de coluna 48 aplica diferentes níveis de tensão a cada coluna a partir da coluna 1 até a coluna  $m$ .

15 A fileira selecionada é então avançada e as novas tensões são aplicadas às colunas.

Por conseguinte, será apreciado que cada eletrodo 34 do primeiro conjunto de eletrodos (e por isso, cada parte de volume) pode ser endereçado individualmente, onde a tensão aplicada a cada eletrodo 34 pode  
 20 ser controlada.

Naturalmente, o ativador de coluna 48 pode ser previsto para aplicar uma tensão predeterminada diferente a cada coluna, enquanto scanner de fileira 46 é previsto para progressivamente escanear as fileiras do conjunto TFT e ativar ou desativar cada fileira por diferentes períodos de tempo. Desta  
 25 maneira, os dois eixos geométricos do conjunto TFT são usados para variar a duração e a amplitude da tensão aplicada às diferentes partes de volume do dispositivo.

Este conceito é ilustrado nas figs. 5 e 6 nas qual a tensão ao longo de cada fileira aumenta através da fileira da esquerda para direita, e no

qual a duração do pulso de tensão aplicado ao longo de cada coluna de cima para baixo.

Mais especificamente, as tensões  $V_1, V_2, V_3, \dots, V_m$  são aplicadas às colunas  $C_1, C_2, C_3, \dots, C_m$  respectivamente, nas quais  $V_1 < V_2 < V_3 < \dots < V_m$ . Também, as fileiras  $R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$  são ativadas durante os tempos  $T_1 < T_2 < T_3 < \dots < T_n$ , respectivamente, em que  $T_1 < T_2 < T_3 < \dots < T_n$ .

Para aplicar uma tensão a um eletrodo dado na primeira fileiras (Fileira 1) os TFTs 44 da Fileira 1 são comutados para o estado condutivo aplicando um sinal seletivo. As tensões ativadoras nas colunas são então estabelecidas aos seus níveis predeterminados e estas tensões são passadas através dos TFTs da Fileira 1 para os eletrodos 34 do conjunto de eletrodos final dentro da Fileira 1. Durante este tempo, os sinais seletivos das fileiras remanescentes são mantidos no estado não seletivo, para que os eletrodos restantes 34 do primeiro conjunto de eletrodos sejam conectados com sua respectiva fileira 40 e condutor de coluna 42 através de um TFT 44 não condutivo e não recebam uma tensão.

Após os eletrodos 34 na Fileira 1 serem estabelecidos às tensões predeterminadas, os TFTs 44 na Fileira 1 são mais uma vez retornados ao estado não condutivo, desse modo prevenindo alteração adicional nas tensões da primeira fileira de eletrodos.

Para aplicar uma tensão a um eletrodo dado 34 na segunda fileira (Fileira 2), os TFTs 44 na Fileira 2 são comutados para o estado condutivo pela aplicação de um sinal seletivo. Mais uma vez, as tensões ativadoras nas colunas são estabelecidas aos seus níveis predeterminados. Estes podem ser idênticos aqueles aplicados à Fileira 1, ou diferentes. Estas tensões são então passadas através dos TFTs da Fileira 2 para os eletrodos 34 do primeiro conjunto de eletrodos dentro da Fileira 2. Durante este tempo, os sinais seletivos das fileiras remanescentes são mantidos no estado não condutivo, para que os eletrodos restantes 34 do primeiro conjunto de

eletrodos sejam conectados com seu respectivo condutor de fileira 40 e de coluna 42 através de um TFT 44 não condutivo e não recebam uma tensão.

Após os eletrodos 34 na Fileira 2 serem estabelecidos às tensões predeterminadas, os TFTs 44 na Fileira 2 são mais uma vez estabelecidos no estado não condutivo, prevenindo alteração adicional nas tensões da segunda fileira de eletrodos.

Todas as fileiras subseqüentes de eletrodos 34 são endereçadas de uma maneira similar. Ao término deste primeiro quadro temporal, todos os eletrodos 34 do primeiro conjunto de eletrodos têm uma tensão predeterminada aplicada aos mesmos. Esta tensão permanecerá sobre cada eletrodo 34 durante o primeiro período de quadro (tipicamente 1 ms a 150 ms). Opcionalmente, um armazenamento em capacitor previsto em paralelo com o elemento de eletroporação pode ser previsto para prolongar o período de tempo que a tensão aplicada permanece sobre cada eletrodo.

Em modalidades alternativas, o circuito eletrônico em cada parte de volume pode ser modificado de tal maneira que a tensão é mantida sobre o eletrodo mesmo no caso em que durante um período de não endereçamento a carga vaze entre o eletrodo e quer o eletrodo comum quer os eletrodos vizinhos. Por exemplo, conforme ilustrado na fig. 7, o circuito pode ser modificado de tal maneira que o eletrodo seja conectado através de um segundo comutador 50 (tal como um comutador TFT) com uma linha alimentadora de tensão 52. No caso de um comutador TFT 50, o primeiro comutador 44 é usado para estabelecer o estado do segundo comutador 50 (quer conduzindo quer não condutivo), aplicando uma tensão ao eletrodo porta do segundo TFT 50 de comutação. Armazenando esta tensão sobre o eletrodo porta (usando quer a auto capacitância do segundo comutador quer com um outro capacitor de armazenamento 54), é possível manter o comutador no seu estado condutivo por um prolongado período de tempo. Isto assegura que a tensão seja mantida sobre o eletrodo. Outrossim, para habilitar

mais níveis de tensão, é possível conectar o eletrodo com uma de uma pluralidade de linhas fonte de alimentação de tensão usando uma pluralidade de comutadores adicionais.

5 Para realizar pulsos de tensão de diferentes durações, o endereçamento de diferentes fileiras na tela pode se processar em subseqüentes quadros temporais.

As tensões aplicadas a eletrodo 34 da fileira 1 no primeiro quadro temporal estarão presentes sobre os eletrodos 34 até o período de endereçamento seguinte (no segundo quadro temporal) no qual a tensão é  
10 estabelecida à mesma tensão que está presente sobre os eletrodos 34 até o período de endereçamento seguinte (no segundo quadro temporal) no qual a tensão é estabelecida à mesma tensão que está presente sobre o eletrodo comum, e.g. 0 V. Neste ponto, a eletroporação se detém na fileira 1. Em quadros temporais subseqüentes, a Fileira 1 não é endereçada (como mostrado  
15 na figura 6) ou pode ser repetidamente endereçada com uma tensão de 0 V. Todavia, para aplicar uma tensão de maior duração aos eletrodos da Fileira 2, a Fileira 2 é endereçada tanto no primeiro quadro temporal como no segundo quadro temporal. Alternativamente, porém de menor preferência, a Fileira 2 não necessita ser endereçada no segundo quadro, com isto a tensão será  
20 mantida que foi aplicada no primeiro quadro. Assim, a tensões aplicadas são mantidas na Fileira 2 para o segundo quadro. A tensão é então ajustada a 0 V somente no terceiro quadro de tempo. Neste ponto, a eletroporação é descontinuada na Fileira 2. Por conseguinte, será apreciado que a duração das tensões aplicadas aos eletrodos 34 da Fileira 2 é duas vezes aquela dos  
25 eletrodos na Fileira 1.

De maneira similar, os eletrodos 34 das Fileiras 3, 4 e 5 são aplicados com durações de tensão progressivamente maiores endereçando estas fileiras com as tensões predeterminadas em adicionais quadros temporais subseqüentes.

Assim, utilizando os dois eixos geométricos da matriz para variar a duração e a amplitude dos pulsos elétricos conferidos às células posicionadas em diferentes partes de volume, uma pluralidade de células pode ser eletroporada sob diferentes parâmetros de eletroporação usando um único método de eletroporação. Em outras palavras, as propriedades de eletroporação de múltiplas células podem ser investigadas gerando campos elétricos de diferentes amplitudes ou durações em uma ou mais partes de volume do dispositivo de análise.

Uma vez que o método de eletroporação seja completado, as células podem ser inspecionadas ou investigadas conforme necessário. Um método de investigação dessa natureza pode incluir as etapas de inspecionar oticamente a célula eletroporada ou medir parâmetros das células tal como sua impedância.

A figura 8 ilustra a operação do dispositivo da fig. 3 de acordo com outra modalidade da invenção. Nesta modalidade, a matriz é dividida em 1 a N conjuntos unidimensionais de eletrodos ( $A_1$  a  $A_N$ ), razão pela qual a tensão ao longo de cada fileira de eletrodos aumenta através da fileira da esquerda para a direita, e a duração da tensão aplicada a cada fileira é substancialmente a mesma.

Mais especificamente, as tensões  $V_1, V_2, V_3 \dots V_m$  são aplicadas às colunas  $C_1, C_2, C_3 \dots C_m$ , respectivamente, nas quais  $V_1 < V_2 < V_3 \dots < V_m$ . Também, as fileiras  $R_1, R_2, R_3 \dots R_n$  são cada uma ativada por um tempo igual  $T_R$ .

Cada conjunto pode ser selado para conter células a serem analisadas e um diferente reagente. Assim, utilizando a mesma matriz, diferentes experimentos de eletroporação podem ser conduzidos em paralelo, no qual cada experimento efetuado sobre células em suspensão em um reagente específico.

Em uma modalidade alternativa, mais genérica, o dispositivo

pode ser dividido em uma multiplicidade de subconjuntos, no qual cada conjunto contém um reagente diferente e onde a amplitude e a duração da tensão aplicada podem variar.

5       Pela descrição acima, será compreendido que a modalidade da  
fig. 3 tem uma estrutura similar àquela de uma tela de cristal líquido de matriz  
ativa convencional (LCD), no qual o cristal líquido foi removido dentre os  
substratos. Por conseguinte, é contemplado que a tecnologia conhecida e as  
técnicas empregadas para fabricar LCDs de matriz ativa podem ser usadas  
para fabricar um dispositivo de análise celular de acordo com uma  
10       modalidade da invenção.

Quando comparado com aquela de uma matriz passiva, o  
esquema de endereçamento de uma matriz ativa habilita a carga elétrica a ser  
mantida por um tempo mais longo, desse modo permitindo que o campo  
elétrico de cada parte de volume seja bem estabelecido e permaneça em um  
15       estado quase estável. Outrossim, uma matriz ativa habilita rápido  
carregamento e manutenção de carga proporciona rápidos tempos de  
endereçamento e também habilita altas relações de multiplexação de mais de  
1500. É também observado que o isolamento elétrico de cada parte de volume  
que é provido em um dispositivo de matriz ativo suprime diafonia entre partes  
20       de volume, aperfeiçoando grandemente a precisão quando comparada com  
simples matrizes passivas.

Deve ser observado que as modalidades acima mencionadas  
ilustram mais exatamente do que limitam a invenção, e que aqueles versados  
na técnica estarão habilitados a projetar muitas modalidades alternativas sem  
25       se afastar do âmbito das reivindicações. A invenção pode ser implementada  
por intermédio de hardware compreendendo vários elementos distintos, e por  
intermédio de computador apropriadamente programado. Na reivindicação do  
dispositivo enumerando vários dispositivos, vários dos dispositivos podem ser  
incorporados por um o mesmo componente de hardware.

## REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de análise celular para investigar as propriedades de eletroporação de células em suspensão em um fluido, o dispositivo caracterizado pelo fato de que compreende:

5                    primeiro (30) e segundo (32) eletrodos mutuamente espaçados:  
                     um primeiro conjunto de eletrodos (34) formado sobre uma superfície do primeiro substrato (30);

                     pelo menos um eletrodo (36) formado sobre uma superfície do segundo substrato (32) confrontando o primeiro conjunto de eletrodos (34), o  
10                    pelo menos um eletrodo (36) e o primeiro conjunto de eletrodos (34) desse modo definindo os limites superior e inferior de um volume de análise (38) para receber o fluido, o volume de análise (38) compreendendo um conjunto de partes de volume (P); e

                     conjunto de circuito previsto para modificar a amplitude ou  
15                    duração de uma tensão aplicada ao pelo menos primeiro conjunto de eletrodos (34) de modo a gerar e modificar um campo elétrico em uma ou mais partes de volume (P) do dispositivo.

                     2. Dispositivo de análise celular de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro e segundo substratos  
20                    compreendem substratos de tela de cristal líquido.

                     3. Dispositivo de análise celular de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dentre o primeiro (30) e o segundo (32) substratos é formado com um sistema fluídico para dirigir o fluido para um sítio dentro do volume de análise (38).

25                    4. Dispositivo de análise celular de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dentre o primeiro (30) e o segundo (32) substratos e seu respectivo eletrodo é pelo menos parcialmente transparente.

                     5. Dispositivo de análise celular de acordo com qualquer

reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma pluralidade de elementos de comutação (44) e no quais os elementos de comutação (44) de tal maneira dispostos que cada eletrodo (34) do primeiro conjunto de eletrodos é eletricamente conectado com pelo menos um elemento de comutação (44) para regular uma tensão aplicada ao eletrodo (34).

6. Dispositivo de análise celular de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um esquema de circuito para manter uma tensão sobre pelo menos um eletrodo (34) do primeiro conjunto dos eletrodos.

7. Dispositivo de análise celular de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um elemento de ajuste para ajustar o espaçamento entre o primeiro (30) e o segundo (32) substratos para atender à dimensão das células a serem analisadas.

8. Dispositivo de análise celular de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que pelo menos um eletrodo (34) do primeiro conjunto de eletrodos e o pelo menos um eletrodo (36) formado sobre a superfície do segundo substrato (32) é uma estrutura de película delgada.

9. Dispositivo de análise celular de acordo com qualquer reivindicação precedentes, caracterizado pelo fato de que o volume de análise (38) é dividido em mais de um conjunto de partes de volume e cada conjunto de partes de volume se adaptado para receber um fluido diferente.

10. Método de operar um dispositivo de análise celular para investigar as propriedades de eletroporação de células suspensas em um fluido, o dispositivo compreendendo dois substratos mutuamente espaçados com um volume de análise definido entre eles e o volume de análise compreendendo um conjunto de partes de volume;

e o método caracterizado pelo fato de que compreender a etapa de gerar campos elétricos de diferentes amplitudes ou durações em uma ou mais partes de volume do dispositivo com o fluido disposto no seu interior.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende ainda as etapas de manipular as células usando pelo menos um dentre dielectroforese, eletroforese, eletro-osmose, e eletrohidrodinâmica.

12. Método de fabricar um dispositivo de análise celular para investigar as propriedades de eletroporação de células em suspensão em um fluido, o método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- formar um primeiro conjunto de eletrodos (34) sobre uma superfície de um primeiro eletrodo (30);

- formar pelo menos um eletrodo (36) sobre a superfície de um segundo substrato (32) voltado para o primeiro conjunto de eletrodos (34), espaçando primeiro (30) e segundo (32) substratos mutuamente espaçados entre si com as superfícies mutuamente confrontantes, o pelo menos um eletrodo (36) e o primeiro conjunto de eletrodos (34) desse modo definindo os limites superior e inferior de um volume de análise (38) para receber o fluido, o volume de análise (38) compreendendo um conjunto de partes de volume (P); e

- proporcionar conjuntos de circuito para modificar a amplitude ou duração de uma tensão aplicada pelo menos ao primeiro conjunto de eletrodos de tal modo que um campo elétrico possa ser gerado ou modificado em uma ou mais partes de volume (P) do dispositivo;

13. Método de fabricar um dispositivo de análise celular para investigar as propriedades de eletroporação de células suspensas em um fluido, o método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- desmontar uma tela de cristal líquido; e

- remover o material de cristal líquido.

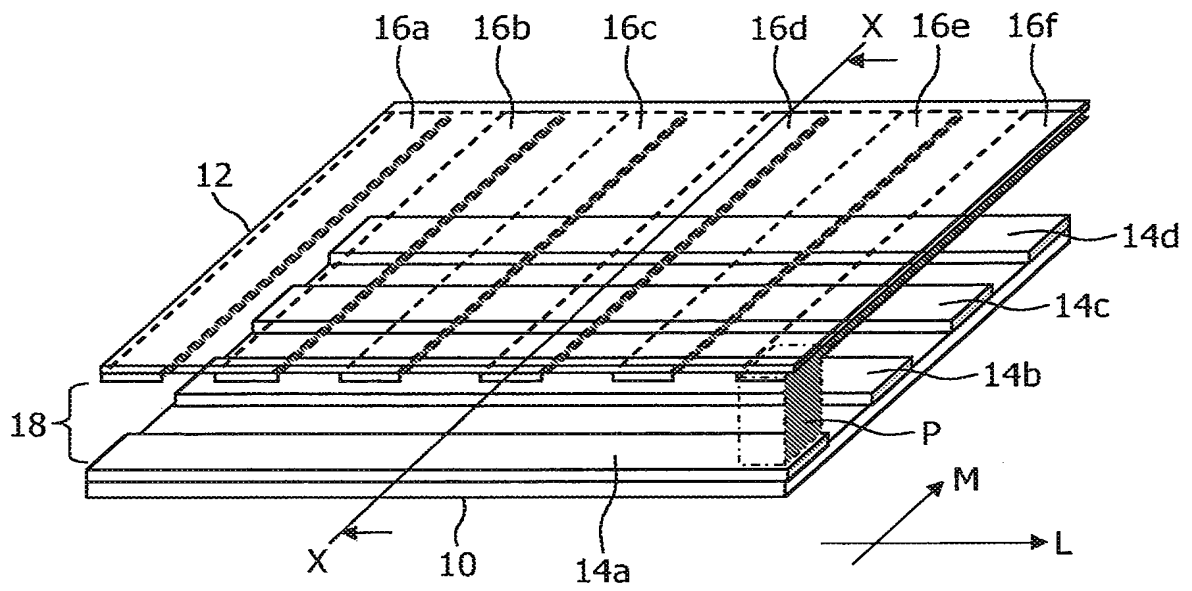


FIG. 1

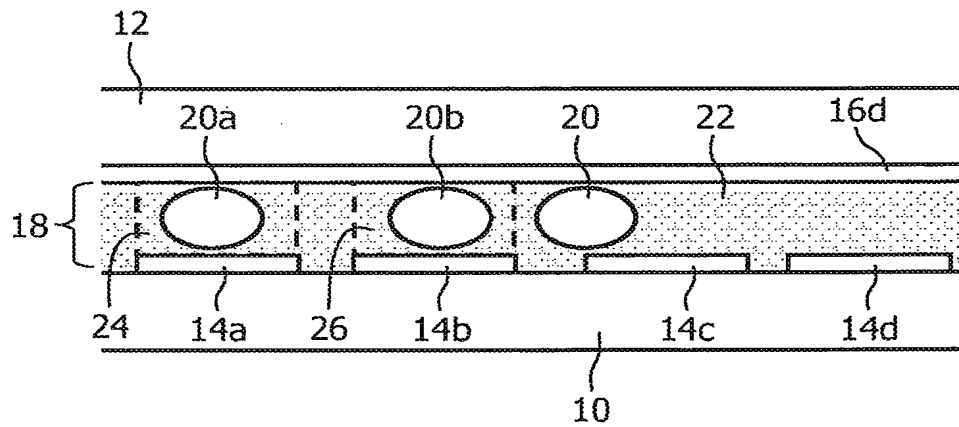


FIG. 2

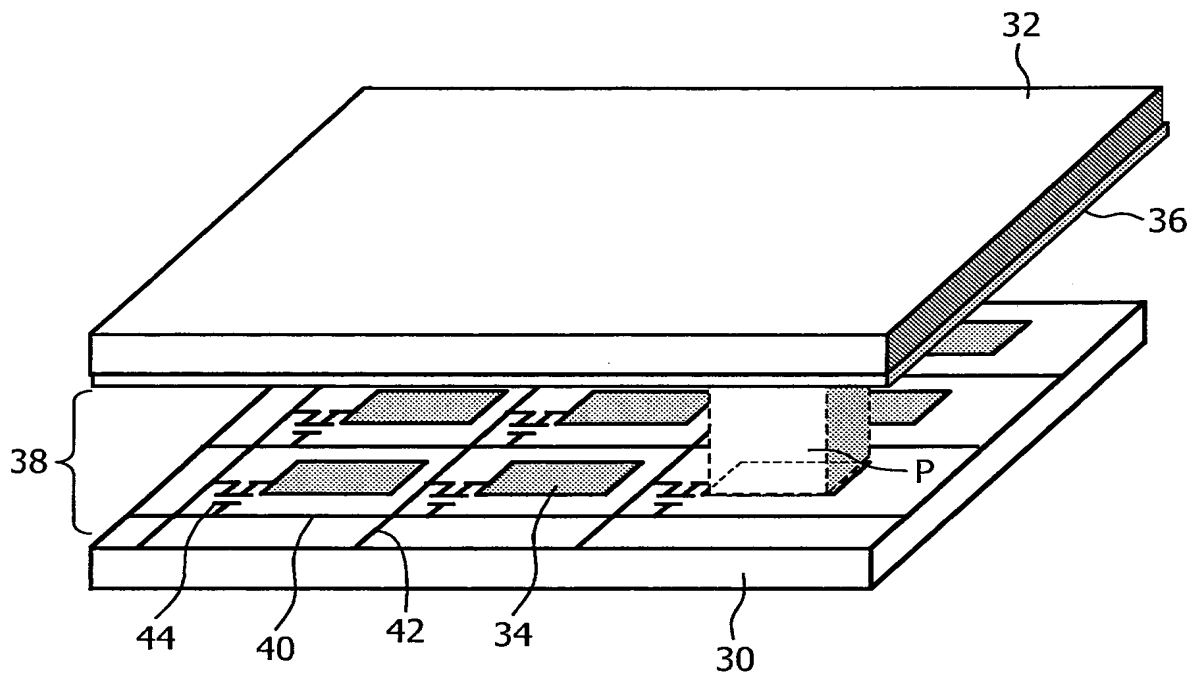


FIG. 3

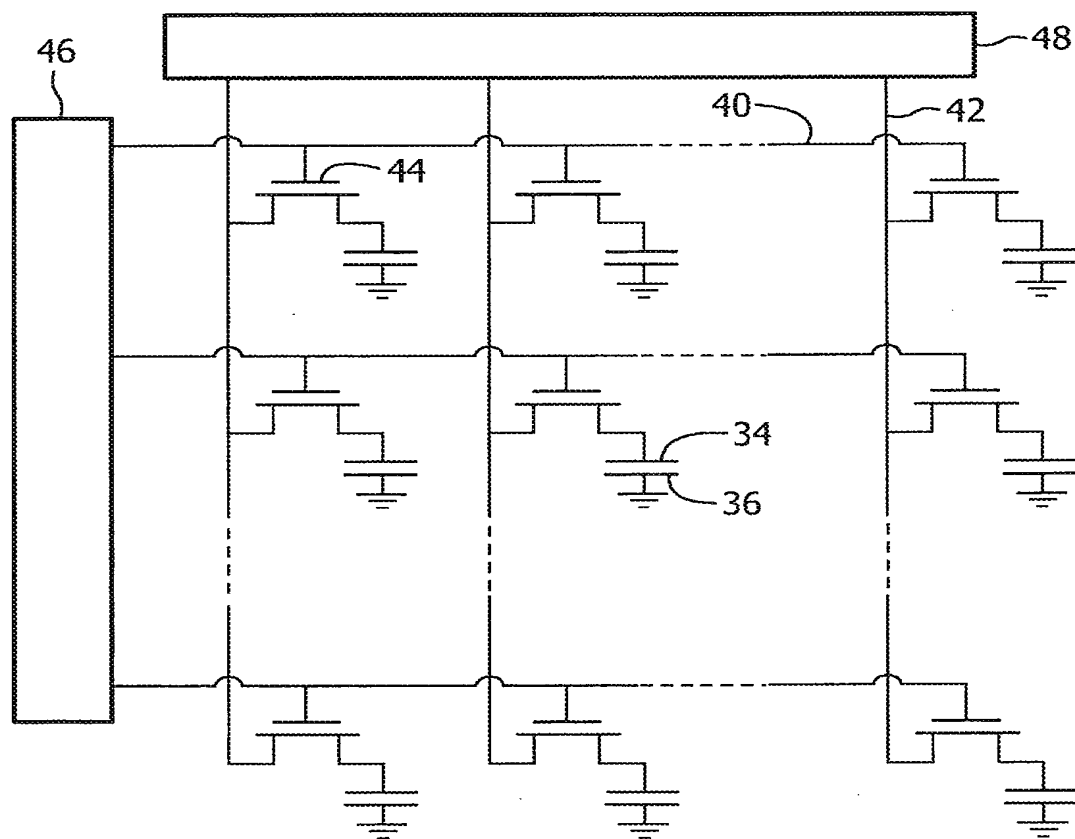


FIG. 4

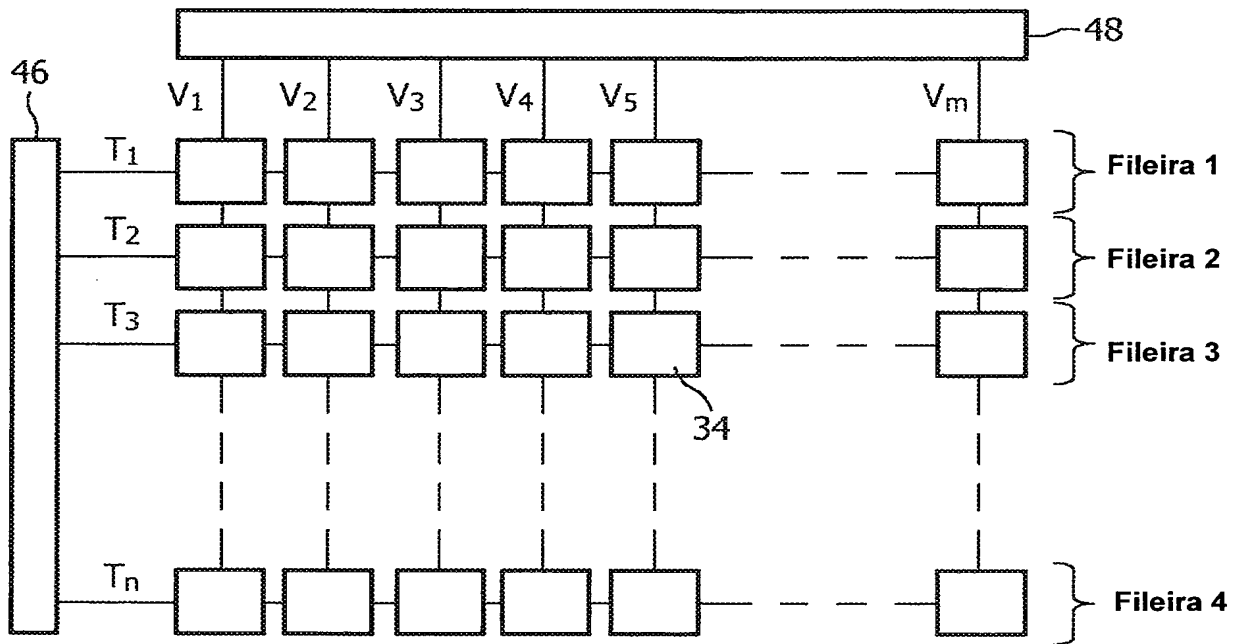


FIG. 5

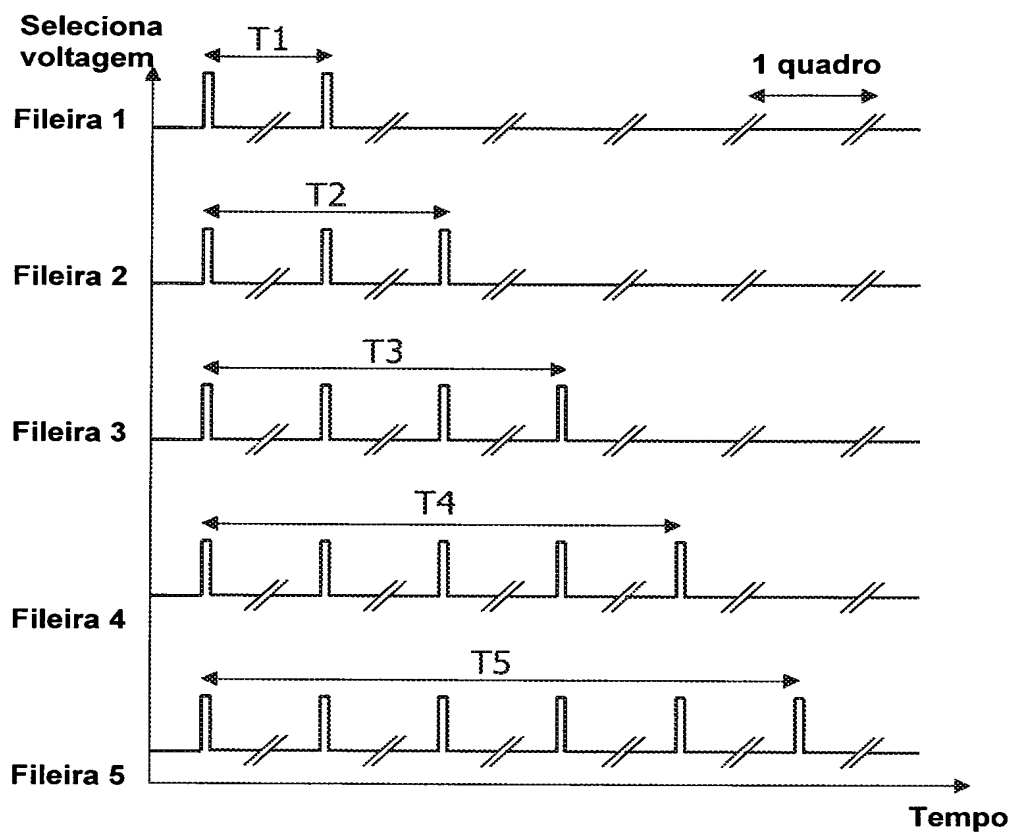


FIG. 6

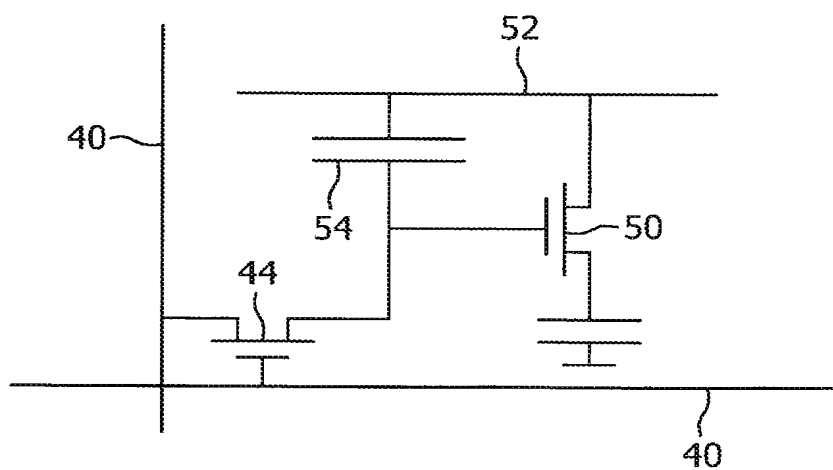


FIG. 7

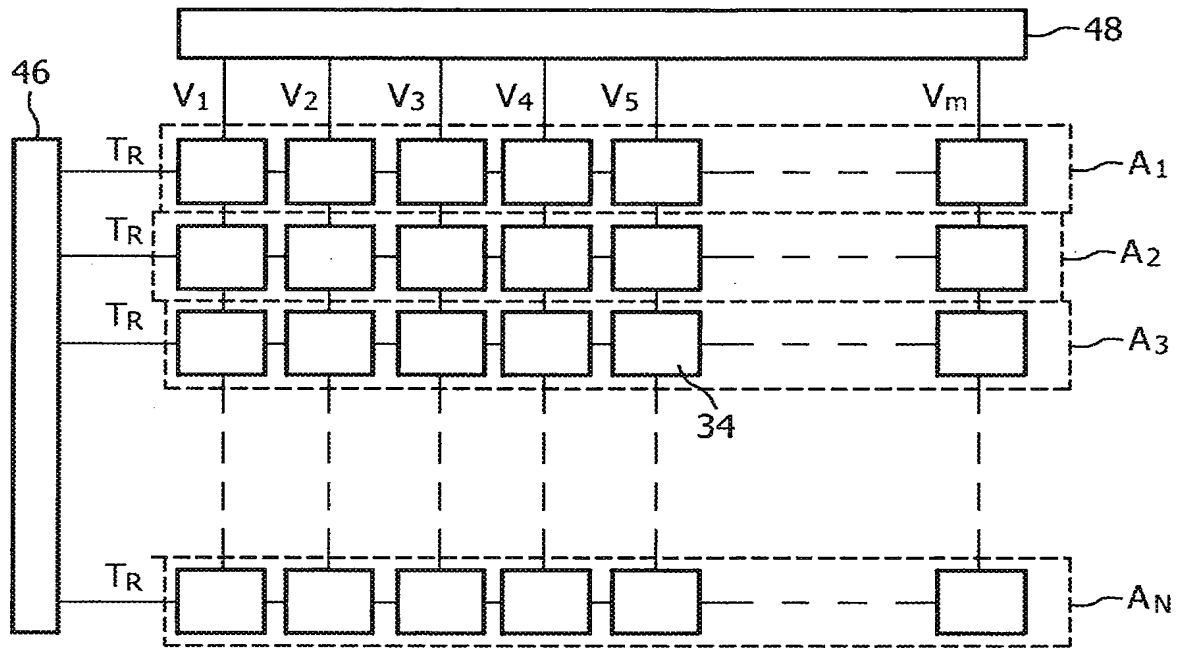


FIG. 8

## RESUMO

“DISPOSITIVO DE ANÁLISE CELULAR E MÉTODOS DE OPERAR E DE FABRICAR UM DISPOSITIVO DE ANÁLISE CELULAR”

Um método e aparelho para investigar as propriedades de células em suspensão em um fluido. O aparelho compreende: primeiro e segundo substratos mutuamente espaçados; um primeiro conjunto de eletrodos formado sobre uma superfície do primeiro substrato, pelo menos um eletrodo formado sobre a superfície do segundo substrato confrontando o primeiro conjunto de eletrodos. O pelo menos um eletrodo e o primeiro conjunto de eletrodos desse modo define os limites superior e inferior de um volume de análise para receber o fluido, o volume de análise compreendendo um conjunto de partes de volume. O conjunto de circuito é previsto para modificar a amplitude e a duração de uma tensão aplicada a pelo menos o primeiro conjunto de eletrodos de modo a gerar e modificar um campo elétrico em uma ou mais partes de volume do dispositivo. Assim, as propriedades de eletroporação das células podem ser investigadas gerando os campos elétricos de diferentes amplitudes ou durações em uma ou mais partes de volume do aparelho com o fluido encerrado no seu interior.