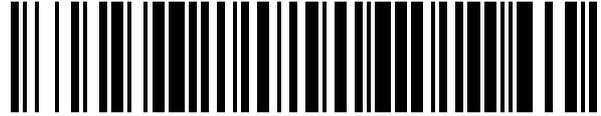


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 214 179**

21 Número de solicitud: 201830635

51 Int. Cl.:

G01N 21/05 (2006.01)

G02B 21/34 (2006.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

01.10.2015

30 Prioridad:

01.10.2015 ES P201531401

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.06.2018

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID (100.0%)
Av. Gregorio Peces Barba, 1
28919 Leganés (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**RIPOLL LORENZO, Jorge y
ARRANZ DE MIGUEL, Alicia**

54 Título: **Dispositivo de carga múltiple para microscopio de haz láser plano**

ES 1 214 179 U

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de carga múltiple para microscopio de haz láser plano

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de los dispositivos empleados para la carga de muestras en microscopios, y más particularmente en microscopios de iluminación de haz láser plano usados para la obtención de imágenes de varias muestras transparentes o semi-transparentes tales como embriones, tejidos y otras muestras biológicas.

El objeto de la presente invención es un nuevo dispositivo de carga múltiple que permite la alimentación al microscopio de haz láser plano de un flujo continuo y secuencial de muestras.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los estudios de embriones y muestras biológicas similares a través de microscopio óptico presentan, a diferencia de lo que sucede con células individuales, problemas particulares relacionados con la absorción de la luz y la pérdida de resolución debida a la dispersión de la luz. Para solucionar estos problemas, en los últimos años se han desarrollado mejoras importantes sobre los microscopios de haz láser plano, cuya invención data del 1903.

Un microscopio de haz láser plano está formado fundamentalmente por una cámara acoplada a un objetivo de alta apertura numérica y dispuesta según una dirección denominada "*dirección de detección*", y un medio de iluminación capaz de emitir una lámina delgada de luz según una dirección denominada "*dirección de iluminación*" que es perpendicular a la dirección de detección, siguiendo la configuración original de Siedentopf y Zsigmondy acoplada a una cámara de detección. Con esta configuración, la cámara puede obtener una imagen 2D de fluorescencia de la parte de la muestra iluminada por la lámina o plano de iluminación. Si además se desplaza la muestra en la dirección del eje de detección y se toman varias imágenes 2D en diferentes posiciones, se genera un conjunto o pila de imágenes 2D donde cada una de las imágenes 2D corresponde a una posición del plano de iluminación con respecto a la muestra. Esta pila de imágenes 2D contiene información de la posición en z (profundidad de la muestra según la dirección de detección) obtenida al mover la muestra, y de las posiciones x e y, presentes en cada imagen 2D. La pila de imágenes 2D

puede entonces fusionarse para generar una imagen 3D de la muestra, como se describe en el documento US 7,554,725 de Stelzer et al. Posteriormente, se propuso hacer rotar la muestra alrededor de su propio eje, normalmente vertical, para captar varias pilas de imágenes 2D (comúnmente denominadas “medidas angulares”) y fusionarlas posteriormente, lo que permite mejorar la anisotropía y la calidad de las imágenes (S. Preibisch et al, Nature Methods 7 (2010)).

Para una comprensión más clara de esta técnica, se adjunta la Fig. 1 que muestra un ejemplo de microscopio (100) de haz láser plano. La muestra (107) se dispone en un soporte (101) dentro de una cubeta (102) rellena con un líquido. Un haz (103) de iluminación lineal Gaussiano, Bessel, Airy o similar, incide sobre una lente (104) cilíndrica que lo enfoca gracias a un objetivo (105) de iluminación para generar la lámina (106) de iluminación plana vertical. Esta lámina (106) de iluminación plana vertical incide sobre la muestra (107) según la dirección de iluminación (DI), y la luz fluorescente (108) emitida por la muestra es recogida por un objetivo (109) de detección orientado según la dirección de detección (DD), que es perpendicular a la dirección de iluminación (DI). El soporte (101) puede girar alrededor de su eje vertical para permitir la toma de varias medidas angulares de acuerdo con la técnica propuesta por Preibisch.

Recientemente, los inventores de la presente solicitud han presentado la solicitud de patente PCT/ES2015/070455 que describe un nuevo microscopio que combina la técnica de haz láser plano de tipo SPIM (Selective Plane Illumination Microscope) con la técnica de la tomografía de proyección óptica (OPT, Optical Projection Tomography).

La técnica OPT (Tomografía de Proyección Óptica, *Optical Projection Tomography* según sus siglas en inglés), descrita en el documento US20060122498 A1, es relativamente similar a la tomografía por rayos X. Se basa fundamentalmente en iluminar ópticamente la muestra de forma homogénea y obtener, en el lado de la muestra opuesto a aquel desde el que se ilumina, una imagen que puede asimilarse a la “sombra” que proyecta la muestra sobre un plano, o en el caso de medir la fluorescencia, la emisión total del volumen iluminado. Esta “sombra” o emisión de fluorescencia, normalmente denominada imagen de proyección, tiene diferentes tonos de gris en función de la absorción de la luz y/o emisión de fluorescencia que se produce en diferentes partes de la muestra. Si se ilumina la muestra desde varios ángulos, es posible implementar un algoritmo de reconstrucción sobre todas las imágenes obtenidas para generar una imagen 3D de dicha muestra. Este algoritmo de reconstrucción suele estar basado en resolver la transformada de Radon, originalmente desarrollada para la

imagen 3D con rayos X.

El nuevo microscopio descrito en la solicitud de patente PCT/ES2015/070455 de los mismos inventores no almacena una imagen 2D completa por cada posición de la lámina de
5 iluminación, sino que para cada ángulo de adquisición almacena únicamente un parámetro representativo de cada píxel obtenido mediante técnicas de tipo OPT. Es decir, para cada ángulo de adquisición se almacena una única imagen de proyección 2D, en lugar de toda una pila de imágenes 2D (como en la técnica de haz láser plano). Esto permite no sólo disminuir los requerimientos del sistema, sino también aumentar la velocidad de adquisición.

10

El uso de este nuevo microscopio abre un nuevo campo que, entre otras utilidades, permite la obtención de imágenes de varias muestras dispuestas verticalmente una encima de la otra. Sin embargo, no existe actualmente ningún dispositivo de carga adecuado para suministrar al microscopio múltiples muestras de manera secuencial.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención está dirigida a un dispositivo de carga múltiple que permite alimentar de manera continua múltiples muestras a un microscopio de haz láser plano. Es más,
20 aunque el dispositivo de carga múltiple de la presente invención está pensado específicamente para su uso con el microscopio de haz láser plano descrito en la patente PCT/ES2015/070455, podría utilizarse con cualquier microscopio de haz láser plano, o incluso potencialmente con cualquier otro tipo de microscopio, como por ejemplo un microscopio de tomografía de proyección óptica.

25

Un microscopio de haz láser plano comprende una cubeta de recepción de las muestras en estudio que está rellena de un líquido, estando la zona de medida del microscopio de haz láser plano situada en el interior de dicha cubeta. El dispositivo de carga de la presente invención comprende fundamentalmente un conducto capilar que atraviesa dicha cubeta y
30 un elemento de generación de flujo que provoca un flujo continuo de las muestras por la cubeta. A continuación, se describe cada uno de estos elementos con mayor detalle.

a) Conducto capilar

35

Se trata de un conducto que atraviesa la zona de medida de la cubeta de recepción para permitir el paso controlado de las muestras que se van a estudiar. Para que

pueda realizarse la medida, las muestras deben pasar por el conducto de manera secuencial, por lo que el diámetro de dicho conducto capilar está configurado de tal modo que sólo permite el paso de las muestras de una en una.

5 El conducto capilar en su paso a través de la cubeta de recepción puede configurarse de diferentes modos en función de las aplicaciones:

10 - En una primera realización preferida según la presente invención, el tramo de conducto capilar que atraviesa la cubeta está dispuesto según una dirección esencialmente rectilínea vertical, de modo que entra en la cubeta verticalmente por su lado superior y sale verticalmente por su lado inferior. Esta configuración presenta el pequeño inconveniente de que el conducto capilar debe atravesar el fondo de la cubeta de manera completamente estanca para evitar pérdidas de líquido. Como se describirá más adelante, ello puede conseguirse de una
15 manera sencilla utilizando una junta tórica estanca de goma, silicona o similar.

20 - En una segunda realización preferida de la presente invención, el tramo de conducto capilar que atraviesa la cubeta está dispuesto según una dirección esencialmente en U que entra y sale de la cubeta verticalmente por su lado superior. Esta configuración alternativa es menos elegante que la anterior, pero a cambio se evita la necesidad de atravesar el fondo de la cubeta. Ello permite su uso con cubetas convencionales que no requieren ningún tipo de modificación.

25 En cuanto al material del que está hecho el conducto capilar, dependerá del fluido utilizado, el cual a su vez depende del tipo de muestra que se vaya a analizar. Dependiendo del medio que la muestra requiere para permanecer en condiciones óptimas se seleccionará el fluido y posteriormente se ajustará el índice refracción del conducto capilar y el medio de la cubeta a este. Por ejemplo, en el caso de
30 estudios in-vivo en pez cebra, el medio en el que deben permanecer los especímenes es agua salada. En este caso, tanto el líquido del conducto, como el de la cubeta sería agua salada, y el conducto capilar sería de polipropileno-etileno fluorado (FEP). En el caso de realizar medidas en muestras clareadas con sustancias químicas, el fluido que contiene las muestras sería el último reactivo
35 usado en el proceso de clareado, en cuyo caso los conductos y el capilar serían de vidrio y la cubeta estaría rellena de aceite de silicona.

5 Por lo tanto, en una realización preferida de la invención el conducto capilar está hecho de polipropileno-etileno fluorado (FEP). En otra realización preferida de la invención, el conducto capilar está hecho de vidrio, y más preferentemente vidrio de borosilicato (comúnmente denominado como pyrex).

10 En cuanto al líquido interior de la cubeta, con el fin de evitar distorsiones de la medida debe tratarse de un líquido con un índice de refracción similar al del tramo de conducto capilar que atraviesa la cubeta. Como se ha comentado, cuando el tramo de conducto capilar que atraviesa la cubeta está hecho de FEP, preferentemente se utiliza agua salada, mientras que cuando el tramo de conducto que atraviesa la cubeta está hecho de vidrio, preferentemente se utiliza aceite de silicona. En cualquier caso, sería posible utilizar otros líquidos existentes en el mercado para conseguir un ajuste óptimo de los índices de refracción del conducto capilar y el líquido interior de la cubeta.

15

Por otro lado, el fluido que discurre por el interior del conducto capilar y en el que están inmersas las muestras en estudio normalmente también se elige para que su índice de refracción se ajuste al material del tramo de conducto capilar que atraviesa la cubeta. Por tanto, si el tramo de conducto capilar que atraviesa la cubeta está hecho de FEP, el fluido será preferentemente agua salada, mientras que si el tramo de conducto capilar que atraviesa la cubeta está hecho de vidrio, el fluido será preferentemente aceite de silicona.

20

25 b) Elemento de generación de flujo regulable

Se trata de un elemento de generación de flujo regulable conectado al conducto capilar y configurado para provocar un flujo continuo y controlable de muestras inmersas en un medio fluido a través de dicho conducto capilar.

30

El elemento de generación de flujo regulable puede ser de cualquier tipo siempre que el flujo generado pueda regularse con el propósito de controlar la velocidad de paso de las muestras a estudiar por la zona de medida de la cubeta de recepción. En realizaciones preferidas de la invención, el elemento de generación de flujo regulable puede elegirse entre una bomba de impulsión conectada aguas arriba de la cubeta de recepción de muestras y una bomba de vacío conectada aguas debajo

35

de la cubeta de recepción de muestras. Por ejemplo, se puede utilizar una bomba peristáltica.

El funcionamiento de este dispositivo es fundamentalmente el siguiente. Se introducen las muestras a través de un extremo del conducto capilar ubicado aguas arriba de la cubeta de recepción. En este contexto, el término "*aguas arriba*" se interpreta como referente a cualquier punto del tramo de conducto capilar situado antes de la cubeta de recepción teniendo en cuenta el sentido del flujo del fluido en el que están inmersas las muestras. Esto se puede hacer de varios modos, aunque preferentemente el dispositivo de la invención comprende un depósito de muestras a estudiar conectado al conducto capilar en un punto situado aguas arriba de la cubeta de recepción. Se acciona entonces el elemento de generación de flujo para hacer que el fluido del interior del conducto capilar, y por tanto también las muestras inmersas en el mismo, fluya a una velocidad tal que el microscopio de haz láser plano pueda obtener imágenes de las muestras individuales. Las muestras individuales estudiadas salen entonces a través de un extremo aguas abajo de la cubeta de recepción. En este contexto, el término "*aguas abajo*" se interpreta como referente a cualquier punto del tramo de conducto capilar situado después de la cubeta de recepción teniendo en cuenta el sentido del flujo del fluido en el que están inmersas las muestras. Las muestras estudiadas pueden desecharse o bien, de acuerdo con una realización preferida de la invención, el dispositivo puede comprender un depósito de muestras estudiadas conectado al conducto capilar aguas abajo de la cubeta de recepción.

Adicionalmente, en otra realización preferida de la invención, el dispositivo comprende además un segundo conducto capilar que se bifurca del conducto capilar aguas abajo de la cubeta de recepción, donde un elemento de desvío de muestras estudiadas ubicado en la bifurcación está configurado para hacer pasar cada muestra estudiada individual selectivamente al conducto capilar de muestras estudiadas o al segundo conducto capilar. Este elemento de desvío puede configurarse de diferentes modos, aunque preferentemente comprende una compuerta accionable selectivamente para, bien abrir el paso a través del conducto capilar a la vez que cierra el paso a través del segundo conducto capilar, o bien para para cerrar el paso a través del conducto capilar a la vez que abre el paso a través del segundo conducto capilar.

Esta configuración permite realizar una clasificación de las muestras estudiadas en función de un cierto resultado obtenido por la medida realizada mediante el microscopio. Un medio de procesamiento conectado al microscopio y al elemento de desvío puede enviar a dicho

elemento de desvío señales de control para que cada muestra se envíe bien al conducto capilar, o bien al segundo conducto capilar. El segundo conducto capilar puede estar conectado a un segundo depósito de muestras estudiadas.

- 5 Por último, otra realización preferida de la invención está dirigida a un microscopio de haz láser plano que comprende un dispositivo como el descrito en los párrafos anteriores.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 10 Las Fig. 1 muestra una vista esquemática de un microscopio de haz láser plano convencional.

La Fig. 2 muestra una vista esquemática de un ejemplo de dispositivo de carga múltiple de acuerdo con la presente invención.

15

La Fig. 3 muestra una vista esquemática de otro ejemplo de dispositivo de carga múltiple de acuerdo con la presente invención.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

20

A continuación se describe con mayor detalle el dispositivo (1) de carga múltiple de acuerdo con la presente invención haciendo referencia específica a la Fig. 2. Se aprecia que el dispositivo (1) comprende un conducto (2) capilar que atraviesa según una dirección vertical rectilínea la cubeta (102) de recepción de muestras de un microscopio (100), por ejemplo del microscopio de haz láser plano convencional de la Fig. 1 o bien de un microscopio de haz láser plano del tipo descrito en la solicitud de patente PCT/ES2015/070455. En este ejemplo, el tramo de conducto (2) capilar que atraviesa la cubeta (102) está hecho de vidrio, estando por tanto la cubeta (102) rellena de un líquido con un índice de refracción similar al del vidrio, en este caso aceite de silicona. Se utilizan unas juntas herméticas (no mostradas en la figura) para sellar la entrada y, sobre todo, la salida a través del fondo del conducto (2) en la cubeta (102) con el propósito de evitar cualquier fuga de líquido.

30

Un extremo del conducto (2) situado aguas arriba de la cubeta (102) está conectado a un receptáculo (4) de muestras que almacena las muestras que se van a estudiar inmersas en un fluido que permita hacerlas pasar a través del conducto (2). El fluido en este ejemplo es también aceite de silicona. Otro extremo del conducto (2) situado aguas abajo de la cubeta

35

(102) está conectado a un depósito (5) donde se van descargando las muestras ya estudiadas. Para conseguir un flujo controlable de muestras a través del tubo (2) capilar, una bomba (3) de vacío regulable está conectada al extremo del conducto (2) capilar situado aguas abajo de la cubeta (102).

5

En este ejemplo el dispositivo (9) comprende además un segundo conducto (6) que se bifurca del tramo de conducto (2) capilar aguas abajo de la cubeta (102) y que termina en un segundo depósito (7) destinado a almacenar, por ejemplo, las muestras que cumplan con un determinado criterio obtenible a través del estudio con el microscopio (100) de haz láser plano. En la bifurcación, se dispone un elemento (8) de desvío configurado para seleccionar si el tramo de conducto (2) a la salida de la cubeta (102) se conecta al resto del conducto (2) que desemboca en el depósito (5), o bien si se conecta al segundo conducto (6) que termina en el segundo depósito (6). Un medio (9) de procesamiento conectado al microscopio (100) y al elemento (8) de desvío puede proporcionar las órdenes de funcionamiento pertinentes al elemento (8) de desvío en función de la información obtenida mediante el microscopio (100). Nótese que este medio (9) de procesamiento hace referencia a un bloque funcional, y que por tanto podría implementarse integrado en el procesador del propio microscopio (100), o bien como un elemento físicamente independiente del microscopio (100).

La Fig. 3 muestra un segundo ejemplo de dispositivo (1) donde el tramo de conducto (2) que atraviesa la cubeta (102) tiene forma de U con las respectivas entrada y salida de la cubeta según una dirección vertical ubicada en el lado superior de dicha cubeta. Como se ha comentado previamente, con esta configuración se pueden usar cubetas convencionales sin necesidad de abrir conductos en la parte inferior.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo (1) de carga múltiple para microscopio de haz láser plano, donde el
microscopio (100) de haz láser plano comprende una cubeta (102) de recepción de las
muestras en estudio que está rellena de un líquido, una cámara acoplada a un objetivo (109)
de alta apertura numérica y orientada hacia la cubeta (102) según una dirección de
detección (DD), y un medio de iluminación (103, 104, 105) capaz de emitir una lámina
10 delgada de luz (106) hacia la cubeta (102) según una dirección de iluminación (DI)
perpendicular a la dirección de detección (DD), caracterizado por que además comprende:
un conducto (2) capilar que atraviesa la zona de medida de la cubeta (102) de
recepción, teniendo dicho conducto (2) capilar un diámetro tal que sólo permite el paso de
las muestras de una en una; y
- 15 un elemento (3) de generación de flujo regulable conectado al conducto (2) capilar,
que está configurado para provocar un flujo continuo y controlable de muestras inmersas en
un medio fluido a través de dicho conducto (2) capilar.
2. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tramo de conducto (2) capilar
20 que atraviesa la cubeta (102) de recepción está dispuesto según una dirección
esencialmente rectilínea vertical, de modo que entra en la cubeta (102) verticalmente por su
lado superior y sale verticalmente por su lado inferior.
3. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tramo de conducto (2) capilar
25 que atraviesa la cubeta (102) de recepción está dispuesto según una dirección
esencialmente en U que entra y sale de la cubeta (102) verticalmente por su lado superior.
4. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el
elemento (3) de generación de flujo regulable se elige entre una bomba de impulsión
30 conectada aguas arriba de la cubeta (102) de recepción de muestras y una bomba de vacío
conectada aguas abajo de la cubeta (102) de recepción de muestras.
5. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 4, donde el elemento (3) de generación
de flujo regulable es una bomba peristáltica.
- 35 6. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además

comprende un depósito (4) de muestras a estudiar conectado al conducto (2) capilar aguas arriba de la cubeta (102) de recepción.

5 7. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un depósito (5) de muestras estudiadas conectado al conducto (2) capilar aguas abajo de la cubeta (102) de recepción.

10 8. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un segundo conducto (6) capilar que se bifurca del conducto (2) capilar aguas abajo de la cubeta (102) de recepción, donde un elemento (8) de desvío de muestras estudiadas ubicado en la bifurcación está configurado para hacer pasar cada muestra estudiada individual selectivamente al conducto (2) capilar de muestras estudiadas o al segundo conducto (6) capilar.

15 9. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 8, donde el elemento (8) de desvío de muestras estudiadas comprende una compuerta accionable selectivamente para abrir el paso a través del conducto (2) capilar a la vez que cierra el paso a través del segundo conducto (6) capilar, o bien para cerrar el paso a través del conducto (2) capilar a la vez que abre el paso a través del segundo conducto (6) capilar.

20 10. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde el segundo conducto (6) capilar está conectado a un segundo depósito (7) de muestras estudiadas.

25 11. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el conducto (2) capilar está hecho de polipropileno-etileno fluorado.

30 12. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 11, donde el tramo de conducto (2) capilar que atraviesa la cubeta (102) de recepción está hecho de vidrio.

13. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 12, donde el tramo de conducto (2) capilar que atraviesa la cubeta (102) de recepción está hecho de vidrio de borosilicato.

35 14. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, donde el líquido de la cubeta (102) de recepción de muestras es aceite de silicona.

15. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 14, donde el fluido en el que están inmersas las muestras en estudio es aceite de silicona.
16. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 11, donde el tramo de conducto (2) capilar que atraviesa la cubeta (102) de recepción está hecho de polipropileno-etileno fluorado.
17. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 16, donde el líquido de la cubeta (102) de recepción de muestras es agua salada.
- 10
18. Dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 17, donde el fluido en el que están inmersas las muestras en estudio es agua salada.
19. Microscopio de haz láser plano, caracterizado porque comprende un dispositivo (1) de carga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 15

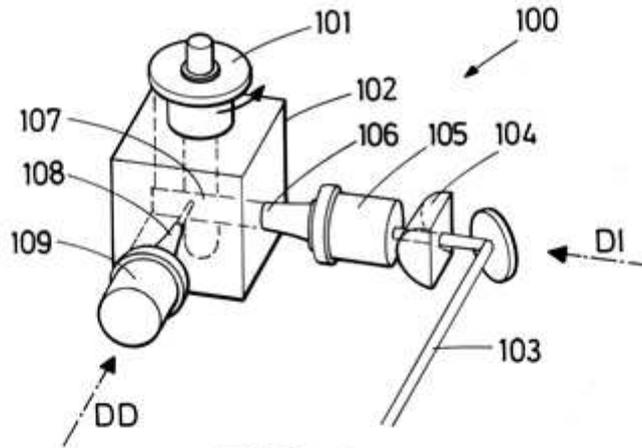


FIG. 1
TÉCNICA ANTERIOR

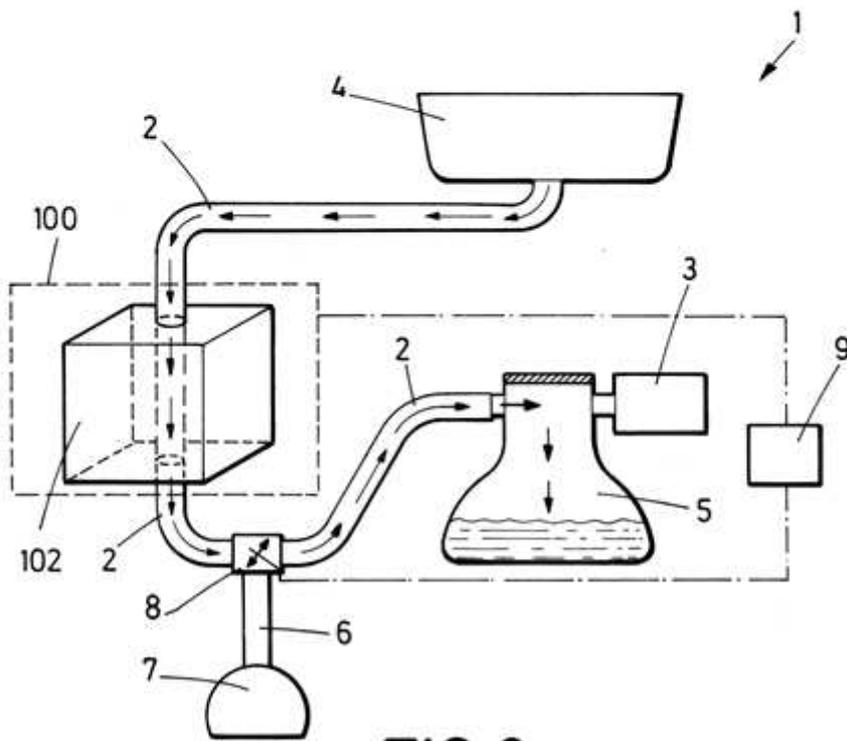


FIG. 2

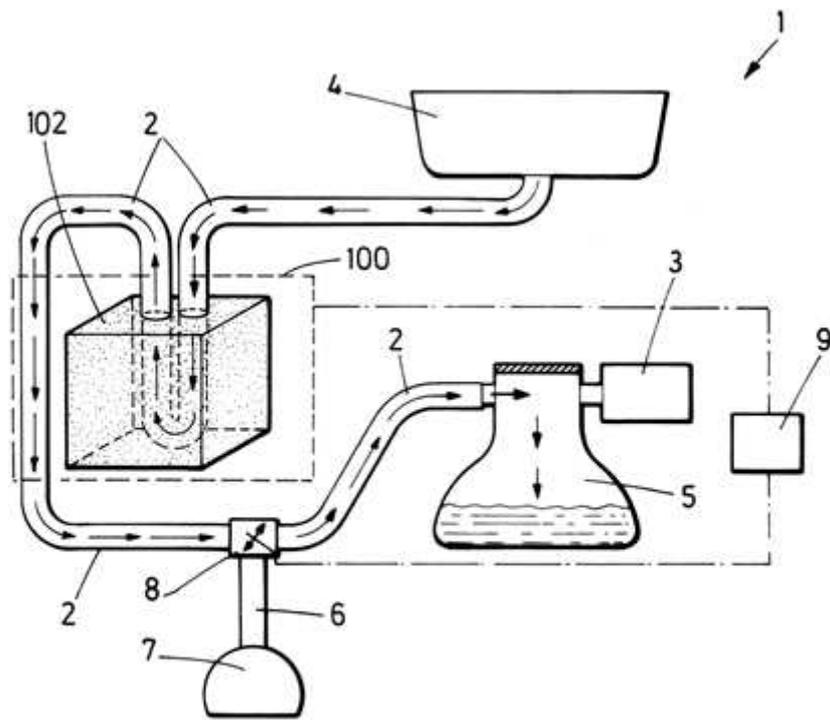


FIG.3