(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 363 406**

(51) Int. Cl.:
C12M 1/34 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08758299 .5**
(96) Fecha de presentación : **27.06.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2173853**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

(54) Título: **Dispositivo, sistema y método para monitorizar y/o cultivar objetos microscópicos.**

(30) Prioridad: **29.06.2007 DK 2007 00952**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **03.08.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **03.08.2011**

(73) Titular/es: **UNISENSE FERTILITECH A/S**
Tueager 1
8200 Aarhus N., DK

(72) Inventor/es: **Ramsing, Niels B.;**
Berntsen, Jørgen;
Gundersen, Jens K. y
Plougsgaard, Holger Søe

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 363 406 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo, sistema y método para monitorizar y/o cultivar objetos microscópicos.

La presente invención se refiere a un dispositivo, a un sistema y a un método para realizar la monitorización y/o el cultivo de objetos microscópicos. Objetos microscópicos son en particular organismos microscópicos como bacterias y cultivos celulares, tales como objetos de cultivo como muestras de tejido y embriones, proporcionando condiciones de cultivo óptimas y seguras para la incubación durante el desarrollo embrionario y para facilitar la selección de embriones óptimos que van a usarse en fecundación *in vitro* (FIV) facilitando el manejo de los embriones para obtención de imágenes digitales automatizada y microscopía a intervalos regulares.

Antecedentes

La colocación manual de pequeños objetos para microscopía requiere mucho tiempo. Encontrar un objeto, situarlo de manera central en el campo de visión y enfocar las características de interés representa una parte significativa de la carga de trabajo asociada con la microscopía clínica. Un caso particular de interés es la microscopía de ovocitos y embriones como parte de un tratamiento de FIV convencional en el que el manejo de los embriones fuera del entorno de incubador seguro con temperatura, atmósfera y pH definidos es un factor de estrés significativo que debe minimizarse. Se conocen sistemas automatizados, que pueden recolocar objetos eficazmente buscando coordenadas X-Y-Z predefinidas en las que se considera que ha de colocarse el objeto de interés. Sin embargo, la tarea inicial de obtener las coordenadas correctas para un objeto dado requiere mucho tiempo. Si el movimiento del objeto y la adquisición de imágenes están automatizados, implica habitualmente adquirir imágenes consecutivas en un patrón de rejilla y unirlas entre sí en un collage para permitir la búsqueda de algoritmos o que el operario humano encuentre el objeto de interés. Alternativamente, implica la ayuda de un operario para ubicar el objeto manualmente y registrar las coordenadas.

Aunque generalmente es posible colocar objetos más grandes en puntos predefinidos en los que permanecen estacionarios, esto se hace cada vez más difícil con objetos de tamaños microscópicos en un medio líquido. Un ejemplo de particular interés son los embriones humanos tempranos, que tienen sólo aproximadamente 1/8 mm de diámetro (aproximadamente 120 μm) con una densidad ligeramente superior que la de su medio de crecimiento. La colocación precisa de embriones en gotitas de medio es difícil, y el manejo altera fácilmente su posición.

La colocación exacta de un objeto microscópico es de interés general en muchas aplicaciones. Sin embargo, cuando se usan técnicas de transferencia de embriones (TE), tales como FIV (fecundación *in vitro*) y técnicas relacionadas, esto implica el cultivo *in vitro* del embrión en desarrollo durante un periodo de días antes de la reimplantación de los embriones seleccionados. Incluso con las condiciones de crecimiento ideales, se necesitan criterios de selección como herramienta para elegir los embriones más viables para la reimplantación. La viabilidad de un embrión en un parámetro importante con el fin de determinar la idoneidad de los embriones para la transferencia. A nivel práctico, la colocación precisa para microscopía es un requisito previo para evaluar la viabilidad del embrión tras su manipulación. En la práctica, la evaluación del embrión se limita a una clasificación más o menos subjetiva basada en criterios morfológicos. Se ha comprobado que la frecuencia respiratoria del embrión es un buen candidato como indicador de viabilidad objetivo. Por tanto, existe la necesidad de un método, sistema y dispositivo rápidos, sencillos y sin producir alteraciones para permitir la evaluación morfológica y/o posiblemente la medición de frecuencias respiratorias de embriones individuales como medida para la viabilidad de los embriones.

El documento WO 01 02539 describe un enfoque de pocillo dentro de pocillo (WOW) para proporcionar cultivos de células individuales en portaobjetos de microscopio, estableciéndose que una ventaja del mismo es proporcionar un pocillo de volumen pequeño dentro de un pocillo de volumen más grande para permitir un mejor entorno de cultivo para cada embrión individual.

Sin embargo, se ha comprobado que el manejo manual y/o automático del portaobjetos de microscopio que comprende dicho WOW requiere mucho tiempo y es difícil, porque en la práctica se ha comprobado que es difícil insertar un embrión u otro cultivo celular en el pocillo de volumen más pequeño. Además, si se quiere proporcionar más de un WOW sobre un portaobjetos puede haber un riesgo de contaminación de un WOW a otro WOW, lo que puede ser perjudicial para el crecimiento celular. Un problema en particular es que si un cultivo celular experimenta lisis u otros problemas de desarrollo, una contaminación o diseminación del lisado celular de un pocillo a otro puede propagar tal problema.

Otro problema con portaobjetos de microscopio conocidos, que comprenden por ejemplo al menos un WOW, para fines de cultivo, es cómo mantener un entorno estable para desarrollar dichos cultivos celulares vivos, es decir, mantener una temperatura predeterminada relativamente estable, una composición de gases estable, una cantidad suficiente de medio de cultivo, la humedad requerida y reducir el riesgo de contaminación de los alrededores, y otras influencias del entorno. Además, aunque puede proporcionarse una colocación más precisa de objetos individuales usando dispositivos de WOW debido al hecho de que puede lograrse dentro de dicho portaobjetos una fijación de coordenada relativamente determinada tanto en la dirección x, y como z; en vista de los problemas de manipulación establecidos anteriormente, el uso de un dispositivo de WOW puede reducir el tiempo de manejo, pero no de manera significativa, y no puede proteger frente a la contaminación mutua y externa.

Cuando se aplica a la evaluación de la viabilidad de los embriones, el método, dispositivo y sistema de microscopía según el sistema debe proporcionar los siguientes elementos clave tal como se explica resumidamente por Overström 1996 (véase In vitro assessment of embryo viability. Theriogenology 45:3-16 1996): 1) La capacidad de realizar mediciones objetivas simultáneas de múltiples embriones individuales, 2) la sensibilidad y resolución para medir embriones/ovocitos individuales, 3) evaluación rápida, es decir, ~30 min. o menos, 4) la prueba de viabilidad no debe ser perjudicial e idealmente no invasiva, 5) técnicamente sencilla y cómoda para el usuario, 6) coste reducido en la adquisición y manejo.

Con los antecedentes anteriores, un fin de la presente invención es proporcionar un método, un dispositivo y un sistema del tipo mencionado inicialmente, que reduce las desventajas mencionadas anteriormente de los métodos, dispositivos y sistemas conocidos.

Resumen de la invención

El fin de la presente invención es cultivar organismos microscópicos, proporcionar condiciones de vida adecuadas, estables durante la incubación y adicionalmente facilitar el manejo, la observación y el mantenimiento. La presente invención facilita en gran medida situar de objetos microscópicos en puntos definidos que pueden inspeccionarse, manipularse y/o de los que pueden obtenerse imágenes automáticamente de manera rutinaria.

El fin mencionado anteriormente se logra con un método, un dispositivo y/o un sistema según los diversos aspectos de la invención tal como se describe en el presente documento.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un dispositivo para monitorizar y/o cultivar al menos dos objetos microscópicos y medios de objeto, que comprende

- un portaobjetos que comprende al menos dos depresiones en una superficie superior del mismo;

- en el que cada depresión comprende una muesca de una sección transversal más pequeña que la depresión para contener cada objeto microscópico respectivo y medios de objeto,

- estando dotado dicho portaobjetos de un depósito para proporcionar una capa de recubrimiento común (7) entre dichas depresiones de tal manera que dichos medios no están en comunicación de fluido mutua.

En una realización adicional de la invención al menos dicha depresión y/o dichas muescas presentan un perfil de superficie inferior correspondiente a los contornos de las mismas sobre dicho portaobjetos; estando adaptada la topografía del perfil para coincidir con una topografía correspondiente de un soporte de portaobjetos.

Aún en una realización adicional de la invención al menos una parte de dicho dispositivo está dotado de un saliente de manejo.

En una realización adicional de la invención dicho portaobjetos comprende medios para identificar de manera única cada depresión.

Proporcionar una muesca dentro de una depresión colocará automáticamente el objeto microscópico en un punto predefinido dejando que se deslice por una pendiente hasta depositarse en la muesca pequeña, por ejemplo con un fondo plano, que es adecuado para microscopía. La muesca garantiza que el manejo posterior no altere la posición del objeto dentro del portaobjetos de microscopía. Por consiguiente, se logra la colocación automática dirigida por densidad de objetos microscópicos, ya que se proporcionan organismos vivos en una muesca central dentro de la depresión. La muesca central constituye un depósito que puede detectarse fácilmente, por ejemplo mediante algoritmos de análisis de imágenes automatizados, de modo que puede realizarse microscopía automatizada autónoma del objeto dentro del depósito. Preferiblemente, los lados del pocillo que conducen al depósito están inclinados con el fin de mejorar la probabilidad de encontrar el objeto en el interior de la muesca de tamaño más pequeño dentro de la depresión de tamaño mucho más grande.

Proporcionar más de una muesca sobre un portaobjetos reduce el tiempo de manejo porque pueden realizarse observaciones o tomarse imágenes sin tener que retirar el portaobjetos e insertar uno nuevo para cada nuevo objeto que va a observarse.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un sistema dispuesto para realizar la monitorización y/o el cultivo de al menos dos objetos microscópicos que comprende un dispositivo para manejar al menos dos objetos microscópicos y medios de objeto, comprendiendo dicho dispositivo un portaobjetos que comprende al menos dos depresiones en una superficie superior del mismo; comprendiendo cada depresión una muesca de una sección transversal más pequeña que la depresión para contener cada objeto microscópico respectivo y medios de objeto, en el que al menos dichas muescas presentan un perfil de superficie inferior correspondiente a los contornos de las mismas sobre dicho portaobjetos; en el que dicho sistema está dotado además de medios de colocación que comprenden un soporte de portaobjetos, que está adaptado para coincidir con dicho perfil de superficie inferior al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para manejar un dispositivo tal como se definió

anteriormente, que comprende la etapa de colocar dicho dispositivo dentro de un sistema tal como se definió anteriormente haciendo coincidir dicho perfil de superficie inferior de dicho dispositivo al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas con medios de colocación correspondientes que comprenden un soporte de portaobjetos de dicho sistema.

Dicha muesca, dispositivo, sistema y método descritos son en particular adecuados para realizar pruebas de sensor de la frecuencia respiratoria de oxígeno de embriones usando cualquier tipo de método, sistema y dispositivo capilar de vidrio disponibles.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá en más detalle con referencia a algunas realizaciones ilustradas en los dibujos esquemáticos que no están a escala, en los que números similares indican las mismas características, en los que:

la figura 1 A, 1 B	es una vista lateral de una depresión que contiene una muesca para un dispositivo según una realización de la invención para cultivar y/o monitorizar embriones, y una vista en detalle de la muesca que comprende dicho embrión en un dispositivo de la figura 1;
la figura 2	en una vista en corte lateral de un detalle de un dispositivo según una primera realización de la presente invención adecuado para la incubación y el examen de embriones;
las figuras 3A a 3D	es una vista en corte lateral de un detalle de un dispositivo según una segunda realización adecuado para la incubación y el examen de embriones;
la figura 4	es una vista en corte lateral de un detalle de un dispositivo según una tercera realización de la presente invención;
la figura 5	es un dibujo técnico de un dispositivo de la figura 4, que comprende además un saliente de manejo;
la figura 6	es una vista en corte en perspectiva a lo largo de la sección A-A mostrada en la figura 5;
la figura 7	es una imagen en perspectiva de un dispositivo de las figuras 4, 5 y 6, fabricado con un material de polímero transparente;
la figura 8	es una imagen en perspectiva de un dispositivo de las figuras 4, 5 y 6, que comprende además una capa termoconductora en aluminio proporcionada en parte del perfil de superficie inferior, es decir, los contornos inversos de las depresiones, muescas y depósito proporcionados en el mismo;
la figura 9	es una imagen de una fuente de calor adecuada para actuar conjuntamente con un sistema según una primera realización de la invención;
la figura 10	es una imagen de un sistema según una primera realización de la invención; y
la figura 11A, 11B	son imágenes en vista desde arriba de un dispositivo según la invención que comprende además la identificación ID de muescas individuales en una depresión y/o muesca, para una depresión y para seis depresiones, respectivamente.
Figura 12	Número de ID de pocillo con micronúmeros que pueden observarse fácilmente durante el manejo en un microscopio de disección. El número “5” tiene aproximadamente 1 mm de alto y 0,4 mm de ancho.

Descripción detallada de realizaciones

En la figura 1A se muestra una vista en corte lateral de un portaobjetos o dispositivo en una depresión que contiene una muesca para un dispositivo según una realización de la presente invención, y en la figura 1B se muestra una vista en detalle de la muesca de la figura 1A que contiene un objeto microscópico, por ejemplo un embrión. Las depresiones y el dispositivo son en particular adecuados para la colocación basada en densidad de embriones para la monitorización y/o el cultivo en un cultivo de embriones y/o portaobjetos de microscopio.

Dicho objeto microscópico pueden ser organismos microscópicos, tales como cultivos celulares en crecimiento, y dicho dispositivo es en particular adecuado para manejar, obtener imágenes de microscopio y/o cultivar embriones en desarrollo. Dicho objeto microscópico puede ser parte de un objeto de tamaño más grande o más pequeño, por ejemplo, más pequeño o más grande que el diámetro de la muesca. La expresión “objeto microscópico” se define como un objeto cuya dimensión más grande es inferior a 2 mm, preferiblemente inferior a 1 mm, preferiblemente inferior a 500 μm, lo más preferiblemente inferior a 200 μm.

Un embrión 1 es aproximadamente esférico y está compuesto de una o más células (blastómeros) rodeadas por una envuelta similar a gelatina, una matriz acelular conocida como zona pelúcida. La zona pelúcida realiza una variedad de funciones hasta que el embrión eclosiona, y es un buen punto de referencia para la evaluación del embrión. La zona es esférica y translúcida, y debe poder distinguirse claramente de los residuos celulares.

Un embrión se forma cuando un ovocito se fecunda mediante fusión o inyección de una célula de esperma o espermatozoide. El término se usa tradicionalmente también tras la eclosión, que comprende la ruptura de la zona pelúcida y la consiguiente implantación. Para los seres humanos, el ovocito fecundado se denomina tradicionalmente embrión durante las primeras ocho semanas. Después de eso, es decir, tras ocho semanas y cuando todos los órganos principales se han formado, se denomina feto. Sin embargo, la distinción entre embrión y feto no está generalmente bien definida.

La superficie del portaobjetos o dispositivo está dotada de al menos una depresión llena de medio 3 en la superficie superior de dicho dispositivo, siendo preferiblemente dicha depresión cilíndrica, tal como una depresión que tiene un diámetro de aproximadamente 4,0 mm, que puede variar desde 1 hasta 25 mm dependiendo de la aplicación. Puede depositarse fácilmente un embrión en la depresión usando una pipeta de FIV convencional porque el diámetro de la depresión en mucho más grande que el objeto de interés. Las otras dimensiones de la depresión, tales como la altura y la forma de sección vertical y horizontal se seleccionan de manera que el objeto microscópico pueda insertarse fácilmente en la depresión. El embrión desciende lentamente hasta el fondo de la depresión garantizando que la densidad del medio de crecimiento circundante es ligeramente inferior que la densidad del embrión, y proporcionando paredes relativamente lisas de dicha depresión 3.

Se proporciona un embudo o parte inferior lisa sustancialmente cónica 31 de la depresión, alternativamente dicho embudo puede proporcionarse con una sección vertical en pirámide, ranura, cuña, trapezoide o cualquier otra forma adecuada, que tiene ángulos de aproximadamente 5 a 60 grados, generalmente de 30 grados en relación con la vertical tal como se muestra en la figura 1A. Por consiguiente, el embrión, mediante la fuerza gravitacional y/o la centrifugación aplicada, rodará al interior de una muesca 4 en el centro de la depresión 3 y/o embudo 31, cuando ha alcanzado una parte inferior de la depresión, es decir, por encima o dentro de dicho embudo 31. El proceso de carga no asistido lleva unos cuantos minutos cuando el medio tiene una viscosidad relativamente alta. La muesca pequeña garantiza que el embrión mantenga su posición a pesar de los movimientos de manejo.

Un embudo puede facilitar y guiar el objeto de interés desde la depresión hasta la muesca. El embudo está situado habitualmente en la parte inferior de la depresión para capturar y colocar objetos con una densidad superior a la del medio circundante. Preferiblemente, el embudo con una superficie sustancialmente lisa puede tener ángulos de aproximadamente 5 a 60 grados, preferiblemente entre 10 y 45 grados, más preferiblemente de 15 a 35 grados, lo más preferiblemente de 25 a 30 grados en relación con la horizontal.

Las dimensiones de la muesca 4 se seleccionan a menudo para que sean relativamente pequeñas en comparación con el diámetro de la depresión, y con el tamaño del objeto, aproximadamente de 1,1 x a 10x el diámetro del objeto, preferiblemente de 1,5x a 3x el diámetro del objeto, de modo que la posición del objeto está bien definida en relación con el propio portaobjetos. Por tanto, pueden adquirirse fácilmente imágenes de alta resolución y monitorización de todo el volumen de la muesca si se conoce la posición del portaobjetos en relación con dicho microscopio. La muesca está dotada preferiblemente de una superficie inferior sustancialmente plana 40 con el fin de facilitar la monitorización y/o el cultivo de dicho embrión mediante microscopía o similar.

La altura óptima de la muesca 4 se determina por la necesidad de mantener colocado el embrión 1 a pesar de los movimientos de manejo. Una muesca más profunda con paredes más altas protegerá al embrión frente al movimiento masivo del medio de crecimiento que lo recubre. Sin embargo, puede suprimirse la transferencia del embrión a la paciente receptora tras el final del periodo de observación. Por tanto, una muesca menos profunda favorecerá una supresión fácil del embrión. Un compromiso práctico razonable parece ser una muesca con una profundidad sustancialmente similar a su anchura, es decir, de 0,5x a 10x el diámetro del embrión. Tal como se muestra en la figura 1B, puede seleccionarse una profundidad de 0,3 mm y un diámetro de 0,2 mm. Las paredes de la muesca para embriones son en gran parte verticales, pero pueden estar ligeramente inclinadas con el fin de ensanchar la apertura de la muesca y facilitar la supresión del embrión, por ejemplo de desde 5 hasta 20 grados tal como se muestra en la figura 1B. La muesca puede tener alternativamente forma cilíndrica, de caja, cónica, truncada o de cono o similar, cualquier forma adecuada para contener el objeto microscópico, impedir desplazamientos accidentales por el manejo e influencias del entorno, y el flujo en masa inducido del medio. Cuando más pequeñas sean las dimensiones de la muesca, mejor se define la posición del objeto microscópico. Sin embargo, con muescas muy pequeñas puede ser difícil suprimir el objeto microscópico de la muesca al final del periodo de observación.

En una realización, las dimensiones de una muesca tienen sustancialmente igual diámetro y profundidad. Además, dichas muescas se proporcionan preferiblemente de manera sustancialmente central dentro de su depresión respectiva.

Las dimensiones del portaobjetos son preferiblemente tales como para ajustarse dentro de un sistema de cultivo y/o sistema de microscopio especialmente adaptado y/o convencional, tales como 25 x 76 mm.

El corte en sección vertical de una depresión y/o muesca puede tener la forma de cualquiera del grupo que tiene una forma cilíndrica, de sección transversal decreciente, de cono, de ranura, piramidal, de trapezoide, de parte de un círculo o sustancialmente circular. El corte en sección horizontal de una depresión y/o muesca puede tener la forma de cualquiera del grupo que tiene una forma circular, elíptica, rectangular, de arlequín o hexagonal.

En figura 2 se muestra un dispositivo según una primera realización de la presente invención. Dicho dispositivo comprende un portaobjetos de microscopio 2 que comprende una serie, es decir, al menos dos de dichas depresiones 3a, 3b en una superficie superior 2A del material del portaobjetos. Cada depresión 3a, 3b comprende una muesca 4a, 4b de una sección transversal más pequeña que la depresión para alojar y contener cada objeto microscópico respectivo 1a, 1b y medios de objeto 5a, 5b, siendo cada muesca y/o depresión por ejemplo de dimensiones y/o forma según lo anterior. Dos objetos microscópicos, es decir, embriones 1a, 1b se han insertado en el portaobjetos de microscopio 2, es decir, uno en cada una de las muescas 4a y 4b, respectivamente. Dichos medios de objeto 5a, 5b pueden ser cualquier medio adecuado para rodear, contener y proteger dichos objetos microscópicos, tales como un medio de crecimiento celular para tal embrión. Dicho medio 5a puede ser diferente de o el mismo que dicho otro medio 5b, dependiendo de la aplicación del dispositivo.

Tal como se muestra en las figuras 2 y 3, dicho portaobjetos 3a, 3b está dotado de un depósito 6A, 6B para proporcionar una capa de recubrimiento común 7 entre dichas depresiones 3a, 3b de tal manera que cuando se proporciona un medio de objeto 5a, 5b en el interior de dichas depresiones y/o muescas, el medio 5a no está en comunicación de fluido mutua con el medio 5b. Por tanto, se reduce el riesgo durante el manejo de dicho dispositivo de derramar los medios de objeto 5a, 5b entre las diferentes depresiones y/o muescas, lo que reduce de nuevo la introducción de efectos adversos entre dichos objetos microscópicos 1a, 1b, por ejemplo cuando los objetos son embriones y el dispositivo es una placa de cultivo, y uno de dichos embriones se lisa. Además, el movimiento del dispositivo puede inducir movimiento en masa menor en la capa de recubrimiento, pero un movimiento significativamente reducido dentro de dichos medios de objeto, reduciendo el movimiento del embrión a lo largo del tiempo, lo que es en particular una ventaja durante la microscopía y/o el cultivo de dichos objetos. Además, proporcionando una capa de recubrimiento sobre dicho medio de objeto, dicho medio de objeto se protege mejor frente a influencias perjudiciales del entorno, tales como variaciones de presión, humedad y/o temperatura, y el riesgo de contaminación del objeto y medios de objeto se reduce adicionalmente.

Tal como se muestra en la figura 2, dicho depósito se proporciona como un rebaje común 6B dentro de dicha superficie superior 2A, lo que permite la formación de un depósito común de una capa de recubrimiento o capa superior, por ejemplo de un aceite de inmersión. Alternativamente o como complemento, tal como se muestra en la figura 3, que muestra una segunda realización de dicho dispositivo, dicho depósito es una conexión de fluidos 6B, por ejemplo un canal o tubo, abierto o cerrado, respectivamente, a la superficie externa, entre dichas al menos dos depresiones 3a, 3b. Por consiguiente, la altura total del portaobjetos para permitir el alojamiento de las depresiones y muescas puede reducirse.

Dicho portaobjetos 2 está dotado de un depósito 6 para proporcionar una capa de recubrimiento común 7 entre dichas depresiones 3a, 3b de tal manera que dichos medios 5a, 5b no están en comunicación de fluido mutua.

Además, un depósito de fluido de inmersión compartido, es decir, un depósito común, proporciona por tanto un fácil manejo e incubación sin necesidad de control de humedad complementario del medio de crecimiento. Además, el depósito de fluido de inmersión profundo o de tamaño relativamente grande separa los medios en muescas y/o depresiones individuales y reduce el riesgo de contaminación de partículas, gases en el aire circundante, etc.

Cada portaobjetos de microscopio contiene una serie de muescas que contienen cada una un único objeto microscópico, por ejemplo cada muesca contiene un embrión de la misma paciente o pacientes diferentes. Proporcionando medios para separar los medios de tal manera que el medio en cada depresión se mantiene sin comunicación mutua, se reduce el riesgo de derrame del medio de una depresión y/o muesca a otra. Además, en particular, proporcionando compartimentos de medios individuales para cada objeto, por ejemplo embriones, se puede impedir la contaminación o los efectos adversos, por ejemplo si uno de los embriones o cultivos celulares en una muesca cercana se lisa. Ya que cada organismo está situado en una muesca diferente que contiene medios que están separados por ejemplo por una capa de recubrimiento de aceite de inmersión, es altamente improbable que los compuestos adversos puedan difundir a través del aceite hidrófobo hasta las muescas vecinas.

Cada una de dichas depresiones/muescas se llena preferiblemente con medios de objeto de tal manera que el nivel en la superficie superior de dichos medios 5a, 5b no se proporciona por encima del nivel de la transición desde dicha depresión hasta dicho depósito 6, véanse las figuras 2 y 3. Dichos medios pueden ser cualquier material adecuado, tales como medios de crecimiento de embriones, otros medios de cultivo celular y similares, medios líquidos, flexibles, semirrígidos o rígidos. Se conocen en la técnica diferentes medios para cultivar una población celular. Un ejemplo de cultivo de un embrión se describe en la solicitud PCT n.º 2004/056265.

Además, la capa de recubrimiento de un medio de inmersión tal como un aceite adecuado que tiene viscosidades variables, tal como un medio líquido, flexible, semirrígido o rígido, puede proporcionarse cubriendo al menos el diámetro superior de cada muesca o depresión que contiene un objeto microscópico que va a cultivarse y/u observarse mediante microscopía.

Dichos medios de objeto y/o capa de recubrimiento pueden proporcionarse en un material cuya viscosidad y/o transparencia y/o densidad varían con la temperatura, por ejemplo cuando se calienta hasta una temperatura de cultivo, dicho medio y/o capa es transparente y/o al menos dicha capa es de una viscosidad superior a la de dicho medio, y/o dicho medio es de una densidad superior a la de dicha capa.

Tal como se muestra en la figura 4, proporcionar dichas muescas 4a, 4b y/o dichas depresiones 1a, 1b y proporcionar un espesor de material de portaobjetos relativamente uniforme global, véanse las figuras 4 y 6, da como resultado el hecho de que la superficie inferior 2B del portaobjetos presenta un perfil de superficie inferior 20 correspondiente a los contornos de al menos dichas muescas y/o depresiones sobre dicho portaobjetos 2. Esto es una ventaja cuando el dispositivo se inserta en un soporte de portaobjetos que tiene un contorno de superficie superior correspondiente en relación con dicho perfil de superficie inferior 20 tal como puede proporcionarse en por ejemplo un sistema de cultivo y/o microscopía, tal como se comentará adicionalmente a continuación, en relación con la figura 10. Uno o más dispositivos según la invención pueden estar dotados de la misma topografía inferior única para actuar conjuntamente con un sistema a gran escala que comprende más de un dispositivo y/o que está adaptado para intercambiar uno o más de dichos dispositivos a lo largo del tiempo.

Por tanto, en una realización, el perfil de superficie inferior no plana del portaobjetos de cultivo coincide con el contorno de un soporte de aluminio opcionalmente calentado que soporta el portaobjetos de modo que las muescas se insertan en depresiones en el soporte de aluminio.

Tal como se muestra en la figura 4, en una realización del dispositivo, al menos parte de dicho perfil 20 está dotado de una capa termoconductora 23a, 23b, que preferiblemente forma parte de al menos de una superficie inferior de dichas muescas. Por tanto, cuando se dispone dicho dispositivo para su conexión con una fuente de calor, puede proporcionarse un entorno termoestático controlado para los embriones y mantenerse a lo largo de periodos de tiempo prolongados, lo que reduce la necesidad de realizar un análisis rápido de dichos embriones y facilita el manejo de los mismos. Dicha capa termoconductora puede ser un metal tal como aluminio o acero.

Preferiblemente, dicha capa termoconductora 23 está adaptada para su conexión a una fuente de calor, por ejemplo tal como puede proporcionarse en un instrumento de microscopía y/o cultivador.

En la figura 4, dicha capa termoconductora 23a y 23b se proporciona sobre el perfil de superficie inferior a lo largo de la superficie inferior sustancialmente plana de las muescas, y garantiza que el embrión esté rodeado por un entorno que proporciona calor. Alternativamente o como complemento, dicha capa 23 se proporciona rodeando el perfil de superficie inferior de las paredes de dicha muesca. El dispositivo comprende un portaobjetos de cultivo desechable con depresiones que contienen los organismos en un medio adecuado.

Alternativamente o como complemento, dicha capa termoconductora 23 proporciona al menos parte de la superficie superior 2A del portaobjetos 2, preferiblemente al menos parte de las superficies internas de las muescas 4a, 4b y/o las depresiones 3a, 3b.

La parte inferior de la muesca y/o dicha capa termoconductora es preferiblemente plana y transparente, por ejemplo proporcionando dicha capa termoconductora 23a, 23b que está dotada de orificios pasantes adecuadamente dispuestos para garantizar una monitorización no obstruida del embrión desde por debajo o por encima usando por ejemplo microscopía convencional o inversa y/o análisis y/o adquisición de imágenes.

Tal como se muestra en la figura 5, una parte de dicho dispositivo está dotada de un saliente de manejo (70), siendo dicha parte una posición adecuada y extendiéndose dentro de dicha superficie superior 2A; alternativamente o como complemento dicha parte es dicha parte inferior 2B. Es posible proporcionar dicho saliente de manejo en una parte lateral de dicho portaobjetos. Un dispositivo en el que al menos parte de dicho saliente de manejo 70 se extiende verticalmente hacia arriba y/o hacia abajo desde dicho portaobjetos. Dicho saliente de manejo 70 puede comprender preferiblemente una aleta, por ejemplo dotada de una extensión o extensiones adicionales que el lado del portaobjetos, en el que dicho saliente de manejo 70 se proporciona en un material termoconductor y/o un material de polímero.

Preferiblemente, dicho saliente de manejo 70 está dispuesto para proporcionar un marcaje de identificación sobre el mismo (no mostrado).

Mediante la disposición de un saliente de manejo, la invención proporciona medios para un fácil manejo e inserción del portaobjetos sin ningún riesgo de contaminación. El saliente de manejo es especialmente importante cuando el portaobjetos está situado en el soporte de portaobjetos. En una realización, debido a los contornos coincidentes del soporte de portaobjetos y la parte inferior del portaobjetos, el portaobjetos debe insertarse verticalmente en el soporte de portaobjetos. Esto es difícil sin un buen agarre sobre el portaobjetos. En una realización preferida, el saliente de manejo no interfiere con una tapa, y tocar el saliente de manejo no constituye un riesgo de contaminación como lo sería manejar el portaobjetos tocando los lados en general.

Tal como se muestra en la figura 6, se proporciona en el dispositivo una serie de depresiones 3a, 3b, en el que dichas depresiones (3a, 3b) están colocadas de manera mutuamente equidistante en al menos una dirección, lo que facilita las mediciones de colocación realizadas sobre las mismas y el manejo durante la monitorización/cultivo.

Tal como se muestra en la figura 7, al menos parte de las superficies internas de dichas muescas 4a, 4b y/o dichas depresiones (3a, 3b) están fabricadas de un polímero, preferiblemente de manera sustancial todo el portaobjetos de microscopio 2 está fabricado de un polímero, pudiendo ser dicho polímero un poliéster, tal como PEN, PETg y/o PET, que tiene una baja embriotoxicidad que puede atribuirse a un alto grado de inmovilización interna de compuestos citotóxicos dentro del polímero.

Tal como se muestra en la figura 7, se proporciona adicionalmente una identificación de muescas individuales 41 en y/o sobre dicha superficie inferior sustancialmente plana de la muesca y/o en y/o sobre dicho perfil de superficie inferior y/o dentro de dicha parte inferior transparente de dicha muesca, que preferiblemente es visible en resolución superior tal como durante la microscopía, en particular microscopía inversa.

La figura 8 es un portaobjetos o dispositivo dotado de un material muy conductor tal como aluminio.

La figura 9 es un montaje de pruebas de laboratorio de un brazo de soporte de portaobjetos de aluminio, adaptado para soportar cuatro portaobjetos o dispositivos separados.

El portaobjetos del dispositivo está preferiblemente adaptado para situarse en un sistema que proporciona un entorno estable para los organismos (temperatura, composición de gases, humedad, etc.) y permite una monitorización autónoma del organismo mediante fotografía, medición del metabolismo, etc.

1) El sistema proporciona preferiblemente

a. Control de la temperatura a través de los contornos coincidentes del soporte de aluminio en el instrumento y el portaobjetos insertado. El organismo que se encuentra en cada pocillo está rodeado por tanto por metal termoconductor y por tanto está en un entorno controlado.

b. El ajuste estrecho entre los contornos coincidentes del portaobjetos y el soporte de portaobjetos garantiza una fácil colocación del portaobjetos con precisión de μm cuando se asienta en el soporte. Es posible por tanto la microscopía no asistida incluso tras la retirada y la reinserción del portaobjetos.

c. La colocación automática del embrión y el portaobjetos es un requisito previo para la adquisición automática de imágenes a intervalos de tiempo.

Tal como se muestra en la figura 10, la invención se refiere además a un sistema dispuesto para realizar microscopía y/o cultivo de al menos dos objetos microscópicos 1a, 1b, comprende un dispositivo según la invención tal como se describió anteriormente y también medios de colocación para soportar dicho dispositivo. Preferiblemente, un microscopio y dichos medios de colocación están dispuestos para colocar el dispositivo bajo el microscopio o en relación con el mismo. Dicho sistema puede comprender además una fuente de calor adecuada para proporcionar temperaturas para cultivar dichos al menos dos objetos microscópicos (1a, 1b) y estando dispuestos dichos medios de colocación para colocar el dispositivo en relación con dicha fuente de calor. Dichos medios de colocación comprenden un soporte de portaobjetos, que preferiblemente está adaptado para hacerse coincidir con dicho perfil de superficie inferior al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas, y puede proporcionarse como un soporte de portaobjetos en un sistema de cultivo y/o monitorización para la monitorización y el análisis manual y/o automático.

El sistema puede estar dotado además de una capa termoconductora adaptada para proporcionar una temperatura estable dada a al menos dichas muescas, temperatura que es adecuada para el cultivo, en particular para la incubación de dichos al menos dos objetos microscópicos.

Dicha fuente de calor puede proporcionarse como un soporte de portaobjetos, que está adaptado para hacerse coincidir con dicho perfil de superficie inferior al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas. Preferiblemente dicho soporte de portaobjetos se proporciona como un brazo termoconductor, preferiblemente fabricado de metal, tal como aluminio, acero o similar.

En otro sistema, el perfil de superficie inferior (23) de dicho dispositivo está dotado de una capa termoconductora que está adaptada para su conexión a dicha fuente de calor.

Dicho microscopio puede comprender además medios de obtención de imágenes, tales como equipo de cámara o vídeo. Los medios de colocación pueden comprender además

- al menos un orificio vertical que se extiende a través del soporte de portaobjetos;

- un emisor de luz, tal como un láser que proporciona una luz vertical;

- un sensor de luz en el lado opuesto del portaobjetos de microscopía (2) en relación con el emisor de luz para detectar la luz emitida, cuando el soporte de portaobjetos está en una posición correcta para la microscopía.

Los medios de colocación pueden comprender además una unidad de control para la colocación automática de dicho dispositivo en relación con dicho microscopio y/o dicha fuente de calor.

La unidad de control puede estar adaptada además para controlar la temperatura de dicha fuente de calor para lograr un entorno de incubador estable, y/o adaptada para monitorizar y/o adquirir imágenes de dichos objetos microscópicos usando dichos medios de obtención de imágenes, y/o analizar dichas imágenes para realizar una evaluación de la calidad de dichos objetos, y/o mantener un registro de portaobjetos de sustitución.

En otra realización, el sistema comprende además medios para realizar mediciones no invasivas de la actividad metabólica que comprenden microsensores, para medir por ejemplo el pH, el contenido en oxígeno y similares.

El sistema comprende preferiblemente medios para soportar más de un dispositivo tal como se describió anteriormente, tales como un soporte de portaobjetos que puede soportar varios dispositivos, tales como 4 ó 6 dispositivos.

El sistema es preferiblemente una combinación de un incubador de gases, tal como un incubador de tres gases, y un microscopio digital para la adquisición de imágenes no asistida. El sistema puede considerarse como un incubador con un microscopio incorporado o como un microscopio con un incubador incorporado.

En una realización preferida el sistema comprende:

1) El brazo de aluminio termoestático diseñado para ajustarse a la topografía inferior única de los portaobjetos de polímero para garantizar que el embrión está rodeado por aluminio termoconductor.

2) Medios que tienen capacidad para realizar mediciones no invasivas de la actividad metabólica usando microsensores. Un ejemplo es medir la respiración de oxígeno usando microelectrodos de oxígeno de concentración de CO2 con microsensores de pH. La colocación precisa de los sensores se garantiza mediante un orificio diminuto en el soporte de portaobjetos, y un láser vertical que ilumina la punta del sensor. El soporte de portaobjetos se mueve horizontalmente hasta que la punta del sensor se ilumina mediante la luz láser que entra a través del orificio, entonces se miden las coordenadas X-Y del soporte de portaobjetos. Entonces se mueve el soporte de portaobjetos hasta que el orificio diminuto se centra en el campo de visión del sistema de cámara y se miden las nuevas coordenadas X-Y. La diferencia en coordenadas entre las dos observaciones es una medida de la desviación entre la cámara y la punta del sensor. La desviación puede usarse entonces para mover objetos visibles centrados en el campo de visión de la cámara hasta la punta del sensor, es decir, usando la desviación es posible mover de manera no asistida objetos de interés desde la posición de adquisición de imágenes hasta la posición de perfil del microsensor.

3) Medios que pueden manejar más de un dispositivo (es decir, organismos/células/embriones de más de un paciente a la vez). La presente invención manejará fácilmente cuatro o cinco portaobjetos diferentes con un total de 48 a 60 organismos.

4) Software de control que monitoriza de manera no asistida los organismos, adquiere y analiza las imágenes y proporciona una evaluación de la calidad de los organismos dentro. El software acepta la adición de nuevas placas y la terminación de otras sin afectar a mediciones en curso.

El software usado puede comprender por ejemplo los métodos descritos en los documentos WO 2007/042044 y WO 2007/144001.

En un sistema automatizado para monitorizar objetos que están colocados en las depresiones del dispositivo, es importante poder colocar el microscopio y adquirir imágenes de los objetos varias veces sin perder la pista de cada objeto, es decir, es importante que cada objeto pueda identificarse de manera única para cada periodo de monitorización y adquisición de imágenes, con el fin de proporcionar información de cualquier cambio en los objetos. Por tanto, aún en una realización adicional, la invención se refiere a un dispositivo para monitorizar y/o cultivar al menos dos objetos microscópicos (1a, 1 b) y medios de objeto (5a, 5b), que comprende - un portaobjetos (2) que comprende al menos dos depresiones (3a, 3b) en una superficie superior (2A) del mismo; en el que dicho portaobjetos comprende medios para identificar de manera única cada depresión. Se prefiere que la identificación única sea legible por máquina, y además se prefiere que la identificación única pueda registrarse automáticamente.

Puesto que se usa un microscopio para obtener imágenes de los objetos, entonces se prefiere que la identificación única sea legible a los aumentos usados para obtener imágenes de los objetos. Por consiguiente, se prefiere que la identificación única para cada depresión sea inferior a 1,5 mm, tal como 1 mm o menos. Incluso de manera más preferida, la identificación única está dispuesta de modo que pueden obtenerse imágenes en el mismo campo de imagen que el objeto microscópico al que se refiere.

Los medios para identificar de manera única cada depresión pueden conseguirse de varias maneras:

- dotando al dispositivo de medios de colocación de modo que o bien puede colocarse en sólo una única posición en relación con el microscopio y la cámara, por ejemplo un rebaje o una parte de saliente que puede encajarse con una parte correspondiente de un soporte de portaobjetos, o bien el medio de colocación comprende marcadores en el portaobjetos, mediante los cuales se determina la posición de cada depresión en relación con dicho marcador,

- proporcionando información de la posición X-Y en el portaobjetos, tal como al menos un marcador para identificar una fila de depresiones y al menos un marcador para identificar una columna de depresiones en dicho portaobjetos

- proporcionando marcadores de identificación individuales en relación con cada depresión, tal como una identificación de muescas individuales (41) en y/o sobre dicha superficie inferior sustancialmente plana de la muesca y/o en y/o sobre dicho perfil de superficie inferior y/o dentro de dicha parte inferior transparente de dicha muesca.

Tal como se muestra en las figuras 11A y 11B, que muestran imágenes laterales desde arriba de partes de un portaobjetos o dispositivo según la invención, puede proporcionarse una identificación de muescas individuales 41, en forma de letras, símbolos o números impresos, moldeados o cortados en y/o sobre dicha superficie inferior sustancialmente plana de la muesca y/o en y/o sobre dicho perfil de superficie inferior y/o dentro de dicha parte inferior transparente de dicha muesca y/o dicha depresión.

Selección o identificación de embriones. La presente invención permite además una aplicación para seleccionar un embrión para trasplante. El método implica que el embrión se ha monitorizado con el método para determinar un cambio en el embrión tal como se describió anteriormente con el fin de determinar cuándo se han producido las divisiones celulares y opcionalmente si se ha producido muerte celular así como la calidad de las divisiones celulares y la calidad global del embrión. Se prefiere seleccionar un embrión que tiene divisiones celulares sustancialmente síncronas que dan lugar a extremos bruscos en las imágenes de diferencias, y se prefiere más seleccionar un embrión que no tiene muerte celular.

El método de selección o identificación puede combinarse con otras mediciones tal como se describió anteriormente con el fin de evaluar la calidad del embrión. Los criterios importantes en una evaluación morfológica de los embriones son: (1) forma del embrión incluyendo el número de blastómeros y el grado de fragmentación; (2) presencia y calidad de una zona pelúcida; (3) tamaño; (4) color y textura; (5) conocimiento de la edad del embrión en relación con su fase de desarrollo y (6) integridad de la membrana de los blastómeros.

Las dimensiones de cada depresión (3a, 3b) y/o muesca (4a, 4b) pueden adaptarse a la aplicación seleccionada.

En una realización, el sistema dispuesto para realizar la microscopía y/o el cultivo de al menos dos objetos microscópicos comprende un dispositivo para manejar al menos dos objetos microscópicos y medios de objeto, comprendiendo dicho dispositivo un portaobjetos de microscopio que comprende al menos dos depresiones en una superficie superior del mismo; comprendiendo cada depresión una muesca de una sección transversal más pequeña que la depresión para contener cada objeto microscópico respectivo y medios de objeto, en el que al menos dichas muescas presentan un perfil de superficie inferior correspondiente a los contornos de las mismas sobre dicho portaobjetos; en el que dicho sistema está dotado además de medios de colocación que comprenden un soporte de portaobjetos, que está adaptado para coincidir con dicho perfil de superficie inferior al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas.

El ajuste estrecho entre los contornos coincidentes del portaobjetos y el soporte portaobjetos garantizan una fácil colocación del portaobjetos con precisión de μm cuando se asienta en el soporte. Es posible por tanto la microscopía no asistida incluso tras la retirada y la reinserción del portaobjetos. Por tanto, se colocan objetos microscópicos en un portaobjetos de este tipo en puntos definidos que pueden inspeccionarse, manipularse y/o fotografiarse automáticamente de manera rutinaria.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para manejar un dispositivo tal como se describió anteriormente, que comprende la etapa de colocar dicho dispositivo dentro de un sistema haciendo coincidir dicho perfil de superficie inferior (20) de dicho dispositivo al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas con medios de colocación correspondientes que comprenden un soporte de portaobjetos de dicho sistema.

Además, la invención se refiere a un método para la microscopía y/o el cultivo de objetos en un dispositivo tal como se describió anteriormente en un sistema, que comprende la etapa de colocar el dispositivo bajo el microscopio y/o la fuente de calor adecuada para proporcionar temperaturas para cultivar dichos al menos dos objetos microscópicos (1a, 1b) en relación con el mismo.

En una realización, el método comprende además la etapa de hacer coincidir dicho perfil de superficie inferior (20) de dicho dispositivo al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas con medios de colocación correspondientes que comprenden un soporte de portaobjetos de dicho sistema. La etapa de hacer coincidir puede realizarse sosteniendo la superficie superior del portaobjetos de microscopio de manera sustancialmente horizontal y moviendo el portaobjetos hasta una posición por encima del soporte de portaobjetos y haciendo descender el portaobjetos verticalmente sobre dicho soporte de portaobjetos.

La etapa de realizar la microscopía de dichos al menos dos objetos microscópicos (1a, 1b) puede realizarse de manera o bien manual o bien automática, y o bien posteriormente o bien sustancialmente al mismo tiempo.

La etapa de proporcionar la temperatura para el cultivo proporciona preferiblemente una temperatura estable dada a al menos dichas muescas conectando dicha capa termoconductora a dicha fuente de calor, temperatura que es adecuada para el cultivo, en particular para la incubación de dichos al menos dos objetos microscópicos. Dicha fuente de calor puede estar conectada a dicho portaobjetos, dicho soporte de portaobjetos y/o dicho saliente.

El método puede comprender además la etapa de dotar a la capa termoconductora de una temperatura predeterminada adecuada para el cultivo a lo largo de un cierto periodo de tiempo.

El método puede comprender además la etapa de proporcionar medios de objeto (5a, 5b) en al menos cada una de dichas muescas (4a, 4b) de tal manera que dichos medios (5a, 5b) no están en comunicación de fluido mutua;

- proporcionar un objeto microscópico (1a, 1b) en cada una de dichas al menos dos muescas (4a, 4b);

- proporcionar una capa de recubrimiento común (7) dentro de dicho al menos un depósito (6) de tal manera que dichos medios (5a, 5b) no están en comunicación de fluido mutua; y

- realizar la microscopía y/o el cultivo de dichos al menos dos objetos microscópicos.

La capa de recubrimiento común puede ser fluida, semisólida y/o sólida, y preferiblemente fluida durante las temperaturas de cultivo. Además, los medios de objeto pueden ser fluidos, semisólidos y/o sólidos, y preferiblemente fluidos durante las temperaturas de cultivo.

Los objetos microscópicos (1a, 1b) son por ejemplo organismos microscópicos, tales como cultivos celulares en crecimiento, en particular embriones en desarrollo. En una realización preferida, los organismos microscópicos se seleccionan del grupo que contiene cultivos celulares *in vitro*, tales como cultivos de células individuales, embriones tales como ovocitos, embriones, protoblastos, citoblastos, etc., y/o bacterias, muestras biológicas y cualquier combinación de los mismos.

La etapa de colocar dicho dispositivo se realiza preferiblemente mediante colocación manual y/o automatizada manipulando dicho saliente de manejo (70) y/o dicho soporte de portaobjetos en la dirección X, Y y/o Z. Por consiguiente, en una realización, la etapa de colocación comprende además colocar automáticamente dicho dispositivo en relación con dicho microscopio y/o dicha fuente de calor usando dicha unidad de control, de manera que la etapa de colocación comprende además

- emitir una luz, tal como una luz láser para proporcionar al menos un haz de luz vertical,

- colocar dicho portaobjetos en relación con dicho microscopio y/o dicha fuente de calor hasta que dicho al menos un haz de luz pasa a través de dicho al menos un orificio vertical que se extiende a través del soporte de portaobjetos y se detecta por dicho sensor en el lado opuesto del portaobjetos de microscopio.

Los métodos según la invención pueden comprender además la etapa de monitorizar y/o proporcionar imágenes de dicho portaobjetos usando dicho equipo de cámara y/o vídeo, tal como se describió anteriormente y se describe en los documentos WO 2007/042044 y WO 2007/144001.

Además, los métodos según la invención pueden comprender una etapa de medición de la desviación entre la cámara y una punta de sensor.

En otra realización, el método según la invención puede comprender además la etapa de controlar la temperatura de dicha fuente de calor para lograr un entorno de incubador estable, y/o la etapa de monitorizar y/o adquirir imágenes de dichos objetos microscópicos usando dichos medios de obtención de imágenes, y/o analizar dichas imágenes para realizar una evaluación de la calidad de dichos objetos, y/o mantener un registro de portaobjetos de sustitución.

Bibliografía

Artículos

Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C y Callesen H (1998) Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. Theriogenology 50: 1285-1299

Lundin K, Bergh C y Harderson T (2001) Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. Hum Reprod 16,2652-2657

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para monitorizar y/o cultivar al menos dos objetos microscópicos (1 a, 1 b) y medios de objeto (5a, 5b), que comprende

- un portaobjetos (2) que comprende al menos dos depresiones (3a, 3b) en una superficie superior (2A) del mismo;

- en el que cada depresión (3a, 3b) comprende una muesca (4a, 4b) de una sección transversal más pequeña que la depresión para contener cada objeto microscópico respectivo (1a, 1b) y medios de objeto (5a, 5b), y

- estando dotado dicho portaobjetos (3a, 3b) de un depósito (6a, 6b) para proporcionar una capa de recubrimiento común (7) entre dichas depresiones (3a, 3b) de tal manera que dichos medios (5a, 5b) no están en comunicación de fluido mutua.

2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que dicho portaobjetos (2) comprende medios para identificar de manera única cada depresión.

3. Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos dicha depresión (3a, 3b) y/o dichas muescas (4a, 4b) presentan un perfil de superficie inferior (20) que corresponde a los contornos de al menos dicha depresión (3a, 3B) y/o dichas muescas (4a, 4b) sobre dicho portaobjetos (2); estando adaptada la topografía del perfil (20) para coincidir con una topografía correspondiente de un soporte de portaobjetos.

4. Dispositivo según la reivindicación 3, en el que al menos parte de dicho perfil de superficie inferior (20) está dotado de una capa termoconductora (23a, 23b), y/o en el que al menos una parte de dicho dispositivo está dotado de un saliente de manejo (70).

5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los objetos microscópicos (1a, 1b) son organismos microscópicos, tales como cultivos celulares en crecimiento, en particular embriones en desarrollo.

6. Sistema dispuesto para realizar la monitorización y/o el cultivo de al menos dos objetos microscópicos que comprende un dispositivo para manejar al menos dos objetos microscópicos y medios de objeto, comprendiendo dicho dispositivo:

un portaobjetos que comprende al menos dos depresiones en una superficie superior del mismo; comprendiendo cada depresión una muesca de una sección transversal más pequeña que la depresión para contener cada objeto microscópico respectivo y medios de objeto,

en el que al menos dichas muescas presentan un perfil de superficie inferior correspondiente a los contornos de las mismas sobre dicho portaobjetos;

en el que dicho sistema está dotado además de medios de colocación que comprenden un soporte de portaobjetos, que está adaptado para coincidir con dicho perfil de superficie inferior al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas.

7. Sistema dispuesto para realizar la monitorización y/o el cultivo de al menos dos objetos microscópicos (1a, 1b), que comprende un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y medios de colocación para sostener dicho dispositivo.

8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, que comprende además

- un microscopio y dichos medios de colocación que están dispuestos para colocar el dispositivo bajo el microscopio en relación con el mismo, y/o

- una fuente de calor adecuada para proporcionar temperaturas para cultivar dichos al menos dos objetos microscópicos (1a, 1b) y usándose dichos medios de colocación para garantizar el contacto térmico con dicha fuente de calor.

9. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dichos medios de colocación comprenden un soporte de portaobjetos, que está adaptado para coincidir con el perfil de superficie inferior al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas.

10. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que está dotado además de una capa termoconductora adaptada para proporcionar una temperatura estable dada a al menos dichas muescas, temperatura que es adecuada para el cultivo, en particular para la incubación de dichos al menos dos objetos microscópicos.

11. Método para manejar un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende la etapa de colocar dicho dispositivo dentro de un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 haciendo coincidir dicho perfil de superficie inferior (20) de dicho dispositivo al menos correspondiente a los contornos de al menos dichas al menos dos muescas con medios de colocación correspondientes que comprenden un soporte de portaobjetos de dicho sistema.

12. Método para la monitorización y/o el cultivo de un dispositivo en un sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 6 a 10, que comprende la etapa de colocar el dispositivo bajo el microscopio y/o la fuente de calor adecuada para proporcionar temperaturas para cultivar dichos al menos dos objetos microscópicos (1a, 1b) en relación con el mismo.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, que comprende además la etapa de

- proporcionar medios de objeto (5a, 5b) en al menos cada una de dichas muescas (4a, 4b) de tal manera que dichos medios (5a, 5b) no están en comunicación de fluido mutua;

- proporcionar un objeto microscópico (1a, 1b) en cada una de dichas al menos dos muescas (4a, 4b);

- proporcionar una capa de recubrimiento común (7) dentro de dicho al menos un depósito (6) de tal manera que dichos medios (5a, 5b) no están en comunicación de fluido mutua; y

- realizar la monitorización y/o el cultivo de dichos al menos dos objetos microscópicos.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que los objetos microscópicos (1a, 1b) son organismos microscópicos seleccionados del grupo que contiene cultivos celulares *in vitro*, tales como cultivos de células individuales, embriones tales como ovocitos, embriones, protoblastos, citoblastos, etc., y/o bacterias, muestras biológicas y cualquier combinación de los mismos.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende además la etapa de controlar la temperatura de dicha fuente de calor para lograr un entorno de incubador estable, y/o la etapa de monitorizar y/o adquirir imágenes de dichos objetos microscópicos usando dichos medios de obtención de imágenes, y/o analizar dichas imágenes para realizar una evaluación de la calidad de dichos objetos, y/o mantener un registro de los portaobjetos de sustitución.

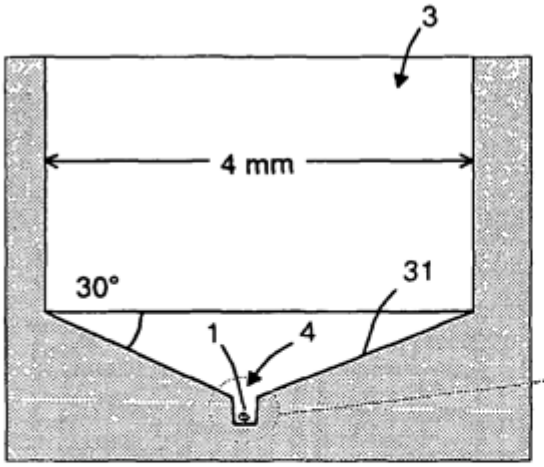

Fig. 1A

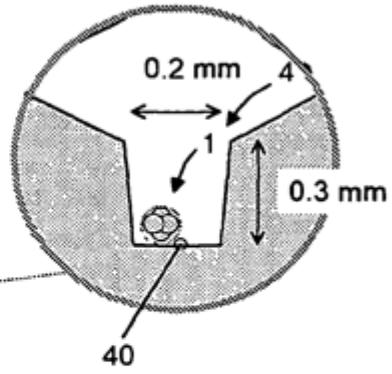

Fig. 1B

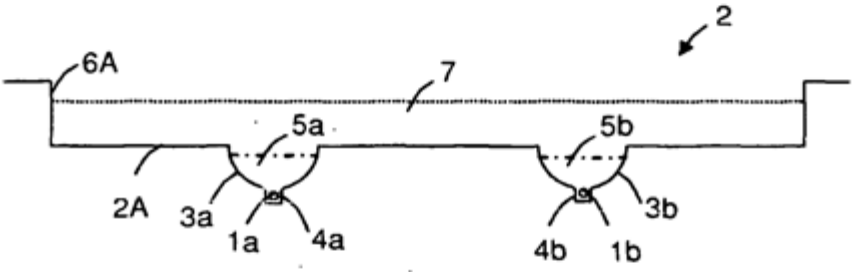

Fig. 2

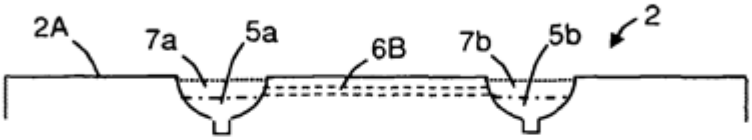

Fig. 3

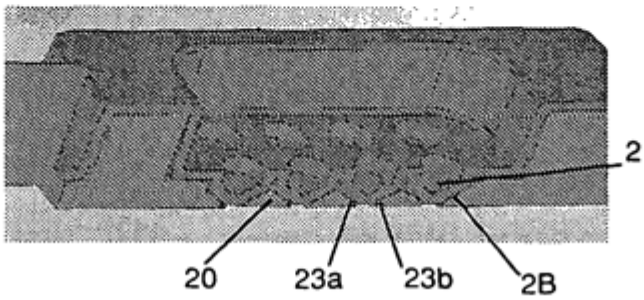

FIG. 4

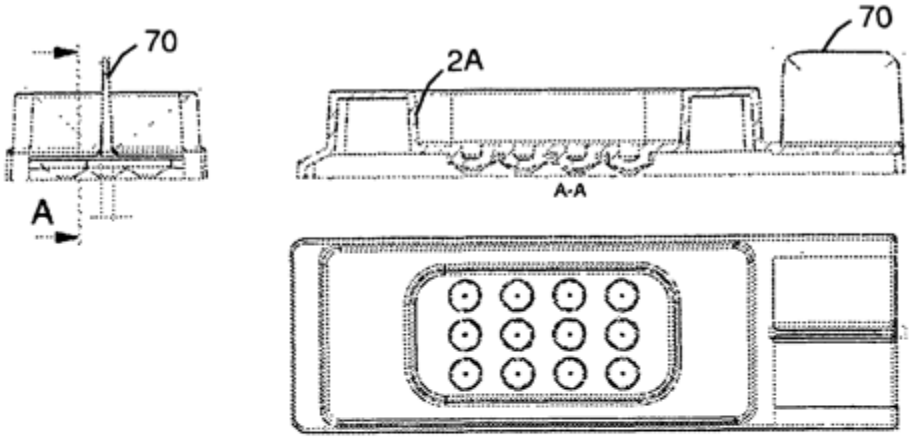

FIG. 5

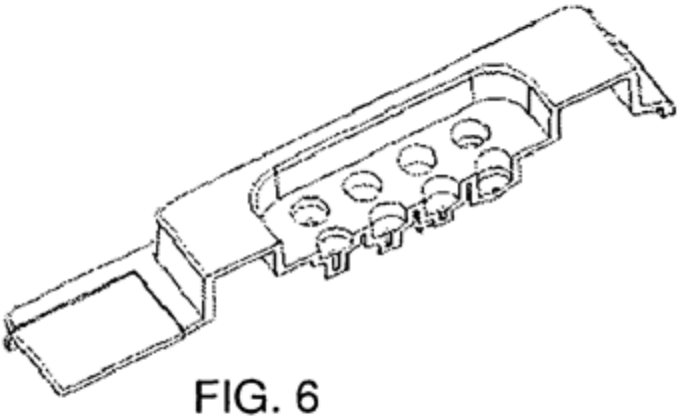

FIG. 6

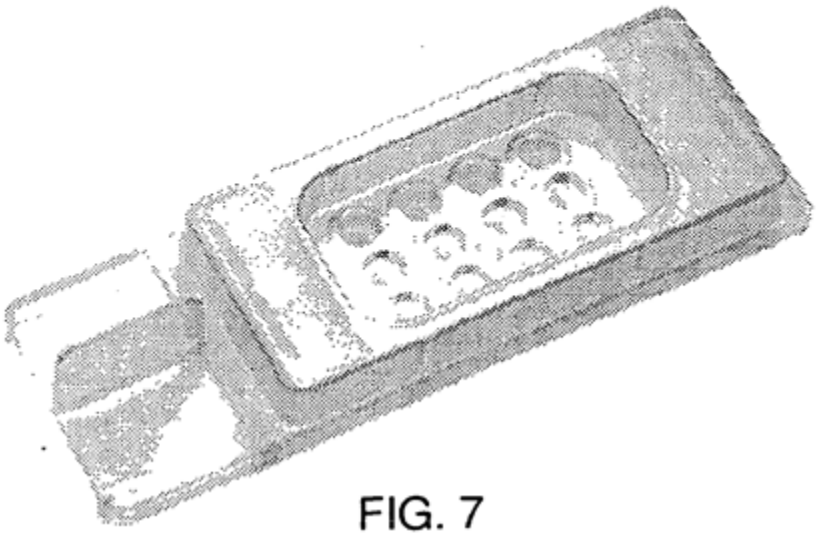

FIG. 7

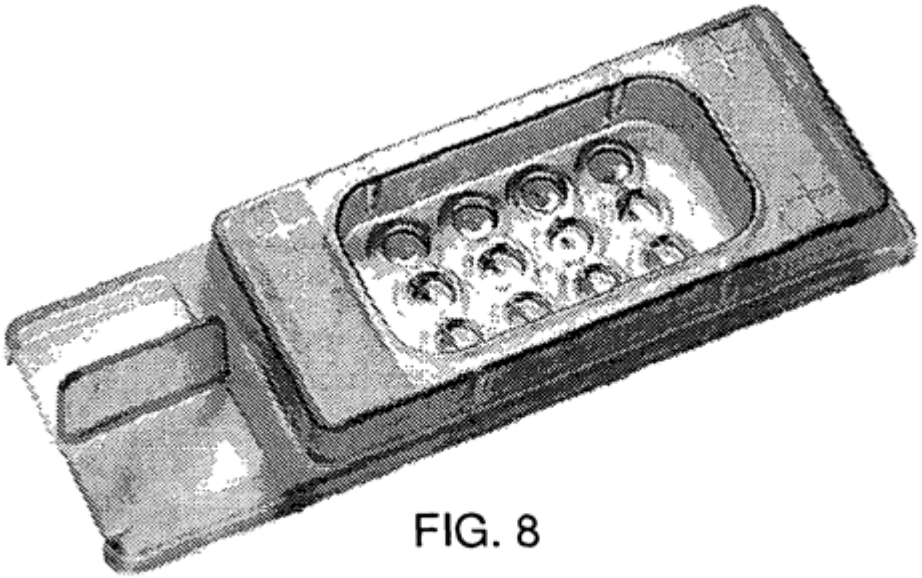

FIG. 8

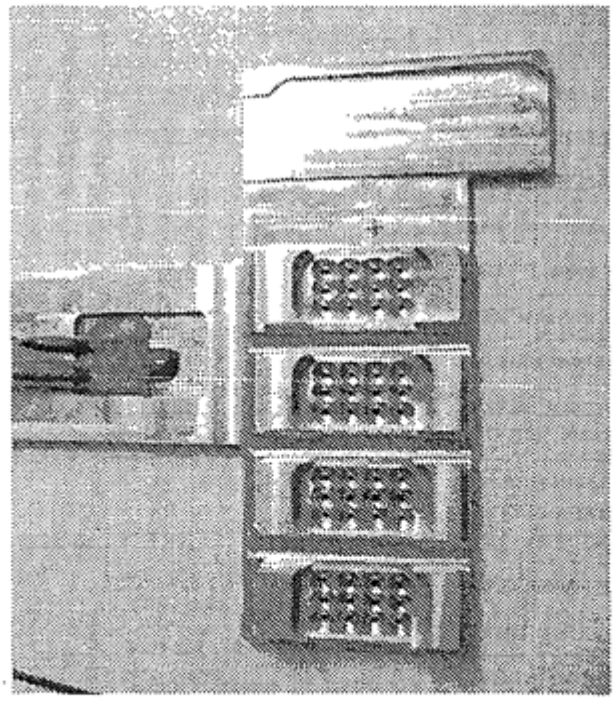

FIG. 9

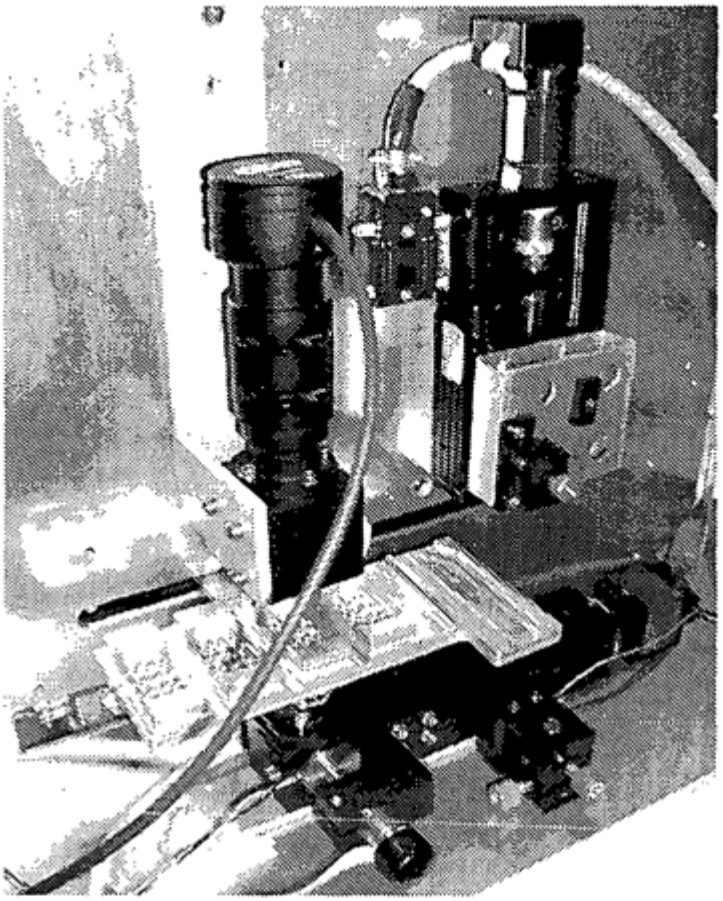

FIG. 10

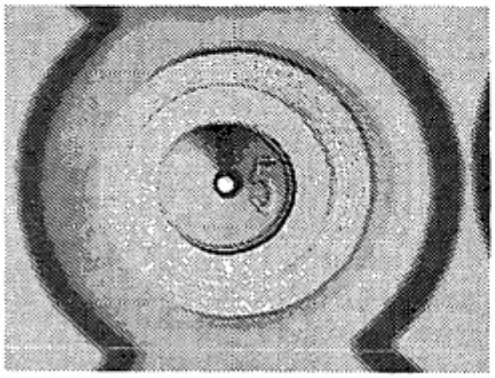

FIG. 11A

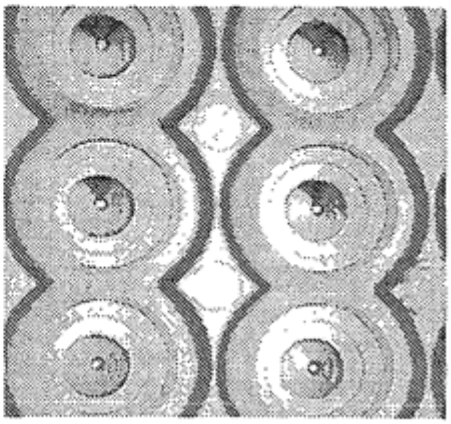

FIG. 11B

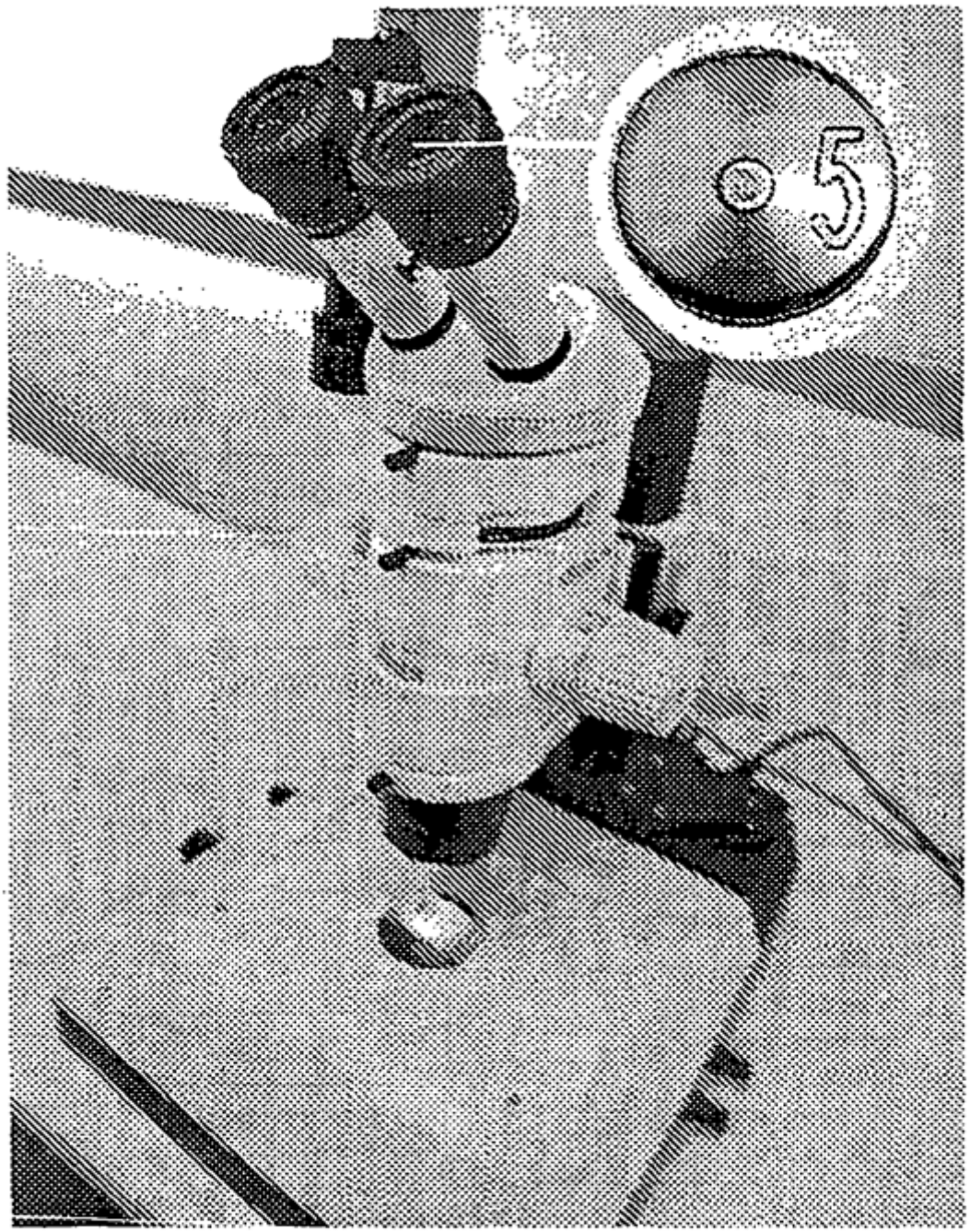

FIG. 12