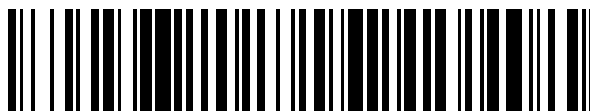


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 223**

51 Int. Cl.:

C12M 1/26 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2011** **E 11701928 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2539427**

54 Título: **Plataforma de alto rendimiento para cribados subcelulares in vivo en larvas de vertebrados**

30 Prioridad:

26.02.2010 US 713263

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

16.07.2015

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)**

**77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**YANIK, MEHMET F.;
WASSERMAN, STEVEN C.;
PARDO, CARLOS;
CHANG, TSUNG-YAO y
GILLELAND, CODY L.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 541 223 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

Plataforma de alto rendimiento para cribados subcelulares *in vivo* en larvas de vertebrados

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a una plataforma de cribado de alto rendimiento y más particularmente a una plataforma de alto rendimiento capaz de realizar cribados genéticos y químicos *in vivo* en los organismos de muestras tales como larvas de pez cebra y otros teleósteos.

Los modelos de animales pequeños, como el pez cebra (*Danio rerio*) facilitan el estudio de procesos complejos a gran escala que no pueden replicarse *in vitro*, tales como: el desarrollo de órganos; la degeneración y regeneración neural; la proliferación y la migración de células madre; las funciones de los sistemas cardiovascular, inmunológico, endocrino y nervioso; la progresión de enfermedades infecciosas; la patogenia; la progresión del cáncer y la especificidad tisular y la toxicidad de los fármacos. Varias características deseables del pez cebra han alimentado su popularidad, incluyendo el pequeño tamaño del animal, la transparencia óptica, el hábitat acuático y la simplicidad del cultivo. Se han desarrollado modelos en pez cebra de varias enfermedades humanas¹⁻¹¹. Los superíndices se refieren a las referencias incluidas en el presente documento. Los contenidos de todas estas referencias se incorporan en el presente documento por referencia. Los compuestos principales descubiertos mediante el cribado de bibliotecas de compuestos químicos para la eficacia en modelos de enfermedad en pez cebra han sido útiles para el desarrollo farmacéutico debido al alto nivel de conservación de la actividad del fármaco entre los mamíferos y el pez cebra^{12,13}. La disponibilidad de un gran número de cepas mutantes y manipulaciones genéticas tales como la sobreexpresión, la inactivación y la silenciación de genes convierten al pez cebra en un potente modelo para estudios genéticos y para la identificación de las dianas celulares de nuevos compuestos^{1,14,15}. Las ventajas significativas del pez cebra han impulsado el crecimiento exponencial de su uso en investigaciones experimentales en las últimas dos décadas¹.

Varias compañías y laboratorios académicos están llevando a cabo cribados genéticos y de compuestos con larvas de pez cebra incubados en placas de 96 pocillos^{1,2,4,12}. Debido a que la manipulación del pez cebra ha sido en gran parte manual, los cribados típicos de alto contenido de pez cebra se limitan a unos pocos miles de compuestos a la semana. Los ensayos de resolución subcelular requieren acceso óptico a una región específica de la muestra para la formación de imágenes o la manipulación. El acceso claro a menudo se ve obstaculizado por órganos intermedios tales como los ojos y el corazón. La yema de huevo y algunos órganos presentan una autofluorescencia significativa. Además, las pigmentaciones de la piel pueden bloquear la región de interés. La visualización de la mayoría de las regiones requiere orientar al pez cebra apropiadamente. Sin embargo, los métodos de orientación de la muestra actuales requieren la introducción de la muestra en medios viscosos tales como agar y / o girar manualmente el pez con pinzas. Estos procesos son demasiado lentos y poco fiables para cribados de alto rendimiento. Además, las muestras no pueden reorientarse rápidamente una vez que se han fijado, de modo que se impide la visualización de los órganos desde múltiples ángulos. Ejemplos de ensayos que requieren orientación de la muestra y formación de imágenes de resolución subcelular incluyen la vigilancia *in vivo* del crecimiento tumoral temprano, la degeneración neuronal, la regeneración de neuritas y la proliferación y la migración de células madre en los tejidos que comprenden el cerebro, los ojos, el corazón, el páncreas, los riñones y el hígado.

El documento WO 2009/049740 se refiere a un método para colocar al menos una muestra biológica, preferiblemente, en el espacio de muestra de una disposición microscópica y dispositivos para realizar dicho método. En los métodos y dispositivos propuestos, la orientación de la muestra se puede variar varias veces en relación con el eje óptico de un objetivo de detección y la muestra se sujeta a fin de garantizar la vista más posible sin las mayores restricciones posibles de la muestra desde cada dirección de detección, donde, en diferentes formas de realización, la muestra se sujeta en un dispositivo de soporte mediante fuerzas de adhesión, la muestra se sujeta en un dispositivo de soporte mediante un medio de flujo, la muestra se sujeta por efecto capilar en una abertura capilar, o, al menos una muestra se embebe en una cuerpo hecho de una arena de gel transparente, el cuerpo de gel se fija por medio de un dispositivo de sujeción rotatorio en el espacio de muestra, donde la dirección de detección se altera mediante un ángulo de giro predeterminado después de la rotación del dispositivo de sujeción.

El artículo de Funfak et al. titulado "Micro fluid segment technique for screening and development on *Danio rerio* embryos" Lab on a Chip 2007, 7:1132 - 1138 describe la aplicabilidad de segmentos de microfluidos para el estudio del comportamiento de los sistemas multicelulares. Se determinó que era posible introducir los huevos de vertebrados dentro de los segmentos de microfluído sin producir un daño significativo o la inhibición de su desarrollo y que las concentraciones enormes de dodecilsulfato sódico limitan el desarrollo del embrión, dependiendo tanto de tiempo de incubación como de la concentración de cloruro de cobre (II) añadido.

El artículo titulado "Automated Image-base Phenotypic Analysis in Zebrafish Embryos", Developmental Dynamics, vol. 238 1 January 2009, pp 656 - 663, describe un sistema automatizado para la formación de imágenes y el análisis de embriones de pez cebra en placas de múltiples pocillos independientemente de la orientación del embrión y sin intervención del usuario. El método de análisis de imagen empleado de la tecnología de red de cognición hizo factible medir fenotipos de organismos enteros complejos.

El documento WO 2010/014244 se refiere a un método y dispositivo para la microscopia de iluminación de plano selectivo multidireccional. Un plano focal detector es iluminado de forma alterna con al menos dos láminas de luz coplanar de contrapropagación y se detecta una imagen, de una sección transversal de la muestra colocada en el plano focal, mientras que solo una lámina de luz ilumina la muestra. El frente de onda de los haces de iluminación se puede deformar con óptica adaptativa usando retroalimentación de la luz transmitida a través de la muestra. Se pueden detectar varias imágenes de la sección transversal de la muestra a diferentes tiempos y posiciones y orientaciones de la muestra para producir pilas de imágenes de múltiples vistas que se pueden procesar usando fusión de imágenes para producir una representación de imagen reconstruida de la muestra. Adicionalmente, la dirección de la propagación de las láminas de luz alternas se puede pivotar en el plano focal al tiempo que se detecta la imagen.

Sumario de la invención

En un aspecto, el sistema de alto rendimiento de la invención para cribados *in vivo* incluye una de las características mencionadas en la reivindicación 1. La invención también se refiere a un método para cribados de alto rendimiento *in vivo*, que comprende las etapas citadas en la reivindicación 18 y un sistema automatizado para cribados *in vivo* con vertebrados, larvas que comprenden las etapas citadas en la reivindicación 43. Los organismos de muestra adecuados incluyen teleósteos u otros animales acuáticos y embriones. Un teleósteo preferido es la larva de pez cebra.

En una realización preferida, las larvas son peces cebra. Se prefiere que la fuente de las larvas sea un depósito o una placa de múltiples pocillos. El depósito puede incluir un depósito de peces y un depósito de líquido. Se prefiere que la placa de múltiples pocillos sea una placa de 96 pocillos y que se asiente en una etapa en posición x-y. En aún otra realización preferida, el conjunto detector incluye dos diodos emisores de luz y un fotodiodo de alta velocidad dispuestos en configuraciones de transmisión y reflexión. En una realización, los medios de formación de imágenes incluyen un par de motores de paso para la rotación de un tubo capilar para reorientar una larva. El tubo capilar puede ser, preferentemente, de vidrio o teflón.

En aún otra realización, los medios de formación de imágenes incluyen una lente objetivo de inmersión en agua de potencia 20 para la formación de imágenes confocales. Los medios de formación de imágenes también incluyen una lente objetivo invertida de potencia 10 para la formación de imágenes de campo claro. Se prefiere que los medios de formación de imágenes incluyan una cámara CCD refrigerada de multiplicación de electrones. Se prefiere que el láser sea un láser de femtosegundo. El segundo láser de femtosegundo se selecciona para generar un haz adecuado para microcirugía o ablación y/o fotoactivación. El sistema divulgado en el presente documento puede usarse para realizar cribados genéticos o químicos.

Breve descripción de las figuras

Las Figs. 1 a y 1 b son los diagramas de flujo esquemáticos para cribados químicos y genéticos de acuerdo con una realización de la invención.

Las Figs. 2a - 2d son diagramas esquemáticos de la plataforma de cribado de pez cebra divulgada en el presente documento.

Las Figs. 3a - 3b son fotomicrografías que muestran la orientación del pez cebra, la formación de imágenes, la microcirugía láser de femtosegundo y la regeneración.

Las Figs. 4a - 4c son ilustraciones que muestran una evaluación cuantitativa de la salud animal.

Descripción de la realización preferida

Para facilitar una mejora espectacular en el rendimiento y la complejidad de los cribados de pez cebra, los inventores han desarrollado una plataforma para la rápida manipulación de larvas de pez cebra. Las larvas de pez cebra se usarán en el presente documento para describir la invención. Es preciso reconocer que otros teleósteos y animales acuáticos y los embriones se pueden utilizar y se pretende incluir otros de estos organismos de muestra dentro de la expresión larvas de pez cebra. El sistema automatizado permite cribados tanto genéticos como químicos, como se muestra en la Fig. 1. Para los cribados genéticos, los animales mutagenizados se cargan desde un depósito a la plataforma de imágenes. Después de las imágenes, los mutantes se clasifican en placas de varios niveles por fenotipo. Para los cribados químicos, los animales se cargan desde un depósito a la plataforma de formación de imágenes que se puede utilizar ya sea para contar el número de animales y / o para realizar manipulaciones ópticas tales como la microcirugía láser. Después, se dispensan los animales en placas de múltiples pocillos que contienen productos químicos que se van a analizar. Después de la incubación dentro de los productos químicos, los animales se vuelven a cargar en la plataforma de imágenes para comprobar los fenotipos.

Los ejemplos de cribados genéticos y químicos que se pueden realizar con la presente invención incluyen un cribado químico para la regeneración de órganos en busca de promotores de la proliferación de células progenitoras. Este

ensayo se puede realizar en múltiples órganos tales como el hígado, los riñones, el páncreas, músculo esquelético, los folículos pilosos y el sistema nervioso central y periférico. Otro ejemplo lo constituyen los cribados de productos químicos inhibidores dirigidos a las proliferaciones de células tumorigénicas *in vivo*. Otro ejemplo más lo constituyen los cribados de sustancias químicas protectoras que reducen significativamente o inhiben la hipotrofia o la muerte celular en modelos de enfermedad degenerativa tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o de Huntington. Se contemplan los cribados para evaluar la toxicidad biológica de fármacos en múltiples órganos, tales como en el hígado, los riñones, el páncreas, el corazón, las células ciliadas y las neuronas en los sistemas nerviosos central y periférico. Los cribados genéticos y químicos para estudiar la diferenciación y proliferación de diferentes linajes de células y orgánogénesis por fotoactivación de las proteínas indicadoras fluorescentes como trazadores de linaje también pueden realizarse usando el sistema de la invención divulgado en el presente documento.

La capacidad para trabajar con placas estándar de múltiples pocillos es esencial para manipular e incubar grandes poblaciones de larvas de pez cebra, por lo que el sistema se diseñó para cargar automáticamente muestras y dispensarlas de nuevo en pocillos individuales. El sistema también tiene la capacidad de cargar los animales desde depósitos. Después de la carga automática, los animales se colocan dentro del campo de visión (FOV) de un subsistema de formación de imágenes ópticas y manipulación con formación de imágenes confocales de alta velocidad y capacidades de manipulación óptica. Las muestras se pueden recolocar y rotar sobre la marcha, eliminando la necesidad de la manipulación manual y de métodos químicos invasivos para suprimir la pigmentación de la piel, tales como feniltiourea (PTU)¹⁶. Además, el control activo de la orientación de la muestra permite el uso de lentes objetivo de alta apertura numérica (NA) que requieren distancias de trabajo cortas. Los objetivos de alta NA recogen más luz, reducen la fluorescencia de fondo y disminuyen la dispersión y absorción por el tejido intermedio. Con el uso del sistema de los inventores son posibles los cribados de de resolución subcelular de alto contenido.

Con referencia ahora a la Fig. 2^a, un depósito de medio líquido 10 y un depósito de peces 12 se controlan con válvulas de fluidos 14 y 16. Un mezclador de burbuja 18 inyecta burbujas en el depósito de peces 12 para proporcionar agitación. Una bomba de jeringa (se muestra el despiece) permite aspirar las larvas de los peces en un tubo 20. Una vez que un animal ha entrado en el tubo, las dos válvulas controladas por ordenador 14 y 16 cambian automáticamente la fuente de fluido desde el depósito de larvas a un depósito separado 10 que contiene medio para peces para evitar la carga de múltiples peces.

En una realización alternativa, como se muestra en la Fig. 2b, las larvas se incluyen en una placa de múltiples pocillos 21 apoyada en una plataforma en posición x-y. La plataforma de 2 ejes coloca un solo pocillo debajo de un pistón neumático que desciende los extremos de dos tubos de silicona (tubos de carga y suministro con diámetros de 1,0 y 0,2 mm, respectivamente) en el volumen del pocillo seleccionado. Un bloque de caucho de silicona 22 sella una superficie del pocillo para facilitar la despresurización. La larva es aspirada a través de un tubo de carga, mientras que un tubo de suministro repone de forma simultánea el fluido retirado.

Una larva de pez cebra del depósito de peces 12 o de un pocillo en la placa de múltiples pocillos 21 pasa a través de una sección de detección del sistema como se muestra en la Fig. 2c. El sistema de detección discierne automáticamente la entrada de las larvas en el tubo 20 desde los pocillos 21 o desde el depósito 12 e incluye dos diodos emisores de luz 24 y 26 y un fotodetector 28 colocado alrededor del tubo 20. El diodo emisor de luz 26 está dispuesto de un modo tal que la luz se transmite a través de una larva y es recibida por el fotodetector 28. El diodo emisor de luz 24 se compensa de forma que la luz que alcanza el fotodetector 28 se ha dispersado. Al controlar simultáneamente las señales tanto de transmisión como de dispersión, el sistema de la invención se diferencia el paso de una larva desde las burbujas de aire y los desechos. Para garantizar el reconocimiento de los animales que se mueven rápidamente, el detector funciona a una frecuencia de muestreo preferida de 2 kHz.

Una larva se mueve desde la sección de detección mostrada en la Fig. 2c en un sistema de imagen mostrado en la Fig. 2d. Como se muestra en la Fig. 2d, una larva 30 está situada dentro del FOV en un tubo capilar de teflón 32 que tiene un diámetro interior de aproximadamente 800 [mu] [eta] [iota]. El capilar 32 se corresponde con el índice de refracción del agua para evitar la distorsión de la imagen. El tubo capilar 32 puede ser de vidrio. Como se muestra en la Fig. 2d, el sistema óptico de obtención de imágenes incluye dos microscopios: uno vertical y el otro invertido. La lente vertical 34 es una lente de objetivo de inmersión en agua de 20 aumentos (NA = 1,0) para la formación de imágenes confocales y la lente invertida de 10 aumentos 36 es una lente de objetivo de aire para la obtención de imágenes en campo claro. Una cabeza confocal de disco giratorio de alta velocidad con una cámara CCD refrigerada de EM de multiplicación de electrones se conecta al puerto vertical del microscopio para la obtención de imágenes de fluorescencia confocal a una velocidad de vídeo. La cámara CCD de multiplicación de electrones es el elemento 38. Una segunda cámara CCD 40 se conecta a un puerto invertido para la detección y colocación de larvas. Un láser de femtosegundo 42 proporciona un haz usado para microcirugía o ablación y fotoactivación o fotoestimulación y se dirige al trayecto del haz superior mediante un filtro dicróico y centra la muestra a través del objetivo de 20 aumentos 34. Dos motores de paso 44 y 46 están controlados con precisión para rotar en direcciones opuestas para no torcer el capilar 32, de modo que proporciona una ubicación precisa de las larvas 30.

Una bomba de jeringa controlada por ordenador (no mostrada) controla automáticamente la colocación aproximada de una larva dentro del tubo capilar 32 dentro del campo de visión del subsistema óptico de la Fig. 2d. El capilar 32

se corresponde con el índice de refracción del agua para evitar la distorsión de la imagen. El uso de imágenes de una cámara EMCCD rápida, un algoritmo de procesamiento de imágenes automático detecta la entrada de una larva en el campo de visión y después detiene la bomba de la jeringa. Después de la colocación aproximada de la larva con la bomba de la jeringa, una plataforma de posición en 3 ejes mueve automáticamente el montaje capilar para colocar la cabeza del animal en el centro del campo de visión de la cámara a través del procesamiento automático de imágenes como se sabe en la técnica.

Los animales se orientan en el camino mediante un par de motores de paso 44 y 46 que rotan el capilar 32. Los motores 44 y 46 están montados sobre una estructura de soporte con sus ejes enfrentados entre sí. Los motores están impulsados por un controlador de microetapas conectado a un ordenador (no mostrado) que perita pasos de 0,2 grados a una velocidad angular de hasta 180 grados por segundo. Todo el conjunto de motor y capilar, además de una cámara de formación de imágenes llena de agua donde está inmerso el objetivo superior, está montado sobre la fase de posición motorizada de 3 ejes. Por tanto, las larvas pueden colocarse y orientarse de forma arbitraria dentro del campo de visión del microscopio con una precisión de submicrones. El sistema de formación de imágenes permite obtener imágenes simultáneas de fluorescencia de campo ancho y microscopía confocal en disco giratorio de de alta velocidad, de alta resolución. El sistema de formación de imágenes puede tener una capacidad formación de imágenes de dos fotones.

La Fig. 3a muestra un ejemplo de conjunto de imágenes confocal es de una muestra orientada en varios ángulos para visualizar el cruce de la línea media de los axones de la neurona de Mauthner¹⁷. El cruce de la línea media sólo es visible cuando se observa desde la parte posterior del cerebro (0° en la figura). A orientaciones menos favorables, la estructura está oscurecida. Las imágenes se muestran adicionalmente a 15° y 45°. La barra de escala es de 150 µm.

El sistema también incorpora una precisión subcelular, la capacidad de estimulación del láser de femtosegundo. En combinación con las capacidades de posicionamiento y orientación automáticos precisos del sistema, el láser de femtosegundo 42 permite manipulaciones ópticas tales como la activación localizada de indicadores fluorescentes y canales iónicos, desembalaje de compuestos, y microcirugía láser. La Fig. 3b muestra un ejemplo de cómo se utilizaría el sistema para estudiar la regeneración neuronal después de una lesión por microcirugía láser. El pez cebra tiene una capacidad regenerativa significativa, lo que los convierte en un potente modelo para investigar mecanismos regenerativos, así como para el cribado de productos químicos que mejoran la regeneración. Los ensayos existentes para dañar al pez cebra utilizando bisturís son demasiado lentos e invasivos para los estudios fiables a gran escala de la regeneración¹⁸. En la imagen, el haz de fibras laterales del axón neuronal que se proyectan a lo largo del tronco de un larva es visible cuando se la larva está orientada lateralmente. La axotomía láser precisa se consigue centrando los pulsos de láser de femtosegundo en el infrarrojo cercano (NIR) (flecha blanca en la Fig. 3b), como los autores han demostrado previamente para el estudio de la regeneración neuronal en *C. elegans*¹³. A longitudes de onda NIR, el tejido es altamente transparente; sin embargo, la absorción no lineal de los fotones en el foco de los pulsos ultracortos permite la ablación del axón con precisión de micrómetros sin dañar al tejido circundante. La cirugía se realiza de forma semiautomática en el sistema de los inventores para obtener un alto rendimiento. El usuario selecciona un cuerpo celular haciendo clic en una interfaz gráfica de usuario. Un algoritmo calcula la distancia desde el cuerpo celular hasta el punto de axotomía lo largo del axón. La plataforma de posición desplaza automáticamente la región axonal a axotomizar hacia el punto focal del láser 42. Los pulsos del láser de femtosegundo 42 se liberan después automáticamente abriendo un obturador de láser electroóptico para realizar la microcirugía. La Fig. 3b también muestra el recrecimiento de fibras axonales a las 18 y 24 horas de la axotomía. La fibra del axón se corta a una distancia de 850 [µm][iota][eta] desde el soma usando pulsos láser ultracortos con una longitud de onda de 780 nm, una duración de 100 fs, energía de pulso de 15 nj, tasa de repetición de 80 MHz y un tren de pulso de 10 ms de longitud centrado por una lente objetivo de 20 aumentos de NA = 1,0. La barra de escala 75 µm.

Después de la formación y manipulación de las imágenes, las larvas se dispensan en placas de múltiples pocillos para su posterior incubación ejecutando el proceso de carga a la inversa. El volumen de solución dispensada se controla hidráulicamente con una precisión superior a 10µ. Un ciclo completo que consiste en carga, posicionamiento, rotación, formación de imágenes confocales de resolución subcelular y dispensación de un animal tarda menos de 16 segundos (Fig. 4A). Realizados manualmente, ensayos similares requieren aproximadamente 10 minutos y la tasa de fracaso es mucho mayor.

Las larvas de pez cebra son delicadas; sus yemas son particularmente susceptibles a la manipulación poco delicada. Los inventores analizaron metodologías y caudales alternativos para desarrollar un sistema que produzca mínimos daños. El daño más significativo para las larvas se produce durante su entrada desde el depósito 12 o la placa de múltiples pocillos 21 en el tubo de carga 20 a velocidades de aspiración altas. Dado que se necesitan velocidades de aspiración altas para un rendimiento aceptable, se inicia el flujo a una velocidad inicial baja antes de que un animal entre en el tubo de carga para reducir el riesgo de lesiones y, después, la velocidad se incrementa a una aceleración constante de 42 µl/s² hasta que el fotodetector detecta una larva (Fig. 2c). El caudal máximo se limita a 330 µl/s. A este caudal máximo, no se producen daños en las larvas si la larva está dentro del tubo. Una vez que se detecta una larva en el interior del capilar 32, el software de control disminuye automáticamente la velocidad de aspiración de 83 µl/s para permitir el reconocimiento automatizado de la larva por la cámara 38. La Fig. 4b

muestra los resultados para 450 larvas cribadas por el sistema a tres velocidades de aspiración iniciales diferentes. Después de 36 horas, la salud de las larvas se evaluó mediante confirmación visual del ritmo cardíaco normal, la morfología y la respuesta refleja a los estímulos de tacto y luz. Al caudal inicial más alto (330 $\mu\text{l/s}$), el 2,0% de los animales mostró una anomalía morfológica. Los criterios de anomalía incluyeron lordosis, cifosis, escoliosis y anomalías craneofaciales¹⁹. El retraso en el desarrollo después de la manipulación se midió mediante el control del tiempo de aparición de la vejiga natatoria. Como se muestra en la Fig. 4c, no hubo diferencias significativas ($P = 0,94$) entre el desarrollo de las larvas que se manipularon con el sistema y los animales control, incluso a los caudales más altos. Además, cuando se opera a una velocidad de carga ligeramente más lenta (aumentando el tiempo del ciclo aproximadamente por 1 segundo), el sistema no tuvo efectos sobre la supervivencia.

Los inventores han demostrado una plataforma de alto rendimiento para manipular un organismo de muestra con capacidades de formación de imágenes de resolución celular y cirugía, lo que permite ensayos complejos de alta resolución *in vivo* tal como la regeneración neuronal. La plataforma puede usarse para cribados genéticos directos e inversos, así como para cribados químicos. La plataforma carga y dispensa automáticamente los animales a desde placas de múltiples pocillos, que es crucial para la incubación a gran escala de pez cebra. Es capaz de orientar a los animales sobre la marcha con una precisión de subgrado y, por lo tanto, permite la visualización y la manipulación de estructuras superficiales y profundas que son, de otro modo, inaccesibles en los cribados de alto rendimiento existentes. Todo el proceso de carga, posicionamiento, orientación, formación de imágenes, micromanipulación láser, y dispensación de los animales tiene lugar en un plazo de 18 segundos, una mejora de aproximadamente dos órdenes de magnitud respecto a los métodos existentes. El cribado de cientos de animales demostró que nuestro sistema funciona de forma no invasiva y fiable en presencia de artefactos tales como burbujas de aire y desechos en el medio. Por lo tanto, nuestra plataforma puede acelerar significativamente el rendimiento de los ensayos sofisticados en los vertebrados.

Se reconoce que las modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica y se pretende que todas estas modificaciones y variaciones se incluyan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

1. Zon, L.I., Peterson, R.T., *in vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discovery* 4(1), 35 - 44 (2005).
2. Amatruda, J.F., Shepard, J.L., Stern, H.M., Zon, L.I., Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* 1 (3), 229 - 31 (2002).
3. Rubinstein, A.L., Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 6(2), 218 - 23 (2003).
4. Kokel, D., Peterson, R.T., Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 7(6), 483 - 90 (2008).
5. Langheinrich, U., Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays* 25(9), 904 - 12 (2003).
6. Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., Berghmans, S., Zebrafish: an emerging technology for *in vivo* pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 154(7), 1400 - 13 (2008).
7. den Hertog, J., Chemical genetics: Drug screens in Zebrafish. *Biosci Rep.* 25(5 - 6), 289 - 97 (2005).
8. Lee, J.W., Na, D.S., Kang, J.Y., Lee, S.H., Ju, B.K., Differentiation of mouse p19 embryonic carcinoma stem cells injected into an empty zebrafish egg chorion in a microfluidic device. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(6), 1325 - 30 (2006).
9. Buckley et al. Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination?. *Disease Models & Mechanisms* 1, 221 - 228 (2008).
10. McGrath, P., Li, C, Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today* 13(9 - 10), 394 - 401 (2008).
11. Wen et al. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Developmental Biology* 314, 84 - 92 (2007).
12. King, A" Researchers find their Nemo. *Cell* 139(5), 843 - 846, (2009).
13. Shin, J.T., Fishman, M.C., From Zebrafish to human: modular medical models. *Anna. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 3, 31 1 - 40 (2002).

14. Lieschke, G.J., Currie, P.D., Animal models of human disease: zebrafish swim into view, *Nature Genetics* 8, 353 - 367 (2007).

15. Patton, E.E., Zon. L.I., The art and design of genetic screens: zebrafish, *Nature Genetics* 2, 956 - 966 (2001).

16. Karlsson, J., Hofsten, J.V., Olsson, P.E., Generating Transparent Zebrafish: A Refined Method to Improve Detection of Gene Expression During Embryonic Development. *Marine Biotech.* 3, 522 - 7 (2001).

17. Zottoli, S.J., Faber, D.S., The Mauthner Cell: What Has it Taught us?. *The Neuroscientist* 6(1), 26 - 38 (2000).

18. Bhatt D.H., Otto S.J., Depoister B, Fetcho J.R., Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science* 305(5681), 254 - 8 (2004).

19. Hutchinson T.H., Williams T.D., Culturing of fathead minnow larvae for aquatic toxicity testing: an observational note, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 665 - 669 (1993).

REIVINDICACIONES

1. Sistema de alto rendimiento para cribados *in vivo*, que comprende:

- 5 una fuente de un organismo de muestra en un medio líquido;
una bomba de jeringa para cargar automáticamente el organismo de muestra en el medio líquido de la fuente en un tubo capilar de vidrio;
una etapa de posición en 3 ejes para colocar automáticamente el organismo de muestra en el tubo capilar de vidrio dentro del campo de visión de un aparato de formación de imágenes; y
- 10 un conjunto de motor y capilar operable para girar el tubo capilar de vidrio, de modo que se rota el organismo de muestra dentro del campo de visión del aparato de formación de imágenes, de modo que se proporciona un cribado de resolución subcelular de alto contenido.

2. El sistema de la reivindicación 1, donde el organismo de muestra es un teleósteo.

3. El sistema de la reivindicación 1, donde la fuente es un depósito que contiene una pluralidad de organismos de muestra.

4. El sistema de la reivindicación 1, donde la fuente es una placa de múltiples pocillos que contiene una pluralidad de organismos de muestra.

5. El sistema de la reivindicación 3, donde la fuente se puede cambiar entre los organismos de muestra y un suministro de líquido.

6. El sistema de la reivindicación 4, donde un conjunto de tubo se coloca sobre la placa de múltiples pocillos de una etapa de posición.

7. El sistema de la reivindicación 6, donde el conjunto de tubo incluye un tubo de inyección para inyectar fluido y un tubo de aspiración para aspirar un organismo de muestra desde la placa de múltiples pocillos.

8. El sistema de la reivindicación 6, donde el conjunto de tubo y placa de múltiples pocillos se puede sellar.

9. El sistema de la reivindicación 1, donde el sistema incluye un detector automático que tiene una o más fuentes de luz y uno o más detectores de luz dispuestos en las configuraciones de transmisión y/o reflexión.

10. El sistema de la reivindicación 9, donde el detector automático diferencia burbujas de aire y / o desechos de los organismos de muestra.

11. El sistema de la reivindicación 1, donde el tubo incluye una porción que es un vidrio o cuarzo o capilar de polímero transparente dentro del campo de visión del aparato de formación de imágenes.

12. El sistema de la reivindicación 1, donde el aparato de formación de imágenes incluye al menos un motor para hacer girar el tubo dentro del campo de visión del aparato de formación de imágenes.

13. El sistema de la reivindicación 1, donde el aparato de formación de imágenes las obtiene simultáneamente a través de dos lentes de objetivo.

14. El sistema de la reivindicación 1, donde el aparato de formación de imágenes tiene capacidad de formación de imágenes confocales y / o de dos fotones y / o de campo amplio.

15. El sistema de la reivindicación 1, donde el aparato de formación de imágenes incluye un láser que genera un haz adecuado para la ablación y / o la fotoactivación y / o la fotoestimulación.

16. El sistema de la reivindicación 1, donde el sistema se utiliza para realizar cribados genéticos.

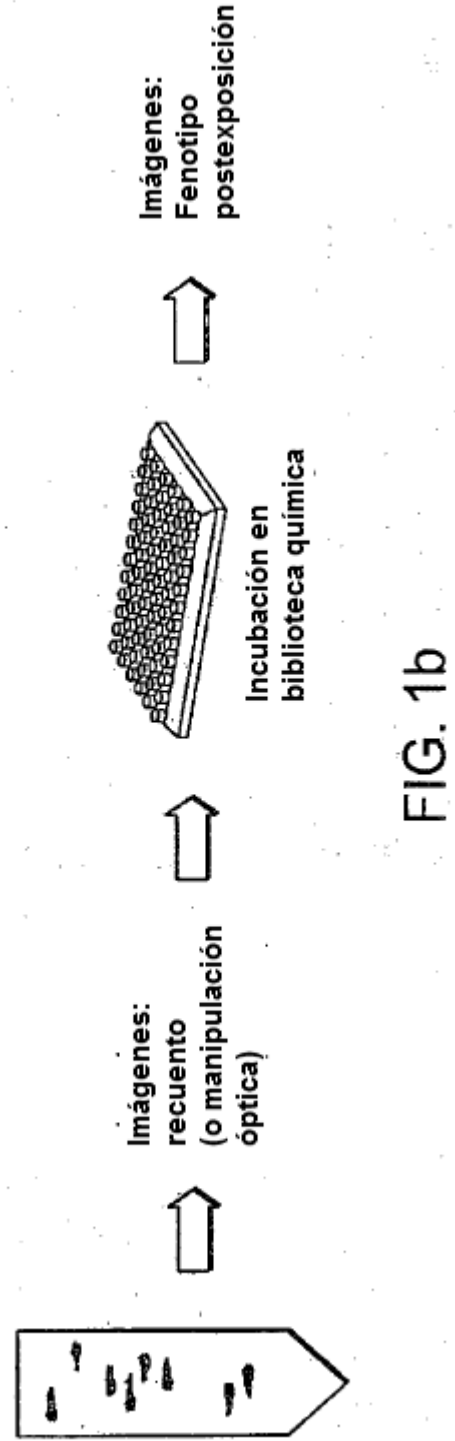
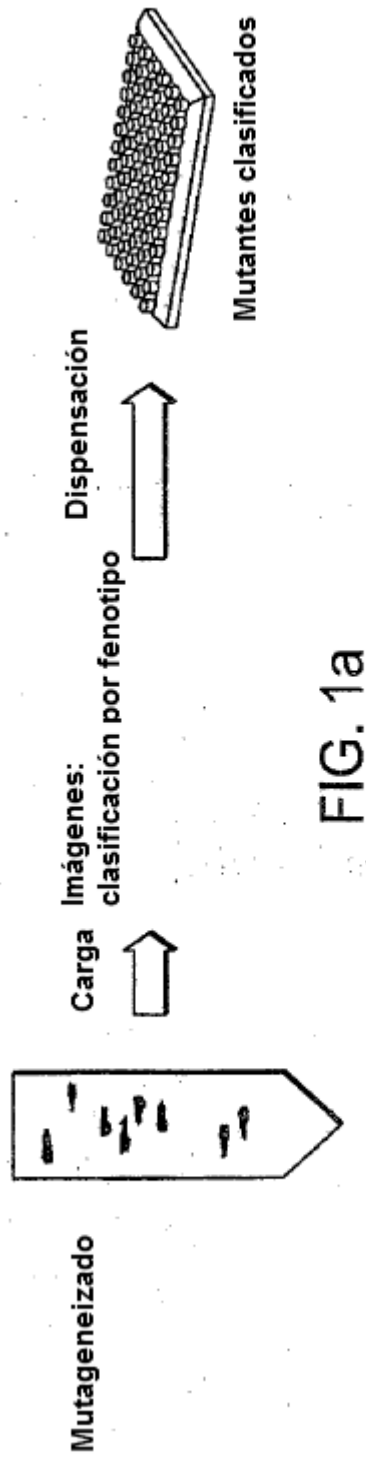
17. El sistema de la reivindicación 1, donde el sistema se utiliza para realizar cribados químicos.

18. Método para el cribado de alto rendimiento *in vivo*, que comprende:

- 60 proporcionar una fuente de un organismo de muestra en un medio líquido;
cargar automáticamente mediante una bomba de jeringa el organismo de muestra en el medio líquido en un tubo capilar de vidrio desde la fuente;
colocar automáticamente mediante una etapa de posición en 3 ejes el organismo de muestra en el tubo capilar de vidrio dentro del campo de visión de un aparato de formación de imágenes; y
- 65 rotar el organismo de muestra en el medio líquido en el tubo capilar de vidrio dentro del campo de visión, proporcionando de ese modo un cribado de resolución subcelular de alto contenido.

19. El método de la reivindicación 18 que incluye además la clasificación de los organismos de muestra en múltiples recipientes.
- 5 20. El método de la reivindicación 18, que incluye pasar los organismos de muestra a través del sistema múltiples veces.
21. El método de la reivindicación 18 que incluye además la exposición del organismo de muestra a un compuesto para visualizar los efectos agudos.
- 10 22. El método de la reivindicación 18 para recuento *in vivo* de alto rendimiento.
23. El método de la reivindicación 18 para la medición de cambios morfológicos en vivo.
- 15 24. El método de la reivindicación 18 para la medición de la morfología celular.
25. El método de la reivindicación 18 para la medición de la migración celular.
26. El método de la reivindicación 18 para la medición de las señales de Ca^{2+} .
- 20 27. El método de la reivindicación 18 utilizado para la manipulación óptica a resolución celular usando microablación láser.
28. El método de la reivindicación 18 utilizado para la fotoestimulación de canales iónicos.
- 25 29. El método de la reivindicación 18 utilizado para la fotoactivación o fotoinactivación de productos químicos y proteínas.
30. El método de la reivindicación 18 utilizado para cribados de regeneración de productos químicos que potencian la proliferación de células progenitoras.
- 30 31. El método de la reivindicación 18 utilizado para cribados tumorales para productos químicos inhibitorios dirigidos a la proliferación de células tumorigénicas *in vivo*.
32. El método de la reivindicación 18 utilizado para cribados de productos químicos protectores que reducen o detienen la muerte celular en los modelos de enfermedades degenerativas.
- 35 33. El método de la reivindicación 18 usado para los cribados de toxicidad.
34. El método de la reivindicación 18 usado para cribados genéticos y químicos sobre el desarrollo y la organogénesis.
- 40 35. El método de la reivindicación 18 de cribados sobre la morfología neuronal, tales como ramificación de las neuritas, el crecimiento, la conectividad, y la densidad de la columna vertebral.
- 45 36. El método de la reivindicación 18 usado para cribados sobre la migración de células madre.
37. El método de la reivindicación 18 usado para cribados sobre la función cardiovascular y la salud.
38. El método de la reivindicación 27 utilizado para cribados que potencian la regeneración de tejidos específicos después de la lesión precisa.
- 50 39. El método de la reivindicación 27 usado para cribados que compensan la función después de la ablación de células específicas.
- 55 40. El método de la reivindicación 18 usado para cribados sobre los linajes y diferenciación celular.
41. El sistema de acuerdo con la reivindicación 2, donde el teleosteo es pez cebra.
42. El sistema de la reivindicación 1, donde el organismo de muestra es transgénico.
- 60 43. Un sistema automático para cribados en vivo con larvas de vertebrados, que comprende:
 - una fuente de larvas de vertebrados en un medio líquido;
 - una bomba de jeringa automática para aspirar una larva en el medio líquido al interior de un tubo capilar de vidrio;
 - 65 una sección de detección automático del sistema posicionado alrededor del tubo capilar de vidrio para diferenciar

el paso de una larva de las burbujas y / o los desechos n el tubo capilar de vidrio; un aparato de formación de imágenes configurado para obtener la imagen de la larva en el tubo capilar de la clase; y un conjunto de motor de 3 ejes y capilar operable para girar el tubo capilar de vidrio, de modo que se gira la larva dentro del campo de visión del aparato de formación de imágenes.



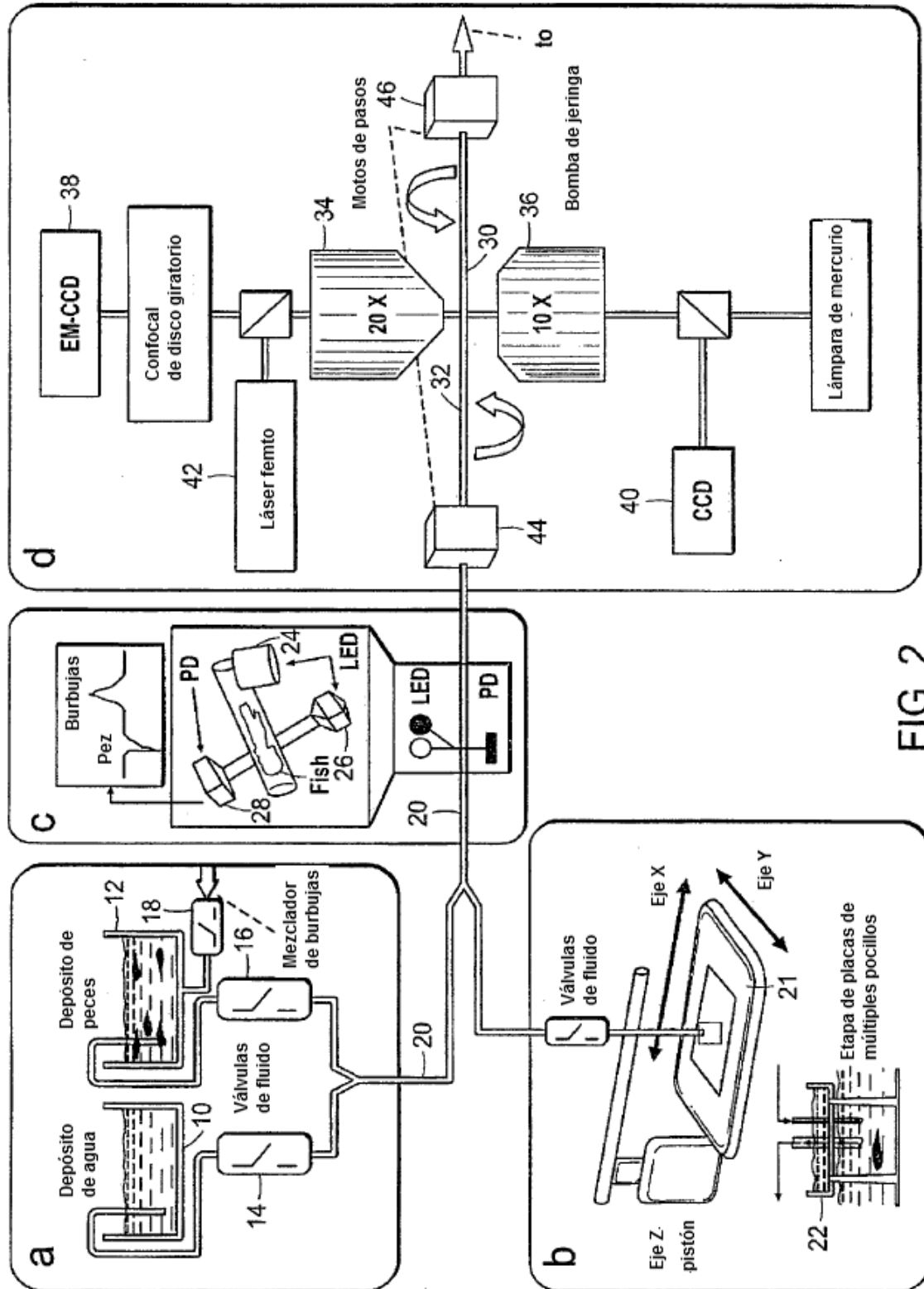


FIG. 2

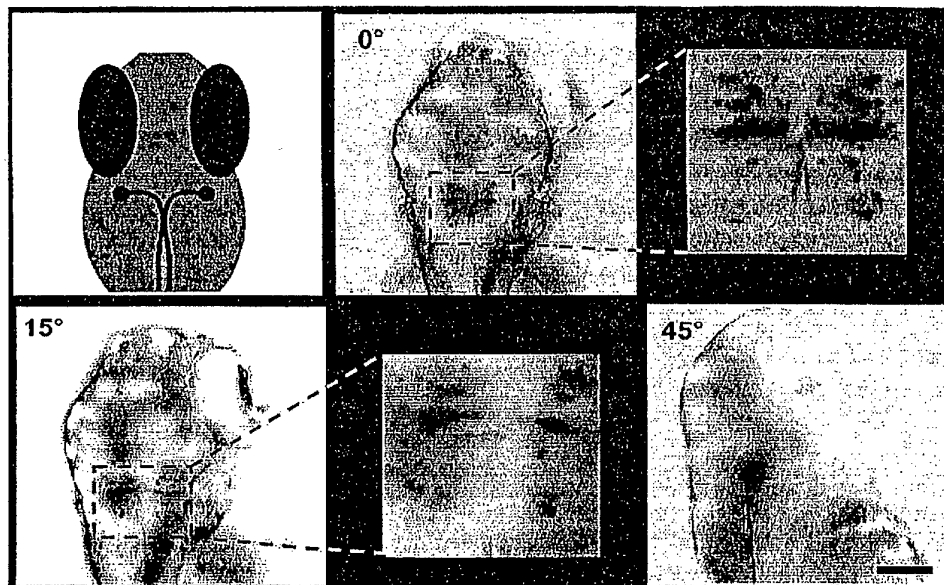


FIG. 3a

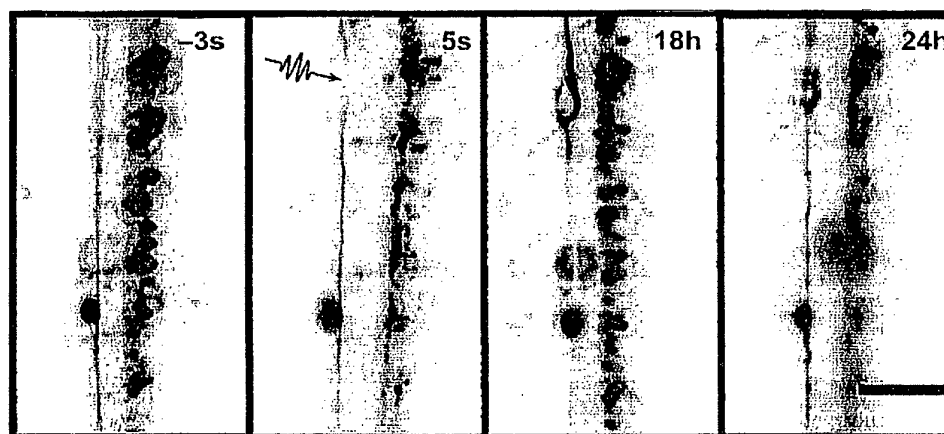


FIG. 3b

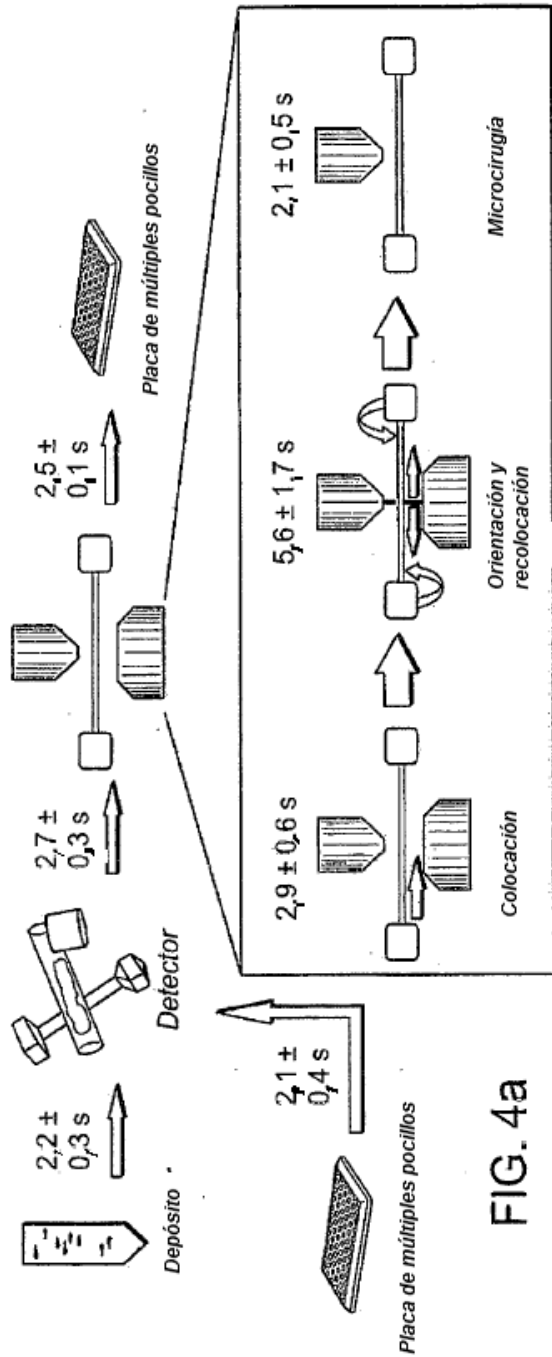


FIG. 4a

