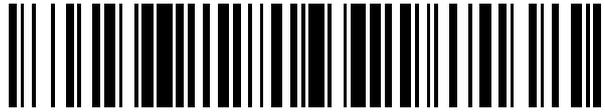


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 956**

21 Número de solicitud: 201731469

51 Int. Cl.:

A61B 18/18 (2006.01)

A61N 5/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.06.2019

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (75.0%)**

C/ Serrano, 117

28006 Madrid ES y

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (25.0%)

72 Inventor/es:

PRADA MARTÍNEZ, Francisco;

ESTEBAN GARCÍA, José Antonio;

SÁNCHEZ DEL RÍO, Justo y

GONZÁLEZ DE RIVERA PECES, Guillermo

74 Agente/Representante:

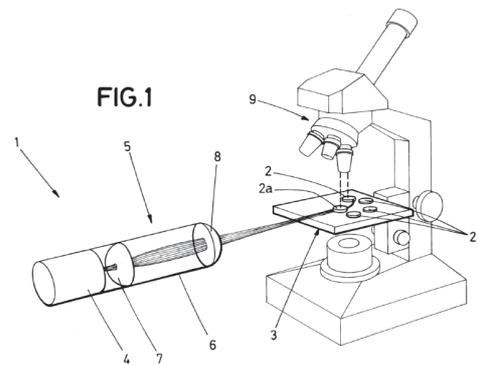
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **DISPOSITIVO PORTÁTIL NO INVASIVO, SISTEMA DE POSICIONAMIENTO, MICROSCOPIO Y MÉTODO PARA ACTIVAR INDIVIDUALMENTE CÉLULAS EN UN CULTIVO**

57 Resumen:

Dispositivo portátil no invasivo, sistema de posicionamiento, microscopio y método para activar individualmente células en un cultivo.

La presente invención describe en un primer aspecto un dispositivo portátil (1) no invasivo para la activación individual de células (2) que preferentemente se encuentran en un cultivo in vitro (3). En un segundo aspecto describe un sistema de posicionamiento del dispositivo portátil (1) del primer aspecto de la invención para posicionarlo de forma automática a una distancia, y a un ángulo de incidencia predeterminado con respecto las células (2). En un tercer aspecto describe un microscopio (9) y sistema de electrofisiología, y en un cuarto aspecto describe es un método no invasivo para activar individualmente células (2) en un cultivo mediante el dispositivo portátil (1) del primer aspecto de la invención.



ES 2 717 956 A1

DESCRIPCIÓN

**DISPOSITIVO PORTÁTIL NO INVASIVO, SISTEMA DE POSICIONAMIENTO,
MICROSCOPIO Y MÉTODO PARA ACTIVAR INDIVIDUALMENTE CÉLULAS EN UN
CULTIVO**

5

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se encuentra en el campo de la optogenética, concretamente en la activación por medio de haces de luz en unas células y detección de cambios producidos por dichos haces en las células.

15 El objeto de la presente invención es un dispositivo portátil no invasivo y un método para activar individualmente células y detectar cambios en el comportamiento de las mismas. Preferentemente, y de forma no limitativa, estas células se encuentra en un cultivo in vitro y son neuronas previamente modificadas genéticamente para ser sensibles a la luz.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Actualmente, es conocido que la plasticidad de los circuitos neuronales del cerebro constituye una base biológica para la memoria, y que esta puede ser alterada en múltiples desordenes cognitivos tal como alzheimer o autismo. También se conoce que la plasticidad sináptica es la habilidad de las neuronas para modificar sus conexiones sinápticas en respuesta a las acciones recibidas, a pesar de esto la mayoría de estudios sobre la
25 plasticidad sináptica están basados en medidas de cambios sinápticos a través de poblaciones de neuronas.

30 Esto es debido a que una de las limitaciones en el estudio de la función cerebral es la gran complejidad de las conexiones neuronales, y la velocidad con que se transmiten y procesan las señales eléctricas en los circuitos neuronales. De hecho, uno de los frentes más innovadores en la investigación en neurociencia es el desarrollo de nuevas tecnologías experimentales para la manipulación de neuronas individuales, mediante técnicas de optogenética.

La optogenética combina métodos genéticos y ópticos para controlar ciertas células, con precisión temporal en la escala del milisegundo. Más concretamente, la optogenética se basa en la introducción de genes exógenos en células para modificarlas y hacerlas sensibles a la luz, es decir permite modificar el comportamiento a nivel celular mediante la presencia o ausencia de luz.

Concretamente, se ha demostrado recientemente que se puede controlar la actividad de neuronas individuales por medio de canales iónicos sensibles a la luz, como es el caso de channelrhodopsin-2 (ChR2). Esta herramienta ha atraído un gran interés, tanto entre neurobiólogos como ingenieros, por su potencial para controlar la actividad neuronal de una forma no invasiva y con gran precisión temporal. Sin embargo, para desarrollar todo su potencial, es fundamental conseguir también una alta precisión espacial en el posicionamiento de los pulsos de luz.

Actualmente, se conocen sistemas para la evaluación de las condiciones neurológicas en cerebros, que incluyen evaluaciones a gran escala de la reorganización sináptica en el cerebro tanto en estados patológicos como en estados no patológicos.

Más concretamente, este sistema selecciona una primera y una segunda región del cerebro que tenga una relación sináptica entre ellas. A continuación se aplica un neurotransmisor que ha sido modificado químicamente para que permanezca inactivo (neurotransmisor “enjaulado” o “*caged neurotransmitter*”). Una de estas regiones del cerebro se activa con una energía electromagnética de una longitud de onda comprendida entre 338nm y 355nm, que actúa liberando el neurotransmisor previamente introducido (“*neurotransmitter uncaging*”). Simultáneamente se registra la respuesta de la otra región del cerebro, que indica conectividad sináptica funcional. Preferentemente, utiliza un láser UV que genera una luz durante 400-800 microsegundos, en forma de tren de pulsos pseudo aleatorios con 1s de intervalo.

Por otro lado, también es conocido un estimulador óptico insertable en un tejido biológico para obtener una señal neuronal mediante la estimulación de al menos una neurona con una luz. Este estimulador comprende una unidad principal con electrodos conectados con terminales eléctricos, una guía con diferentes capas electrocromáticas y una fuente de luz que proyecta una luz sobre dichas capas. Cada capa electrocromática está vinculada con un

terminal eléctrico y cuando se polarizan cambian la trayectoria de la luz. Adicionalmente, se describe que en optogenética es habitual el uso de tecnologías como fibra óptica, LED (light-emitting diode) u OLED (organic light-emitting diode), para emitir o transportar la luz.

5 Finalmente, existen sistemas de microscopía óptica con suficiente precisión espacial para hacer incidir haces de luz sobre células individuales. Estos sistemas típicamente emplean uno o varios láseres de barrido ("laser scanning microscopy"), que se dirige a un punto concreto por medio de dos microespejos que se mueven en direcciones perpendiculares, controlados por galvanómetros o dispositivos piezoeléctricos. Aunque estos sistemas
10 disponen de gran resolución espacial, están habitualmente integrados en equipamiento de gran tamaño dedicado en su totalidad a experimentos de microscopía. Es decir, la fuente de luz láser, la cabeza de barrido con los microespejos y el sistema de enfoque de la luz incidente constituyen un microscopio completo. Por tanto, no son sistemas versátiles para hacer incidir un haz de luz sobre una muestra biológica arbitraria, que puede encontrarse en
15 un dispositivo de electrofisiología, dentro de una cabina de cultivo estéril, o debajo de una lupa de disección, por poner algunos ejemplos. Por tanto no permiten su uso en combinación con equipamiento específico ya existente en un laboratorio de investigación o diagnóstico

20 De este modo, estos dispositivos, o métodos, o bien son invasivos o bien su precisión espacial en el posicionamiento de la luz no permite desarrollar todo su potencial dificultando la activación individual de células. Adicionalmente, estos dispositivos suelen encontrarse totalmente integrados en microscopios dedicados en su totalidad a realizar experimentos de optogenética. Debido a esto, estos microscopios requieren de mecanismos ópticos muy
25 complejos, que adicionalmente pueden llegar a interferir en la activación de las células debido a sus dimensiones.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30 Un primer aspecto de la invención es un dispositivo portátil no invasivo para la activación individual de células que preferentemente se encuentran en un cultivo que preferentemente es un cultivo in vitro.

Un segundo aspecto de la invención es un sistema de posicionamiento del dispositivo portátil

del primer aspecto de la invención para posicionarlo de forma automática a una distancia, y a un ángulo de incidencia predeterminado con respecto las células.

5 Un tercer aspecto de la invención es un microscopio y sistema de electrofisiología para adquirir señales eléctricas tal como amplificador, digitalizador y ordenador vinculables con el dispositivo portátil del primer aspecto de la invención, en donde el microscopio o el sistema de electrofisiología está destinado a recibir la respuesta, ya sea óptica o electrofisiológica de al menos una célula activada.

10 Un cuarto aspecto de la invención es un método no invasivo para activar individualmente células en un cultivo mediante el dispositivo portátil del primer aspecto de la invención.

Más concretamente, el dispositivo portátil no invasivo para la activación individual de células en un cultivo in vitro que comprende:

- 15
- un generador de luz susceptible de emitir una señal pulsada con una longitud de onda comprendida entre 400 nm y 500 nm y a una potencia óptica de salida comprendida entre 2 y 400 mW.
 - una guía con un primer extremo y un segundo extremo que en su interior comprende una fibra óptica destinada a transmitir dicha señal pulsada desde el generador hasta al
- 20 menos una única célula.

Más concretamente, el primer extremo de la guía está destinado a ser vinculado con el generador de luz y comprende una primera microlente emplazada entre la fibra óptica y el generador laser, estando dicha primera microlente destinada a concentrar la totalidad de la

25 señal pulsada generada por el generador para que sea transportada por la fibra óptica, y el segundo extremo de la guía está destinado a enfocar a la célula cuando el dispositivo portátil está en uso y comprende una segunda microlente de índice refractivo variable emplazada entre la fibra óptica y el cultivo, estando dicha segunda microlente destinada a focalizar la señal pulsada previamente transportada por la fibra óptica en la célula del cultivo manteniendo una

30 distancia entre 2 y 4 mm.

La señal pulsada comprende un tren de pulsos que es configurable en longitud de onda, potencia óptica, frecuencia de pulsación y ancho del pulso. La longitud de onda de la señal pulsada está comprendida en el espectro visible de la luz acorde con las propiedades

biolumínicas de las células y la potencia óptica es variable entre “no-excitación” (la cual nos dará la actividad basal de la célula en ausencia de estimulación) y la “saturación lumínica” de la célula (la cual nos dará la actividad máxima de la célula en condiciones saturantes de estimulación). Estos parámetros son clave para permitir hacer estudios de umbrales de estimulación y respuesta, es decir la mínima cantidad de luz, pulsada o no pulsada, que arranca el mecanismo de respuesta en la neurona. Este umbral depende de: la intensidad de la luz, la frecuencia y la anchura de los pulsos de luz aplicados a la neurona. La frecuencia de pulsación y el ancho del pulso de la señal pulsada permiten modificar la respuesta de las células, que son objeto de estudio.

Más concretamente el generador de luz permite variar la frecuencia desde una señal continua hasta una señal pulsada a una frecuencia de decenas de Hz, permitiendo seleccionar el ancho del pulso entre el 1% y el 100% del total. Además, se permite seleccionar la duración del tren de pulsos entre 1 segundo y 10 minutos. Estos parámetros son preestablecidos para el tipo de experimento concreto..

Mediante la configuración de la señal pulsada, es posible realizar estudios de persistencia o refresco según la potencia óptica, frecuencia y anchura del tren de pulsos que más le interese.

Preferentemente, la longitud de onda de la señal pulsada puede variar dentro de diferentes rangos que permitan la activación lumínica de la célula a activar. Habitualmente, esta activación lumínica es de un canal iónico sensible a la luz, como channelrhodopsin 2 y sus derivados (ChETA, ChEF, ChIEF, etc).

Más concretamente, la primera microlente es una lente cilíndrica que comprende una configuración susceptible de concentrar y enfocar la señal pulsada en la entrada de la fibra óptica. La segunda microlente es una lente GRIN o lente de índice de refracción variable emplazada a la salida de la fibra óptica para reenfocar la señal pulsada transmitida por la fibra óptica en un spot con perfil de sombrero y elíptico cuyo semieje mayor comprenda una anchura entre 50 y 200 μm , en donde el spot es proyectado de manera oblicua (entre 15° a 45°), siendo el resultado una señal pulsada con un área circular homogénea.

Preferentemente la fibra óptica presenta un diámetro comprendido entre 50 o 100 μm .

Más concretamente, la entrada de la fibra óptica se vincula con la primera microlente mediante un conector de fibra, y la salida de la fibra óptica se vincula con la segunda microlente mediante el segundo extremo de guía.

5 Este segundo extremo de la guía comprende una aguja hipodérmica que contiene la lente GRIN en la punta hipodérmica y que esta cementada interiormente a la fibra, en uso la punta de la aguja hipodérmica emite la luz inmersa en el medio acuoso del cultivo. Además, el segundo extremo comprende un cuerpo de mayor diámetro a modo de “mango” que permite manipular la posición de la aguja hipodérmica en un sistema de posicionamiento automático o
10 manual. El segundo extremo está vinculado herméticamente con la fibra óptica y puede ser hervida o desinfectada por cualquier método usual en laboratorio.

Por otro lado el sistema de posicionamiento automático del dispositivo portátil comprende medios mecánicos de posicionamiento para posicionar el segundo extremo de la guía con la
15 superficie acuosa del cultivo, a un ángulo comprendido entre 15 y 45° respecto a la superficie horizontal de la célula y a una distancia entre 2 y 4 mm de la misma.

Más concretamente, estos medios de posicionamiento son un sistema robótico de tres ejes, que permite apuntar la luz de la fibra óptica hacia la célula. Este sistema robótico se desplaza
20 en los ejes X, Y que perpendiculares a la guía y en el eje Z (o foco) que permite aproximar o alejar la guía de la célula sin llegar a tocarla.

Más concretamente, este sistema robótico está formado por 3 motores vinculados a 3 mecanismos desplazables, uno por cada eje (XYZ), en donde los motores son vinculables a
25 una unidad de control. Esta unidad de control comprende un microprocesador y una memoria de modo que puede registrar y recuperar las posiciones de las células con las que se quiere trabajar, permitiendo secuenciar o pasar de unas a otras, de manera rápida y segura, al tiempo que observamos respuesta de los electrodos instalados en el campo de neuronas.

30 Cabe destacar que, este dispositivo portátil es vinculable con cualquier tipo de microscopio que comprenda medios ópticos, acordes al tamaño de la célula que se esté activando, destinado a recibir la respuesta electrofisiológica de la célula que recibe la señal pulsada.

Preferentemente, el microscopio es un microscopio de luz polarizada y el sistema de

electrofisiología comprende al menos dos microelectrodos de cristal que son sensibles a los flujos iónicos producidos a través de la membrana de la célula cuando ésta es activada mediante el dispositivo portátil. Además, el sistema de electrofisiología cuenta con un amplificador, digitalizador y ordenador vinculables con el dispositivo portátil del primer aspecto de la invención, para tratar la señal eléctrica.

Preferentemente, los microelectrodos son de borosilicato con una impedancia de 4-6 MOhm y rellenos con una solución que contiene: 115 mM gluconato potásico, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 4 mM Na₂-ATP, 0.3 mM Na₃-GTP.

Alternativamente, la detección de la activación lumínica de las células puede realizarse directamente mediante el microscopio, para ello se utilizan técnicas de microscopía, tal como la detección en la imagen de calcio, es decir cuando una célula se activa, suben sus niveles de calcio, y hay indicadores de calcio fluorescentes que permitirían detectarlo con el mismo microscopio.

Finalmente, el método no invasivo para activar individualmente células en un cultivo y analizar las imágenes de células mediante el dispositivo portátil del primer aspecto de la invención comprende las siguientes etapas:

- colocar las células en el objetivo del microscopio,
- enfocar el segundo extremo de la guía hacia al menos una célula, a un ángulo comprendido entre 15 y 45° respecto a la superficie horizontal de la célula y a una distancia entre 2 y 4 mm,
- activar la célula mediante la señal pulsada, por el generador de luz, y
- analizar, mediante técnicas electrofisiológicas, la respuesta electrofisiológica de la célula captada por el microscopio.

El método comprende una etapa previa de preparar cultivo con células que prestan propiedades biolumínicas.

Preferentemente, esta etapa previa se realiza por técnicas de transfección, o infección, con vectores virales modificados para la introducción de un canal iónico sensible a la luz, como channelrhodopsin 2 y sus derivados (ChETA, ChEF, ChIEF, etc), o una bomba iónica para la

inactivación celular, como halorhodopsin y sus derivados (eNpHR2.0, eNpHR3.0, etc).

Como forma de evaluar la activación celular inducida por el haz de luz, el método comprende la adquisición y análisis de la respuesta electrofisiológica de la célula. Este método comprende el uso de microelectrodos de cristal susceptibles de contactar con la célula, que son sensibles a los flujos iónicos producidos a través de la membrana de la célula cuando ésta es activada. Estos flujos iónicos se convierten en una señal eléctrica por medio de electrodos de plata/cloruro de plata. La señal eléctrica es amplificada, filtrada y digitalizada por medio de un sistema electrónico del cual existen múltiples versiones comerciales.

La células pueden encontrarse in vitro o in vivo, aunque preferentemente se encuentran en un cultivo in vitro. Estas células preferentemente son neuronas.

De este modo se obtiene un dispositivo, un sistema y un método no invasivos que permiten activar ópticamente, sin llegar a tocar una única célula de un cultivo in vitro. Adicionalmente, el dispositivo portátil y el sistema son portables y adaptables a cualquier microscopio, permitiendo su transporte y adaptación a cualquier microscopio con una resolución adecuada.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra una vista esquemática del primer aspecto de la invención.

Figura 2.- Muestra un esquema de la activación de un cultivo con neuronas.

Figura 3.- Muestra dos gráficos, un primer gráfico de la respuesta de una primera neurona (CA3) activada mediante una señal pulsada y en un segundo la respuesta sináptica de una segunda neurona (CA1) relacionada con la primera neurona (CA3). En ambos gráficos el eje horizontal representa el tiempo en milisegundos y el eje vertical el potencial de la membrana de

la célula activada en milivoltios.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

5 Una realización preferente del primer aspecto de la invención es, tal y como se muestra en la figura 1, un dispositivo portátil (1) no invasivo para la activación individual de células (2) en un cultivo in vitro (3) que comprende:

- un generador de luz (4) susceptible de emitir una señal pulsada con una longitud de onda comprendida entre 400 nm y 500 nm y a una potencia comprendida entre 2 mW y 400 mW, y
- una guía (5) con un primer extremo y un segundo extremo que en su interior comprende una fibra óptica (6) destinada a transmitir dicha señal pulsada desde el generador de luz (4) hasta la superficie acuosa del cultivo in vitro (3).

15 Más concretamente, el primer extremo de la guía (5) está destinado a ser vinculado con el generador de luz (5) y comprende una primera microlente (7) emplazada entre la fibra óptica (6) y el generador de luz (4), estando dicha primera microlente (7) destinada a concentrar la totalidad de la señal pulsada generada por el generador de luz (4) para que sea transportada por la fibra óptica (6).

20 El segundo extremo de la guía (5) está destinado a ser vinculado con la superficie del cultivo in vitro (3), cuando el dispositivo portátil (1) está en uso, y comprende una segunda microlente (8) de índice refractivo variable cementada al final de la fibra óptica (6), estando dicha segunda microlente (8) destinada focalizar la señal pulsada previamente transportada por la fibra óptica (6) en al menos única célula (2a) del cultivo in vitro (3) manteniendo una distancia entre 2 y 4 mm entre la segunda microlente (8) y la única célula (2a).

25 Más concretamente, la primera microlente (7) es una lente cilíndrica con una apertura numérica comprendida entre 0,12 y 0,22 dependiendo del diámetro de la fibra óptica (6) para asegurar que la fibra óptica (6) recibe el máximo de la señal pulsada.

Se considera apertura numérica o AN como un número adimensional que define el rango de ángulos de entrada o salida de luz en el que acepta o emite un sistema óptico. $AN=n \sin(\theta)$, donde n es el índice de refracción del medio, y θ es el semi-ángulo de entrada o salida del cono

de luz al sistema óptico.

Más concretamente, esta lente cilíndrica presenta un cuerpo cilíndrico en donde ambas caras son curvas y comprenden un diámetro de 2 mm y un largo de 5 mm.

5

La segunda microlente (8) es una microlente cilíndrica de índice de refracción variable, con ambas caras planas, en donde una de sus caras es perpendicular al eje de guía (5) y está cementada a la fibra óptica (6), mientras que la cara opuesta es biselada respecto al eje de la guía (5), de modo que la luz pulsada transmitida por la fibra óptica (6) es proyectada por la segunda microlente (8) en forma de spot elíptico con perfil de sombrero con un diámetro comprendido entre 50 y 200 μm enfocando a una distancia entre 2 y 4 mm de la única célula (2a).

10

Adicionalmente, al estar sumergida en un medio acuso del cultivo in vitro (3) a la salida de la segunda microlente (8) la luz pulsada es magnificada hasta 3.5 veces a una distancia de 4mm.

15

Más concretamente, la guía (5) comprende un cuerpo tubular de diámetro de 0,5 mm para la manipulación de la misma.

20

EJEMPLO DE EXPERIMENTO

- etapa previa de preparar cultivo in vitro (3) con células (2) que prestan propiedades biolumínicas, consiste en:

25

Decapitar rápidamente crías de rata Wistar de 5-7 días de edad postnatal, extraer el cerebro y sumergirlo en una solución fría (4 °C) compuesta de: 230 mM sacarosa, 10 mM D-glucosa, 26 mM NaHCO_3 , 4 mM KCl, 5 mM MgCl_2 y 1 mM CaCl_2 , equilibrado por burbujeo con una mezcla gaseosa de 95% O_2 y 5% CO_2 . A continuación se disecciona el hipocampo y se corta en secciones de 400 μm de grosor. Estas secciones se colocan sobre membranas de cultivo Millipore (número de catálogo PICM0RG50) y se mantienen por un período de tiempo variable (1-4 semanas) con un medio de cultivo que contiene MEM (Sigma, número de catálogo 4642), 20% suero de caballo, 1 mM L-glutamina, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgSO_4 , 1 mg/L insulina, 0.0012% ascorbato sódico, 30 mM HEPES, 13 mM D-glucosa, 5.2 mM NaHCO_3 , a pH 7.2 y osmolaridad de 320 mOsm. Dos días antes del experimento de iluminación, la región CA3 de las secciones

30

se infecta con un lentivirus modificado genéticamente para la expresión de la proteína channelrhodopsin fusionada a la proteína de fluorescencia roja mCherry.

- colocar las células (2) bajo el objetivo de un microscopio (9) consiste en:

5

Al cabo de dos días de infección con el virus para la expresión de channelrhodopsin-mCherry, una de las secciones de hipocampo se transfiere a la cámara de registro, o objetivo, de un microscopio (9) de electrofisiología, donde se mantiene bajo perfusión con una solución que contiene: 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glucosa, 26 mM NaHCO₃, 4 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂, equilibrado por burbujeo con una mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂.

10

Adicionalmente, se posicionan, sobre las células (2), dos microelectrodos de borosilicato con una impedancia de 4-6 MOhm, y rellenos con una solución que contiene: 115 mM gluconato potásico, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 4 mM Na₂-ATP, 0.3 mM Na₃-GTP.

15

- activar la única célula (2a) mediante la señal pulsada, tal y como se muestra esquemática en la figura 2, producida por el generador de luz, consiste en:

20

Por medio de una lámpara de mercurio del microscopio (9), se localizan las neuronas de la región CA3 que contienen fluorescencia roja.

25

A continuación se activa mediante, la señal pulsada preferentemente a 1 Hz con una longitud de onda comprendida entre 400 nm y 460 nm a una potencia de entre 100 y 200 mW, una neurona individual de la región CA3 de la sección con el dispositivo portátil (1) mencionado en el aspecto 1 de la invención. En este experimento, la luz pulsada consiste en un pulso de 2 ms durante 5 minutos. Este pulso da lugar a la activación de la neurona directamente iluminada, que se registra como un potencial de acción (representado como Erec1) y cuya respuesta de la única célula (2a) o neurona CA3 se representa en el primer gráfico de la figura 3.. La activación de esta neurona CA3 da lugar a la generación de una respuesta sináptica en la neurona CA1 (representado como Erec2 en la figura 2), que no es estimulada con el haz de luz. La respuesta de dicha neurona CA1 esta representa en el segundo gráfico la Figura 3, (titulado CA1 neurona. La aparición de esta respuesta sináptica demuestra que las neuronas individuales en CA3 y CA1 están conectadas de forma sináptica.

30

- analizar, mediante técnicas electrofisiológicas, la respuesta de la única célula (2a) captada por el microscopio (9), consiste en:

5 utilizar los electrodos de borosilicato, para registrar de forma simultánea el potencial de membrana de una de estas neuronas (Erec1, en el esquema) y de una neurona de la región CA1 (Erec2, en el esquema), que no contiene la proteína channelrhodopsin.

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo portátil (1) no invasivo para la activación individual de al menos una única célula (2a) comprendida en un cultivo de células (2) o en un tejido, que comprende:

- 5
- un generador de luz (4) susceptible de emitir una señal pulsada con una longitud de onda comprendida entre 400 nm y 500 nm y a una potencia comprendida entre 2 y 400 mW, y
 - una guía (5) con un primer extremo y un segundo extremo que en su interior comprende una fibra óptica (6) destinada a transmitir dicha señal pulsada desde el
- 10

en donde el dispositivo portátil (1) está caracterizado por que:

- el primer extremo de la guía (5) está destinado a ser vinculado con el generador de luz (4) y comprende una primera microlente (7) emplazada entre la fibra óptica (6) y el generador laser, estando dicha primera microlente (7) destinada a concentrar la
- 15
- totalidad de la señal pulsada generada por el generador para que sea transportada por la fibra óptica (6), y
- el segundo extremo de la guía (5) está destinado a ser vinculado con la superficie del cultivo cuando el dispositivo portátil (1) está en uso y comprende una segunda microlente (8) de índice refractivo variable emplazada entre la fibra óptica (6) y el
- 20
- cultivo, estando dicha segunda microlente (8) destinada a focalizar la señal pulsada previamente transportada por la fibra óptica (6) en al menos la única célula (2a) manteniendo una distancia entre 2 y 4 mm.

2.- Dispositivo portátil (1) no invasivo según la reivindicación 1, caracterizado por que la señal pulsada comprende una longitud de onda entre 400 y 460 nm a una potencia óptica

25

comprendida entre 100 y 200 mW que es pulsada formando un tren de pulsos de una duración entre 10 y 20 ms, repetidos durante un rango temporal comprendido entre 1 s y 10 min, y a una frecuencia comprendida entre 1 y 10 Hz.

3.- Dispositivo portátil (1) no invasivo según la reivindicación 2, caracterizado por la señal pulsada forma un tren de pulsos de una duración de 2 ms, repetidos durante 5 min, y a una

30

frecuencia de 1 Hz.

4.- Dispositivo portátil (1) no invasivo según la reivindicación 1, caracterizado por que la primera microlente (7) comprende una configuración susceptible de concentrar y enfocar la señal pulsada en la entrada de la fibra óptica (6).

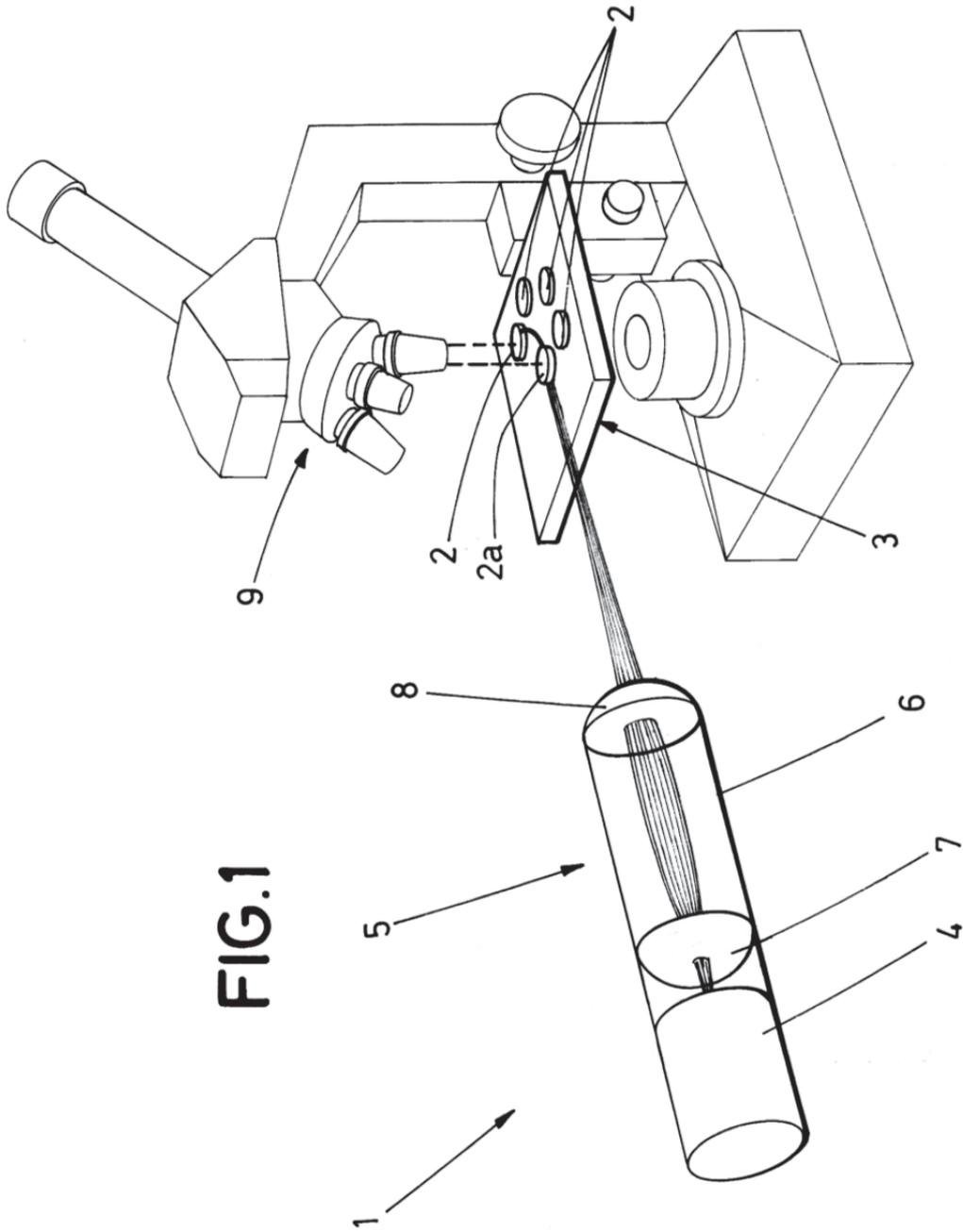
5 5.- Dispositivo portátil (1) no invasivo según la reivindicación 1, caracterizado por que la segunda microlente (8) comprende una lente GRIN, o lente de índice de refracción variable, emplazada a la salida de la fibra óptica (6) para reenfocar la señal pulsada transmitida por la fibra óptica (6) en un spot con perfil de sombrero y elíptico cuyo semieje mayor comprenda una anchura entre 50 y 200 μm , en donde el spot es proyectado de manera oblicua, siendo el
10 resultado una señal pulsada con un área circular homogénea.

6.- Método no invasivo para activar individualmente células (2) en un cultivo mediante el dispositivo portátil (1) descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y analizarlas mediante un microscopio (9) y sistema de electrofisiología, caracterizado por que el método
15 comprende las siguientes etapas:

- colocar las células (2) bajo el objetivo del microscopio (9),
- enfocar el segundo extremo de la guía (5) hacia al menos una única célula (2a), a un ángulo comprendido entre 15 y 45° respecto a la superficie horizontal de la célula (2a) y a una distancia entre 2 y 4 mm,
- activar mediante la señal pulsada, generada por el generador de luz (4), la célula (2a), y
20
- analizar, mediante técnicas electrofisiológicas, la respuesta electrofisiológica de las células (2), captada por el microscopio (9).

7.- Método no invasivo según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende una etapa
25 previa de preparar el cultivo celular por métodos de transferencia genética para prestar propiedades biolumínicas a las células (2).

8.- Método no invasivo, según la reivindicación 6 caracterizado por que la etapa de analizar la respuesta electrofisiológica comprende la detección y la medida de los cambios en el potencial
30 de membrana de la neurona debidos a la activación de la única célula (2) por el haz de luz.



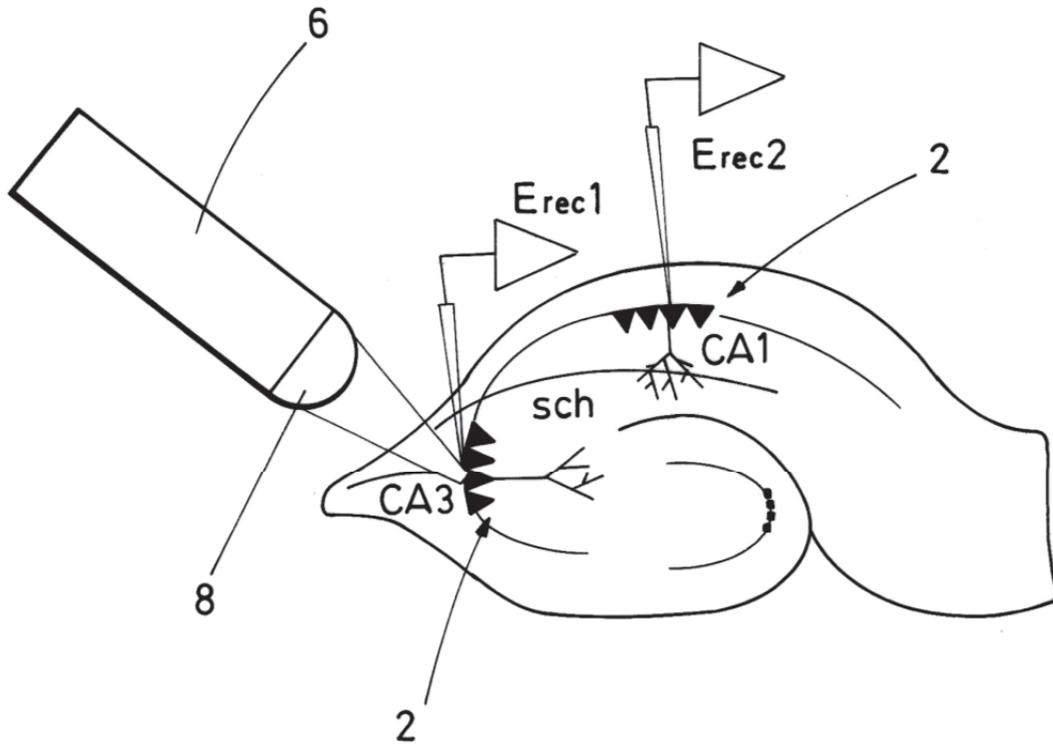


FIG.2

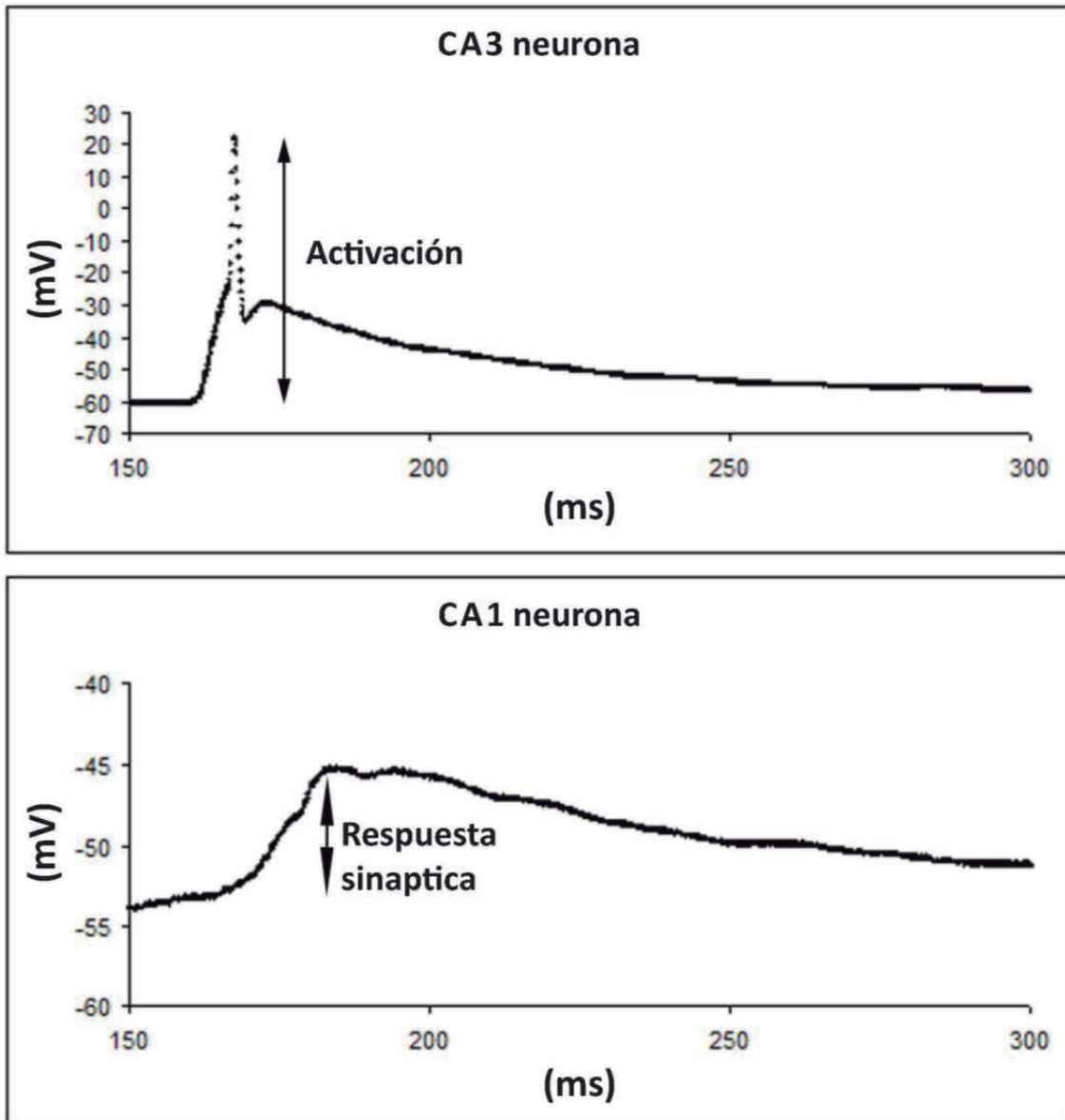


FIG.3



21 N.º solicitud: 201731469

22 Fecha de presentación de la solicitud: 26.12.2017

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A61B18/18** (2006.01)
A61N5/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004069326 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 19/08/2004, Resumen; párrafos [0007], [0029]-[0035], [0037], [0040], [0044]; figuras 1-2C.	1, 4
A		2, 6-8
X	US 20130030274 A1 (JAMIESON, B. et al.) 31/01/2013, Resumen; párrafos [0012], [0015]-[0016], [0029], [0031]-[0032], [0040], [0042]-[0045]; Figuras 4-7B.	1, 6-8
A	US 20120136416 A1 (SABATINI, B. et al.) 31/05/2012, Resumen; párrafos [0016]-[0017], [0019], [0024]-[0025], [0075]-[0076].	1-4, 6-8
A	US 20100234837 A1 (ALFANO, R.) 16/09/2010, Resumen; párrafos [0025]-[0028], [0037]-[0039], [0042]-[0043], [0046]-[0047]; figura 4.	1, 2, 6
A	AU 2014206165 A (UNIV. COLUMBIA) 14/08/2014, Todo el documento.	1-8
A	WO 2017079688 A1 (INSCOPIX, INC.) 11/05/2017, Resumen; párrafos [0003]-[0025]; figuras.	1, 6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.11.2018

Examinador
Ó. González Peñalba

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61B, A61N, G02B, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INSPEC