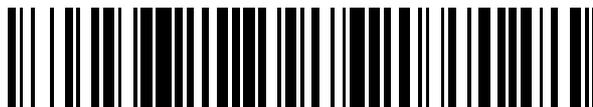


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 350 072**

21 Número de solicitud: 200901192

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/18**

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **04.05.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2011**

Fecha de la concesión: **16.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **28.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**28.11.2011**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITAT DE VALENCIA  
AVDA. BLASCO IBAÑEZ, 13  
46010 VALENCIA, ES**

72 Inventor/es:  
**HERRERA MARTIN, GUADALUPE y  
O'CONNOR BLASCO, JOSE ENRIQUE**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **METODO Y KIT DE ENSAYO IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON SUSTANCIAS SOBRE CULTIVOS CELULARES**

57 Resumen:

Método y kit de ensayo in vitro para el estudio de los efectos del tratamiento crónico con sustancias sobre cultivos celulares. En la presente invención se describe un método y un kit de ensayo in vitro, para el estudio de los efectos del tratamiento crónico con sustancias de origen natural o sintéticos, sobre cultivos celulares. El ensayo de la invención consiste en la exposición ininterrumpida por tiempo igual o superior a 72 horas, a los compuestos de estudio o a controles adecuados, de cultivos celulares de relevancia, crecidos en un contenedor hermético. Los efectos de las sustancias en estudio son monitorizados in situ mediante microscopía óptica o de fluorescencia y cuantificados, al final del período de estudio, mediante citometría de flujo, que permite la determinación del tipo de muerte celular y, en células vivas, la cuantificación de metabolitos celulares, así como de diferentes funciones celulares de relevancia.

ES 2 350 072 B1

## DESCRIPCIÓN

Método y kit de ensayo *in vitro* para el estudio de los efectos del tratamiento crónico con sustancias sobre cultivos celulares.

5

### Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un método y un kit de ensayo *in vitro* para el estudio del tratamiento crónico con sustancias de origen natural o sintético y de su efecto sobre cultivos celulares. Por lo tanto, la presente invención puede englobarse dentro del campo de la toxicología, industria farmacéutica, química, cosmética o biotecnología.

10

### Estado de la técnica

Los estudios de toxicidad constituyen hoy día una parte muy importante dentro del desarrollo de nuevos fármacos y se extienden prácticamente a lo largo de todo el proceso de desarrollo del nuevo fármaco. El objetivo de dichos estudios es “evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas”. Y no se limitan sólo a los fármacos sino que la mayor parte de las sustancias químicas industriales (pesticidas, agroquímicos, cosméticos, plásticos, etc.) son objeto de estudios de toxicidad iguales o más complejos que los realizados con los nuevos fármacos. Podría definirse la toxicidad como el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes químicos o físicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos y la aplicación de estos estudios para la evaluación de la seguridad y la prevención de daños al hombre y a las formas de vida útiles. El término cualitativo se refiere al tipo de órgano diana afectado, en comparación con otras sustancias conocidas, mientras que el término cuantitativo se refiere a la relación dosis-respuesta.

15

La toxicidad aguda de un candidato a fármaco, o de cualquier otro tipo de molécula a la que pueda resultar expuesto un organismo, suele ser fácilmente detectable *in vitro*. Por el contrario, la toxicidad crónica, o sostenida, resulta más difícil de predecir y, sin embargo, su detección es un aspecto importante de la investigación preclínica (conjunto de estudios de laboratorio: físico-químicos, toxicológicos y farmacológicos) (1-3). Los procedimientos normativos (FDA -“Administración de alimentos y fármacos”; OCDE-“Organización para la cooperación y el Desarrollo Económico”; etc.) para la aceptación y futura puesta en el mercado del posible fármaco, implican la administración repetida de dicho futuro fármaco a dos especies animales (roedor y no roedor) durante un período de al menos tres meses, mientras que el análisis de carcinogenicidad implica la administración del futuro fármaco durante toda la vida del animal (4). Este tipo de ensayos *in vivo* requiere el sacrificio y el control estricto de un gran número de animales de experimentación (con las implicaciones éticas y económicas que ello conlleva), consumen mucho tiempo y no siempre son predictivos de la toxicidad de dichos compuestos en la especie humana.

20

25

A pesar de los significativos esfuerzos en los últimos años para desarrollar ensayos fiables órgano-específicos *in vitro*, entre los que destacan los órganos aislados perfundidos, los cortes de órganos y los cultivos celulares primarios y permanentes (5), la disponibilidad de tests fiables para la predicción de la toxicidad crónica todavía es muy limitada. Por ello, se precisan con urgencia modelos *in vitro*, perfectamente estandarizados, para la evaluación de la toxicidad crónica y sub-crónica de fármacos y xenobióticos (compuestos externos a un organismo vivo que interactúan con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas).

30

Una de las razones que dificultan el desarrollo de modelos *in vitro* de toxicidad crónica es la inherente limitación temporal de la exposición al agente tóxico en la mayor parte de los sistemas celulares *in vitro* convencionales disponibles, como consecuencia de la elevada tasa de crecimiento de los mismos (líneas celulares establecidas) o la dificultad de mantener una fase de confluencia estática y estable durante muchos días (líneas celulares y cultivos primarios). En el pasado se ha intentado obviar esta dificultad del diseño de los modelos celulares mediante diferentes tipos fundamentales de estrategia experimental (1-3):

45

50

a) Uso de biorreactores, técnicamente complejos y de elevado coste económico. En concreto, se han evaluado dos tipos de biorreactor: un biorreactor de flujo, basado en tecnología de fibra hueca (Technomouse) y un biorreactor estático, basado en membranas semipermeables (CELLLine CL-6), aunque sólo el biorreactor estático permitía un uso eficiente para desarrollar estudios de citotoxicidad crónica (6).

55

b) Uso de sistemas convencionales de cultivo estático en los que las sustancias en estudio crónico se deben de añadir repetidamente, tras proceder a cambios periódicos de los medios de cultivo o al subcultivo de las células. En muchos casos, los cultivos se realizan en condiciones complejas, con la creación de matrices tridimensionales, adición de materiales complejos de soporte, artificiales o biológicos, que pueden contener impurezas en forma de factores de crecimiento o sustancias no definidas.

60

c) Uso de cultivos no estáticos, como los cultivos en rotación o en perfusión, en los que se somete a las células a estrés mecánico (cultivos en rotación o agitación) o que requieren grandes cantidades de medio de cultivo, células y reactivos (cultivos en perfusión), complican el control metabólico, y limitan su aplicabilidad a estudios extensos, por ejemplo, de cribado (1-3).

65

d) Determinación de parámetros tempranos de lesión celular *in vitro* como predictores de toxicidad crónica en el organismo vivo. Esta estrategia se centra principalmente en el estudio específico de los fenómenos tóxicos hepáticos y renales, por la importancia intrínseca de estos tejidos como diana y moduladores de la toxicidad de numerosas sustancias tóxicas y xenobióticos.

5

De acuerdo a los comentarios anteriores, y en el contexto del análisis toxicológico que pudiéramos denominar “de alto rendimiento”, es decir dirigido a evaluar los efectos sostenidos de una gran cantidad de productos químicos, como requiere la futura normativa europea (7) o de moléculas candidatas en farmacología, resulta evidente el interés de disponer de modelos celulares de toxicidad crónica o sostenida que sean sensibles, sencillos, reproducibles, aplicables a diversos modelos celulares (cultivos primarios y líneas celulares establecidas) y de bajo coste económico. Este propósito, se debería alcanzar a través de:

10

a) La disponibilidad de sistemas alternativos de cultivo celular que permitan prolongadas exposiciones a un xenobiótico de la misma población celular en fase quiescente

15

b) La disponibilidad de procedimientos analíticos que permitan detectar de forma sensible y multiparamétrica alteraciones celulares y moleculares inducidas por la exposición sostenida a agentes tóxicos. Idealmente, tales métodos deberían proporcionar capacidad de resolución temporal (es decir, poder distinguir fenómenos tempranos, transitorios y tardíos), resolución poblacional (es decir, poder detectar fenómenos que afecten a subpoblaciones minoritarias dentro de una población mayoritariamente no afectada y caracterizar el fenotipo de las poblaciones sensibles o resistentes) y resolución mecanística (es decir, identificar o sugerir las posibles dianas moleculares de la acción tóxica de los xenobióticos).

20

En este sentido, la citómica, o citometría de sistemas complejos, es una disciplina que se orienta a la investigación molecular en células individuales y que permite acceder a múltiples características bioquímicas de los sistemas celulares heterogéneos (<http://www.uv.es/cytomics>). La capacidad única de estudiar de esta forma sistemas celulares complejos, en condiciones similares a su situación fisiológica o patológica *in vivo*, ha conducido al desarrollo del concepto de medicina predictiva basada en la Citómica (8-10). La información sobre el futuro desarrollo de una enfermedad en un paciente individual supone una importante adición al concepto actual de evaluación pronóstica de una enfermedad basada en la estadística, cuya representación más conocida son las curvas de Kaplan-Meier y que suele ser insuficiente para establecer un patrón terapéutico individual. Es evidente que la extrapolación de la capacidad predictiva de la citómica al campo de la investigación de los efectos celulares de fármacos y xenobióticos, incluyendo la predicción de toxicidad, es, cuando menos, muy sugerente.

25

El progreso de la Citómica ha sido posible por la evolución de las tecnologías de análisis celular individual, fundamentalmente la citometría de flujo y la microscopía confocal y de barrido láser (11-13). La aplicación de las técnicas citómicas puede generar matrices de datos de alto contenido. La citometría de flujo permite, por ejemplo, realizar múltiples protocolos de mapeo fluorescente multicolor en diferentes poblaciones celulares. Los sistemas modernos de microscopía, con la capacidad de relocalización de células individuales favorecen estos procesos de tinción secuencial múltiple. Estas nuevas aproximaciones de alto contenido están provocando que las formas tradicionales de visualizar y cuantificar la información en microscopía y citometría de flujo sean reemplazadas por sistemas algorítmicos, automatizados, estandarizables y expertos de recolección, análisis e interpretación de datos. Sí a tal complejidad analítica se añade la implementación de sistemas de alta velocidad de adquisición de datos, capaces de adaptarse a la problemática del screening de alto rendimiento, esencial en el área de la industria farmacéutica y verosíblemente requerida en el área de la detección de toxicidad, se puede suponer el beneficio de la aplicación de las estrategias citómicas en los procesos de investigación, desarrollo y evaluación de medicamentos (11). La citometría de flujo multiparamétrica (o citómica) está entre las disciplinas analíticas potencialmente más poderosa para el estudio de los efectos biológicos inducidos por fármacos y xenobióticos en células diana o, en general, en poblaciones celulares susceptibles. La sensibilidad y la capacidad de resolución temporal de la citómica, junto con el elevado número de parámetros moleculares accesibles a ella, proporcionan una visión integradora de la función celular (análisis de alto contenido). Por otra parte, la elevada velocidad de análisis y la existencia de sistemas citómicos automáticos y autoestandarizables están introduciendo esta tecnología entre los sistemas analíticos de alto rendimiento.

30

La presente invención resuelve el problema del estudio de los efectos de la exposición crónica (hasta varias semanas) de compuestos químicos, farmacéuticos o biológicos sobre cultivos celulares *in vitro*, sin necesidad de subcultivar las células, mediante el método de la presente invención. Este método se basa en un método alternativo que mejora el valor predictivo de los ensayos celulares de toxicidad *in vitro*, mediante el uso de nuevos sistemas ventajosos de cultivos celulares (que proporcionen un modelo de supervivencia celular prolongada que extienda el período útil de exposición a xenobióticos) en contenedores herméticos. En la invención se describe además, la aplicación de desarrollos tecnológicos y estrategias analíticas novedosas para investigar las alteraciones tempranas y tardías inducidas por la exposición de cultivos *in vitro* crónica a agentes relevantes, que como hemos mencionado anteriormente pueden ser compuestos químicos, farmacéuticos, biológicos, etc. La presente invención proporciona un método alternativo de detección de toxicidad crónica basado en la citómica que permiten detectar de forma sensible y multiparamétrica alteraciones celulares y moleculares inducidas por la exposición sostenida a agentes tóxicos, así como un kit para llevar a cabo dicho método. Tales métodos proporcionan capacidad de resolución temporal (distinguen fenómenos tempranos, transitorios y tardíos), resolución poblacional (detectan fenómenos que afecten a subpoblaciones minori-

35

tarias dentro de una población mayoritariamente no afectada y caracterizan el fenotipo de las poblaciones sensibles o resistentes) y resolución mecanística (identifican o sugieren las posibles dianas moleculares de la acción tóxica de los xenobióticos).

5 La invención es de fácil uso y bajo coste, permite llevar a cabo un gran número de experimentos y en un gran rango de concentraciones ensayadas. Aunque la invención inicialmente se dirige a evaluar los efectos tóxicos de las sustancias de análisis mediante análisis de fluorescencia, otros procesos biológicos pueden ser fácilmente determinados, como por ejemplo, unión de ligandos, efectos sobre el ciclo celular, expresión de genes reporteros, etc. En general, la invención aporta las ventajas que se requieren, por los expertos en toxicología, de un ensayo *in vitro* de toxicidad crónica (14).

## Descripción de la invención

### Breve descripción de la invención

15 La invención proporciona un nuevo método de ensayo *in vitro*, así como el kit para llevarlo a cabo, para el estudio de los efectos del tratamiento crónico con compuestos tóxicos de origen natural o sintético u otras sustancias, sobre cultivos celulares, sin necesidad de subcultivar las células. El método de la invención consiste en la exposición ininterrumpida de los cultivos celulares durante un tiempo mínimo de 72 horas, a los compuestos de estudio o a controles adecuados, siendo dichos cultivos celulares crecidos en un contenedor hermético (PetakaG2™ de Celartia, o un contenedor de características similares). Los efectos de las sustancias tóxicas en estudio son monitorizados *in situ* mediante microscopía óptica o de fluorescencia y cuantificados, al final del período de estudio, mediante una batería de ensayos de citometría de flujo, que permiten la determinación de muerte celular (por apoptosis o necrosis) y, selectivamente en células vivas, la cuantificación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, los potenciales de membrana mitocondrial y plasmática, los niveles intracelulares de lípidos polares y apolares, los peróxidos intracelulares, la generación mitocondrial de superóxido, daño oxidativo al DNA nuclear y mitocondrial, unión de ligandos, efectos sobre el ciclo celular, expresión de genes reporteros, etc.

30 La invención puede ser utilizada para estudiar *in vitro* los efectos de la exposición crónica de cultivos celulares a productos químicos, fármacos, xenobióticos, etc, pero también puede ser aplicada a evaluar los efectos del tratamiento crónico con diferentes sustancias líquidas o gaseosas, incluyendo contaminantes medioambientales, componentes de cosméticos, nanomateriales y moléculas biológicas.

35 La invención proporciona una herramienta simple y barata para evaluar los efectos tóxicos del tratamiento crónico sobre cultivos celulares de agentes xenobióticos y de otras condiciones experimentales, mediante la aplicación de los ensayos citométricos más sensibles y reproducibles, permite la detección, cuantificación y análisis mecanístico de los fenómenos de toxicidad o no toxicidad, identificando las dianas moleculares de la acción tóxica o no tóxica de los agentes utilizados.

40 A efectos de la presente invención, se hacen constar los siguientes términos:

- Concentración óptima: es aquella concentración de cualquier sustancia, molécula, tóxico, etc., con la que se consigue el mayor efecto deseado por dicha sustancia, molécula, tóxico, etc.

45 - Tratamiento crónico: exposición ininterrumpida de un cultivo celular a una sustancia, molécula, tóxico, etc., por un tiempo mínimo de 72 horas y con un límite superior que dependerá del tipo celular en consideración y de las condiciones experimentales del estudio.

50 - Monocapa de alta confluencia: son cultivos celulares que crecen en una única capa espacial y que llegan a obtener una confluencia de aproximadamente el 80-90%, es decir, que las células que forman dicha monocapa se mantienen en contacto entre sí y cubren aproximadamente el 80-90% de la superficie del contenedor apta para el cultivo.

55 - Fluorocromos: sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando captan (son excitados) por un fotón incidente de una longitud de onda característica. En la presente invención se define fluorocromo como toda aquella molécula fluorescente capaz de ser medida y cuantificada mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

### Descripción de las figuras

60 Figura 1. Efecto de la exposición crónica a Cl<sub>2</sub>Cd sobre la morfología de cultivos celulares de la línea SH-SY5Y cultivados en contenedores herméticos. Los cultivos de la línea celular SH-SY5Y tratados con Cl<sub>2</sub>Cd o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 7 días y 27 días de exposición. La morfología se ha examinado por microscopía óptica de contraste de fases. (A) Fotografía de los cultivos de la línea celular SH-SY5Y crecida en presencia de medio de cultivo sólo (control). (B) Fotografía de los cultivos de la línea celular SH-SY5Y crecida en presencia de Cl<sub>2</sub>Cd a una concentración de 2x10<sup>-7</sup> M durante 7 días. (C) Fotografía de los cultivos de la línea celular SH-SY5Y crecida en presencia de Cl<sub>2</sub>Cd a una concentración de 2x10<sup>-7</sup> M durante 27 días.

Figura 2. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  sobre la viabilidad de cultivos celulares mantenidos en contenedores herméticos.* Los cultivos celulares se trataron con  $Cl_2Cd$  a diferentes concentraciones o medio de cultivo solo (control) y se han analizado tras 7 días y 27 días de exposición para la línea celular SH-SY5Y (A) o tras 6 días y 18 días de exposición para la línea celular A704 (B). La viabilidad se ha determinado por citometría de flujo usando Yoduro de Propidio (IP) como marcador de células muertas. La línea continua representa la viabilidad celular durante la exposición de 7 o 6 días respectivamente y la línea discontinua representa la viabilidad celular durante la exposición de 27 o 17 días respectivamente. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de supervivencia y en el eje de abscisas se representan las concentraciones de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Los resultados son la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes.

Figura 3. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  de la línea celular A-704 cultivada en contenedores herméticos sobre la generación mitocondrial de superóxido.* Los cultivos de A-704 tratados con  $Cl_2Cd$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 6 y 18 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo MitoSox. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $Cl_2Cd$  durante 6 días y las barras negras la exposición durante 18 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

Figura 4. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  de la línea celular SH-SY5Y cultivada en contenedores herméticos sobre la generación mitocondrial de superóxido.* Los cultivos de SH-SY5Y tratados con diferentes concentraciones de  $Cl_2Cd$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 7 días y 27 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo MitoSox. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $Cl_2Cd$  durante 7 días y las barras negras la exposición durante 27 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

Figura 5. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  de la línea celular A-704 cultivada en contenedores herméticos sobre la generación intracelular de peróxidos.* Los cultivos celulares de A-704 tratados con diferentes concentraciones de  $Cl_2Cd$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 6 días y 18 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo  $H_2DCF$ . En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $Cl_2Cd$  durante 6 días y las barras negras la exposición durante 18 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

Figura 6. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  de la línea celular SH-SY5Y cultivada en contenedores herméticos sobre la generación intracelular de peróxidos.* Los cultivos SH-SY5Y tratados con diferentes concentraciones de  $Cl_2Cd$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 7 días y 27 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo  $H_2DCF$ . En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $Cl_2Cd$  durante 7 días y las barras negras la exposición durante 27 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

Figura 7. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  de la línea celular A-704 cultivada en contenedores herméticos sobre el potencial de membrana plasmática de peróxidos.* Los cultivos A-704 tratados con diferentes concentraciones de  $Cl_2Cd$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 6 días y 18 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo DiBac. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $Cl_2Cd$  durante 6 días y las barras negras la exposición durante 18 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

Figura 8. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  de la línea celular SH-SY5Y cultivada en contenedores herméticos sobre el potencial de membrana plasmática de peróxidos.* Los cultivos SH-SY5Y tratados con diferentes concentraciones de  $Cl_2Cd$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 7 días y 27 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo DiBac. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $Cl_2Cd$  durante 7 días y las barras negras la exposición durante 27 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

Figura 9. *Efecto de la exposición crónica a  $Cl_2Cd$  de la línea celular A-704 cultivada en contenedores herméticos sobre el potencial de membrana mitocondrial de peróxidos.* Los cultivos A-704 tratados con diferentes concentraciones de  $Cl_2Cd$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 6 días y 18 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo TMRM. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $Cl_2Cd$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $Cl_2Cd$  durante 6 días y las barras negras la exposición durante 18 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

Figura 10. Efecto de la exposición crónica a  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  de la línea celular SH-SY5Y cultivada en contenedores herméticos sobre el potencial de membrana mitocondrial de peróxidos. Los cultivos SH-SY5Y tratados con diferentes concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 7 días y 27 días de exposición. La generación mitocondrial de superóxido, se ha determinado por citometría de flujo usando el fluorocromo TMRM. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (F.A.U.) y en el eje de abscisas se representan las concentraciones molares de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  utilizadas. Las barras blancas representan la exposición a  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  durante 7 días y las barras negras la exposición durante 27 días. Los resultados son la media  $\pm$  D.S de tres experimentos independientes.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención resuelve el problema del estudio de los efectos de la exposición crónica (hasta varias semanas) de compuestos químicos, farmacéuticos o biológicos sobre cultivos celulares *in vitro*, sin necesidad de subcultivar las células, mediante el ensayo de la invención. Este sistema es un método alternativo que mejora el valor predictivo de los ensayos celulares de toxicidad *in vitro*, mediante el uso de nuevos sistemas ventajosos de cultivos celulares (que proporcionen un modelo de supervivencia celular prolongada que extienda el período útil de exposición a xenobióticos) en contenedores herméticos. En la invención se describe además, la aplicación de desarrollos tecnológicos y estrategias analíticas novedosas para investigar las alteraciones tempranas y tardías inducidas por la exposición crónica de cultivos *in vitro* a agentes tóxicos relevantes, que como hemos mencionado anteriormente pueden ser compuestos químicos, farmacéuticos, biológicos, etc. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método y un kit alternativo de detección de toxicidad crónica que permite detectar de forma sensible y multiparamétrica alteraciones celulares y moleculares inducidas por la exposición sostenida a agentes tóxicos. Tales métodos proporcionan capacidad de resolución temporal (distinguen fenómenos tempranos, transitorios y tardíos), resolución poblacional (detectan fenómenos que afecten a subpoblaciones minoritarias dentro de una población mayoritariamente no afectada y caracterizan el fenotipo de las poblaciones sensibles o resistentes) y resolución mecanística (identifican o sugieren las posibles dianas moleculares de la acción tóxica de los xenobióticos).

La invención puede ser utilizada para estudiar *in vitro* los efectos de la exposición crónica de productos químicos, fármacos, xenobióticos, etc, pero también puede ser aplicada a evaluar los efectos de un tratamiento crónico con diferentes sustancias líquidas o gaseosas, incluyendo contaminantes medioambientales, componentes de cosméticos, nanomateriales y moléculas biológicas.

Mediante el método y el kit descritos en la presente invención, las células pueden exponerse a los agentes de estudio, tóxicos, fármacos, xenobióticos, etc, tanto en estado proliferante como diferenciado o en ambos. Los efectos de las sustancias en estudio son monitorizados *in situ* mediante microscopía óptica o de fluorescencia y cuantificados, al final del período de estudio, mediante una batería de ensayos de citometría de flujo (8), que permiten la determinación de muerte celular (por apoptosis o necrosis) y, selectivamente en células vivas, la cuantificación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, los potenciales de membrana mitocondrial y plasmática, los niveles intracelulares de lípidos polares y apolares, los peróxidos intracelulares, la generación mitocondrial de superóxido y el daño oxidativo al DNA nuclear y mitocondrial. Aunque la invención inicialmente se dirige a evaluar los efectos tóxicos mediante análisis de fluorescencia, otros procesos biológicos pueden ser fácilmente determinados, como por ejemplo, unión de ligandos, efectos sobre el ciclo celular, expresión de genes reporteros, etc.

Para el desarrollo de la presente invención se han utilizado un nuevo sistema compacto de contenedores herméticos (PetakaG2™) para cultivo celular, independiente de  $\text{CO}_2$  y humedad, diseñado para el cultivo de células adherentes y no adherentes, manufacturado por la compañía Celartia ([www.celartia.com](http://www.celartia.com)). El sistema de contenedores herméticos PetakaG2™ permite mantener a las células adherentes formando monocapas, y a las células no adherentes en suspensión mediante el uso continuo de sistemas adecuados de agitación o rotación orbital, en sincronización estable durante un período de tiempo que puede llegar a los tres meses. Este fenómeno (denominado “hibernación celular”) se induce mediante la incubación a 20-25°C de los cultivos confluentes crecidos a 37°C. Las células “hibernadas” pueden ser cultivadas de nuevo a 37°C y recuperan su crecimiento tras una pequeña fase de latencia. Alternativamente, tras la hibernación, las células pueden ser expandidas directamente mediante el paso a nuevos frascos.

Los contenedores herméticos proporcionan un medio aislado y automodificable, muy protegido de las condiciones externas, que permite la incubación de las células con o sin una fuente externa controlada de  $\text{CO}_2$  e independientemente también de la humedad relativa de la atmósfera. Por sus características, los contenedores herméticos de cultivo, no requieren estufa convencional de cultivos, lo que reduce notablemente la infraestructura necesaria para este tipo de ensayos.

El sistema de contenedores herméticos para cultivo celular independiente de  $\text{CO}_2$  y humedad permite obtener un rendimiento celular elevado por frasco, que oscila entre 25 y 45 millones de células por frasco después de 6-10 días de cultivo en crecimiento, dependiendo del tipo celular y el inóculo inicial (100.000-2.000.000 de células). Las características especiales del frasco y su forma de manipulación permiten el crecimiento de monocapas celulares en toda la superficie apta para el cultivo celular, siendo posible el crecimiento de monocapas celulares en las dos paredes internas del frasco, lo que representa una interesante estrategia para el desarrollo de cocultivos separados espacialmente. Se han utilizado este tipo de contenedores para el cultivo y sincronización prolongada de diferentes tipos celulares de relevancia, incluyendo cultivos primarios (células HUVEC, de cordón umbilical humano), líneas celulares establecidas adherentes (V79, MDCK, LLCPK, OK, CaCo, L-132, Neuro-2a) y no adherentes (Jurkat, U-917, HL-60).

Otra de las características de la presente invención es la utilización de ensayos de citometría de flujo como estrategia analítica para investigar las alteraciones tempranas y tardías inducidas por la exposición crónica a agentes tóxicos relevantes en cultivos *in vitro*. Mediante citometría de flujo se es capaz de determinar el fenotipo molecular en cada célula individual, como producto resultante del genotipo y la exposición a factores externos. Esta estrategia resuelve el problema de la interpretación de datos promediados, obtenidos a partir de homogeneizados celulares o tisulares, en los que los efectos pueden ser atribuidos a cambios uniformes en todas las células en lugar de en subpoblaciones determinadas. Por otra parte, las alteraciones en subpoblaciones escasas pueden ser indetectadas por un efecto de dilución.

Por lo tanto, la invención proporciona un método de fácil uso y bajo coste capaz de analizar la toxicidad crónica inducida por tóxicos, xenobióticos, etc, en cultivos celulares *in vitro*. Mediante este método se puede llevar a cabo un gran número de experimentos y en un gran rango de concentraciones ensayadas. En general, la invención aporta las ventajas que se requieren, por los expertos en toxicología, de un ensayo *in vitro* de toxicidad crónica (11).

Así, el primer objeto de la invención es un método de ensayo *in vitro* para el estudio de los efectos del tratamiento crónico de sustancias sobre cultivos celulares que comprende las etapas de:

- a) Siembra de células en un contenedor hermético.
- b) Crecimiento del cultivo
- c) Poner en contacto el cultivo celular con la/s sustancia/s de estudio durante un tiempo determinado.
- d) Extraer la suspensión celular del contenedor hermético y hacer alícuotas de la misma.
- e) Añadir a las alícuotas del paso d) fluorocromos a las concentraciones óptimas.
- f) Incubar las alícuotas con los fluorocromos del paso e) en oscuridad.
- g) Analizar las alícuotas del paso f) mediante monitorización *in situ* y posteriormente cuantificar mediante ensayos citométricos, los efectos del tratamiento crónico sobre los cultivos *in vitro* con las sustancias de estudio.

En una realización preferida el método de la invención se caracteriza porque las sustancias utilizadas se seleccionan entre: tóxicos, fármacos, xenobióticos, contaminantes atmosféricos, cosméticos, sustancias líquidas o gaseosas, nanomateriales y moléculas.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los cultivos celulares se seleccionan entre líneas celulares establecidas de origen humano o animal y cultivos primarios de origen humano y animal que pueden crecer en forma de monocapa o de suspensión celular.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque las líneas y cultivos celulares que crecen en monocapa lo hacen sobre la superficie apta para el cultivo de contenedores herméticos.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque las líneas y cultivos celulares que crecen en suspensión en los contenedores herméticos se mantienen de forma continua en agitación o rotación orbital.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el tiempo que se mantiene en contacto la sustancia y el cultivo celular es preferentemente un mínimo de 72 horas.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque la extracción de la suspensión celular del paso d) si los cultivos celulares crecen en forma de monocapa comprende las etapas de:

- 1) Extraer de manera estéril el medio de cultivo del contenedor hermético y conservarlo en condiciones estériles.
- 2) Levantar las células de las paredes del contenedor hermético.
- 3) Reintroducir en el contenedor hermético el medio extraído en el paso 1) y resuspender las células en el mismo.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque para levantar las células de las paredes del contenedor hermético se utilizan medios adecuados que se seleccionan entre: tripsina, soluciones que contienen enzimas proteolíticas, soluciones salinas libres de calcio u otros medios.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque la extracción de la suspensión celular del paso d) si los cultivos celulares crecen en suspensión comprende las etapas de:

- 1) Extraer de manera estéril el medio de cultivo junto con la suspensión celular del contenedor hermético y conservarlo en condiciones estériles.

2) Centrifugar la suspensión celular junto con el medio de cultivo del paso 1)

3) Desechar el medio de cultivo del paso 2) y resuspender en medio de cultivo estéril el agregado celular obtenido después de la centrifugación.

5

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los fluorocromos utilizados son preferentemente: IP, MitoSox, H2DCF, DiBac y TMRM.

10 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque la monitorización *in situ* realizada en el paso g) se realiza preferentemente mediante microscopía óptica o de fluorescencia.

15 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los ensayos citométricos realizados en el paso g) se realizan preferentemente mediante citometría de flujo. En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los efectos del tratamiento crónico con sustancias del paso g) que se analizan y cuantifican se seleccionan entre: características morfológicas de las células, formación de micronúcleos, supervivencia celular, muerte celular por apoptosis y/o necrosis, producción de daño oxidativo al DNA nuclear y mitocondrial, niveles intracelulares de ión calcio, potencial de membrana mitocondrial, cantidad de mitocondrias por célula, generación intracelular de ión superóxido, generación intracelular de peróxidos, niveles intracelulares de lípidos apolares, polares, fosfolípidos, lípidos oxidados y colesterol.

20

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque la etapa b) puede llevarse a cabo con o sin, una fuente externa de CO<sub>2</sub>.

25 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque la etapa b) puede llevarse a cabo en presencia o no, de humedad.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el cultivo celular en contacto con la/s sustancia/s de estudio puede mantenerse en estado proliferante, diferenciado o en ambos.

30

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque se co-cultivan al menos dos líneas celulares, en un mismo contenedor, seleccionándose dichas líneas celulares entre líneas celulares establecidas de origen humano o animal y cultivos primarios de origen humano y animal que pueden crecer en forma de monocapa o de suspensión celular.

35

En una realización preferida las líneas y cultivos celulares que pueden co-cultivarse y que crecen en forma de monocapa, lo hacen sobre toda la superficie apta para el cultivo en los contenedores herméticos.

40 En otra realización preferida las líneas y cultivos celulares que pueden co-cultivarse y que crecen en suspensión en los contenedores herméticos se mantienen de forma continua en agitación o rotación orbital.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los cultivos del paso b) pueden ser mantenidos en hibernación durante un periodo de hasta 3 meses.

45 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque la hibernación se consigue preferentemente a una temperatura de entre 20-25°C, consiguiéndose dicha hibernación modificando la temperatura de cultivo de las células de 37°C a 20-25°C, preferentemente. Las células en estado de hibernación pueden volver a fase de crecimiento modificando la temperatura de cultivo nuevamente a 37°C. Además las células en hibernación pueden subcultivarse.

50

El segundo objeto de la invención es un kit de ensayo para llevar a cabo el método descrito anteriormente que comprende:

55 i) Un contenedor hermético para siembra y cultivo de células en su interior, que permite el contacto de dichas células con la sustancia cuyo efecto se pretende ensayar.

ii) Medios para introducir/extraer en condiciones estériles el medio de cultivo y/o las células del contenedor hermético.

60 iii) Medios para hacer alícuotas del medio y/o las células extraídas del contenedor hermético.

iv) Medios para añadir los fluorocromos a las alícuotas.

v) Incubación en oscuridad.

65

vi) Medios de monitorización *in situ* y posterior cuantificación mediante ensayos citométricos.

En una realización preferida el kit de la invención se caracteriza porque los medios del paso ii) y iv) se seleccionan entre: agujas, jeringas, pipetas, puntas de pipetas, o cualquier otro tipo de medio adecuado, y que además puede ser manual o automático.

5 En otra realización preferida el kit de la invención se caracteriza porque los medios del paso iii) se seleccionan entre: viales o placas estériles ya sean de vidrio o de plástico, o cualquier otro tipo de medio adecuado en el que se pueda alicuotar la suspensión celular para posteriormente ser analizada mediante citometría de flujo.

10 En otra realización preferida el kit de la invención se caracteriza porque la monitorización *in situ* del paso vi) se realiza en los propios contenedores herméticos mediante microscopía óptica o de fluorescencia.

15 En otra realización preferida el kit de la invención se caracteriza porque los ensayos citométricos que se realiza en los viales o placas estériles, ya sean de vidrio o plástico o en cualquier otro medio adecuado, se realizan preferentemente mediante citometría de flujo.

Se describen a continuación ejemplos en los que se muestra detalladamente el método para analizar la toxicidad crónica *in vitro* de diferentes concentraciones de un tóxico ejemplo en diferentes cultivos celulares y a distintos tiempos, mediante el método descrito en la presente invención.

20 Los ejemplos que se exponen a continuación tienen el objetivo de ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma

#### Ejemplo 1

25 *Líneas celulares utilizadas para los ensayos de toxicidad crónica in vitro utilizando el método de la invención*

Para demostrar la validez del método descrito en la presente invención se han utilizado dos líneas celulares humanas.

30 La línea celular A704 es una línea celular de adenocarcinoma humano. (ECACC No 93020513. European Collection Cell Cultures, Salisbury, UK. [www.ecacc.org.uk](http://www.ecacc.org.uk)). Se mantiene en medio de cultivo EMEM (Minimum Essential Médium Eagle) suplementado con un 10% de FBS (Suero Bovino Fetal), 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato sódico, 2 mM Glutamina, 100 IU/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomicina. La línea celular A704 crece en monocapa. Se cultiva en frascos o contenedores herméticos, procediéndose a subcultivar cuando se alcance una confluencia > del 80%.

40 La línea celular SH-SY5Y es una línea celular de neuroblastoma humano (ECACC No 94030304. European Collection Cell Cultures, Salisbury, UK. [www.ecacc.org.uk](http://www.ecacc.org.uk)). Se mantiene en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Médium) suplementado con 15% de FBS, 1% aminoácidos no esenciales, 2 mM Glutamina, 100 IU/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomicina. La línea celular SH-SY5Y crece en monocapa. Se cultiva en frascos o contenedores herméticos, procediéndose a subcultivar cuando se alcance una confluencia > del 80%.

45 A partir de frascos de cultivo convencionales, mantenidos en incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C hasta alcanzar una densidad celular aproximada de 18.000.000 células/frasco, se siembran cuatro contenedores herméticos con 20 mL de suspensión celular en medio de cultivo apropiado (1.800.000 células/mL), a una densidad celular de 700.000 células/mL. Los contenedores herméticos se incuban durante 24 horas en estufa seca a 37°C para permitir la adhesión de las células antes de la adición de los tóxicos u otras sustancias de estudio.

#### 50 Ejemplo 2

*Tratamiento de las células cultivadas en contenedores herméticos con las sustancias de análisis (tóxicos)*

55 Transcurridas las 24 h desde la siembra de las células en los contenedores herméticos, se remplazan los 20 mL de medio de cultivo de cada contenedor hermético con 20 mL de las soluciones que contengan el tóxico a analizar o los controles negativos, a las concentraciones elegidas. Posteriormente se depositan los contenedores herméticos en la estufa seca a 37°C hasta el momento del sacrificio de los cultivos y posterior análisis de citotoxicidad.

60 En estos ejemplos se ha utilizado como tóxico modelo el Cl<sub>2</sub>Cd, un agente citotóxico que produce citotoxicidad en diversas líneas celulares (7, 13). Las concentraciones de Cl<sub>2</sub>Cd estudiadas han sido 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 2x10<sup>-7</sup> M, siendo el control negativo un volumen idéntico de medio de cultivo (6, 13-14). Las concentraciones de Cl<sub>2</sub>Cd son similares a las que se utilizaron en un estudio de toxicidad crónica con Cl<sub>2</sub>Cd (6) desarrollado por el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), el laboratorio de la Comisión Europea (CE) implicado en la promoción y validación de técnicas *in vitro* de análisis de toxicidad.

65 Los cultivos tratados con Cl<sub>2</sub>Cd o medio de cultivo solo (control) se han analizado tras 6 días y 18 días de exposición (para la línea celular A704) o tras 7 días y 27 días de exposición (para la línea celular SH-SY5Y).

## Ejemplo 3

*Análisis mediante citometría de flujo de las células cultivadas en contenedores herméticos y sometidas a tratamiento crónico con Cl<sub>2</sub>Cd*

5 Transcurrido el tiempo determinado de actuación del tóxico Cl<sub>2</sub>Cd para cada una de las líneas celulares de estudio (6 y 18 días para la línea celular A704 y 7 y 27 días para la línea celular SH-SY5Y), se procede al análisis de los efectos de las diferentes concentraciones y tiempos utilizados en el tratamiento con Cl<sub>2</sub>Cd sobre los cultivos celulares antes mencionados y comparándolos con el cultivo control, que no fue tratado con el tóxico (control), de acuerdo con el método siguiente:

- Extraer con una jeringa estéril el medio de cultivo del contenedor hermético, y conservarlo en un tubo de centrífuga en condiciones estériles.
- 15 - Introducir 4 mL de tripsina en el contenedor hermético e incubar en estufa a 37°C durante 8 minutos.
- Introducir de nuevo en el contenedor hermético el medio previamente extraído y resuspender las células tripsinizadas en dicho medio.
- 20 - Extraer la suspensión celular y hacer alícuotas de 1 mL en tubos de plástico de 12x75 mm.
- Añadir a los tubos pertinentes los siguientes fluorocromos, a las concentraciones finales indicadas: DiBaC: 0,3 μM; TMRM: 150 nM; IP: 2,5 μg/mL; MitoSox: 2,5 μM y H<sub>2</sub>DCF: 5 μg/mL.
- 25 - Incubar 30 minutos a 37°C en oscuridad la suspensión celular junto con los fluorocromos.
- Analizar y cuantificar mediante citometría de flujo.

## Ejemplo 4

*Resultados de morfología y viabilidad obtenidos en el estudio de toxicidad crónica mediante el método descrito en la presente invención*

35 El tratamiento con Cl<sub>2</sub>Cd a las concentraciones y tiempos elegidos (hasta 27 días) no provocó cambios apreciables (mediante microscopía óptica) en la morfología de las células SH-SY5Y (Fig. 1) ni en las células A704, comparado con las células mantenidas en similares condiciones de incubación (contenedores herméticos) y no expuestas al tóxico (células control). En las células tratadas con la concentración más alta de Cl<sub>2</sub>Cd, se puede observar una menor densidad celular, sugiriendo un cierto efecto negativo del tóxico sobre el crecimiento celular o la supervivencia de las células.

40 Para los ensayos de viabilidad celular, se utilizó como fluorocromo el Yoduro de Propidio (IP), marcador de células muertas. El fluorocromo IP se une al ADN y al ARN de doble cadena, intercalándose entre sus bases. Una vez unido a los ácidos nucleicos, la fluorescencia roja del IP aumenta 20-30 veces. El IP no atraviesa la membrana plasmática y es excluido de las células vivas, por lo que se usa para identificar las células muertas, que se tiñen de rojo en presencia de dicho fluorocromo.

50 La Fig. 2 muestra la evolución de la viabilidad, determinada por citometría de flujo utilizando IP como fluorocromo. Puede apreciarse que no hay diferencias en la viabilidad de los cultivos tratados con cualquiera de las dosis de Cl<sub>2</sub>Cd durante 6 días (A-704) o 7 días (SH-SY5Y), mientras que la viabilidad disminuye a los 18 días (A-704) o 27 días (SH-SY5Y) con las concentraciones más altas de Cl<sub>2</sub>Cd, de forma similar en las dos líneas celulares, aunque siempre permanecen claramente por encima del 50% de viabilidad.

55 Las mismas concentraciones de Cl<sub>2</sub>Cd no tuvieron ningún efecto en la viabilidad de células A-704 o SH-SY5Y expuestas al tóxico sólo durante 24 horas, tanto en frascos de cultivo convencionales como en contenedores herméticos.

## Ejemplo 5

60 *Efectos intracelulares del tratamiento crónico con Cl<sub>2</sub>Cd en cultivos celulares mediante el método descrito en la presente invención y analizados mediante citometría de flujo*

65 La aplicación de la citometría de flujo permite determinar los efectos intracelulares del Cl<sub>2</sub>Cd de modo específico en las células vivas. Mediante el uso de fluorocromos específicos, sensores de componentes o funciones celulares de relevancia, y aprovechando las características morfológicas y/o de exclusión de IP que diferencian a las células vivas de las muertas, se han cuantificado los efectos de la exposición al Cl<sub>2</sub>Cd sobre funciones intracelulares consideradas como marcadores de estrés oxidativo (generación mitocondrial de superóxido, generación de peróxidos intracelulares) y de alteraciones bioenergéticas celulares (potenciales de membrana plasmática y mitocondrial). Aparte de estas funciones se pueden analizar muchas otras en función del fluorocromo que se utilice. Otras funciones intracelulares que se pueden

analizar son: características morfológicas de las células, formación de micronúcleos, supervivencia celular, muerte celular por apoptosis y/o necrosis, producción de daño oxidativo al DNA nuclear y mitocondrial, niveles intracelulares de ión calcio, potencial de membrana mitocondrial, cantidad de mitocondrias por célula, generación intracelular de ión superóxido, generación intracelular de peróxidos, niveles intracelulares de lípidos apolares, polares, fosfolípidos, lípidos oxidados y colesterol, entre otras.

#### Ejemplo 5.1

*Análisis mediante citometría de flujo de la generación mitocondrial de superóxido en cultivos in vitro después del tratamiento crónico con Cl<sub>2</sub>Cd*

La generación mitocondrial de superóxido se determinó mediante el mareaje de la suspensión celular de células A-704 (Fig. 3) y SH-SY5Y (Fig. 4) con el fluorocromo MitoSox (MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator). Dicho fluorocromo penetra fácilmente en las células vivas y se une selectivamente a las mitocondrias, donde es oxidado por el ión superóxido y genera fluorescencia roja cuando se une a los ácidos nucleicos intracelulares. En la línea celular A-704, la generación mitocondrial de superóxido presenta un efecto bifásico, tanto a 6 días como a 18 días de exposición, con una disminución a las dosis más bajas de tratamiento con Cl<sub>2</sub>Cd (10<sup>-8</sup> M) y una recuperación hasta valores similares a los del control, con la dosis más alta de dicho tóxico (2x10<sup>-7</sup> M) (Fig. 3).

En las células SH-SY5Y, el efecto del Cl<sub>2</sub>Cd en la generación mitocondrial de superóxido es diferente, mostrando una disminución dosis-dependiente en los primeros 7 días de tratamiento y un efecto bifásico a los 27 días de tratamiento con el tóxico, con un aumento a la dosis más baja (10<sup>-7</sup> M) y una disminución a la dosis superior (2x10<sup>-7</sup> M).

No se observó ningún efecto significativo sobre la generación mitocondrial de superóxido en células A-704 o SH-SY5Y expuestas durante 24 horas a las mismas concentraciones de Cl<sub>2</sub>Cd antes mencionadas, en frascos convencionales o en contenedores herméticos (datos no mostrados).

#### Ejemplo 5.2

*Análisis mediante citometría de flujo de la generación de peróxidos intracelulares en cultivos in vitro después del tratamiento crónico con Cl<sub>2</sub>Cd*

La generación de peróxidos intracelulares se ha evaluado mediante el mareaje de la suspensión de células A-704 (Fig. 5) y SH-SY5Y (Fig. 6) con el fluorocromo H<sub>2</sub>DCF (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato). Dicho fluorocromo penetra fácilmente en las células vivas y es un indicador de especies reactivas de oxígeno, que no emite fluorescencia hasta que el grupo acetato no es eliminado por las esterasas intracelulares y se produce la peroxidación del fluorocromo dentro de las células.

En las células A-704, tanto a los 6 días como a los 18 días de exposición a Cl<sub>2</sub>Cd se muestra un aumento dosis-dependiente de la actividad peroxidativa intracelular (Fig. 5). Un efecto similar se puede observar en las células SH-SY5Y tanto a los 7 días como a los 27 días de exposición (Fig. 6).

No se observó ningún efecto significativo sobre la generación intracelular de peróxidos en células A-704 o SH-SY5Y expuestas durante 24 horas a las mismas concentraciones de Cl<sub>2</sub>Cd en frascos convencionales o en contenedores herméticos (datos no mostrados).

#### Ejemplo 5.3

*Análisis mediante citometría de flujo del potencial de membrana de cultivos in vitro después del tratamiento crónico con Cl<sub>2</sub>Cd*

El potencial de membrana plasmática se ha determinado mediante el mareaje de la suspensión de células A-704 (Fig. 7) y SH-SY5Y (Fig. 8) con el fluorocromo DiBac, (ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico)-trimetin-oxonol). Dicho fluorocromo es sensible al voltaje, lo que permite la estimación del potencial eléctrico de la membrana plasmática, ya que penetra preferentemente en las células cuya membrana plasmática presenta un menor potencial eléctrico (membrana relativamente despolarizada). Por ello, un aumento en la fluorescencia de DiBac indica una despolarización relativa de la membrana y una disminución de la fluorescencia refleja una hiperpolarización de la membrana.

La Fig. 7 muestra que en las células A-704, la exposición durante 6 días o 18 días al Cl<sub>2</sub>Cd provoca una despolarización progresiva y dosis-dependiente de la membrana plasmática, evidenciada por una creciente fluorescencia de DiBac.

En la línea celular SH-SY5Y, la exposición a Cl<sub>2</sub>Cd tiende también a provocar una despolarización de la membrana plasmática, como en las células A-704. Sin embargo, el efecto es ligeramente distinto a los 7 días y a los 27 días de exposición al Cl<sub>2</sub>Cd. Como muestra la Fig. 8, a los 7 días la máxima despolarización se observa a la menor dosis (10<sup>-7</sup> M), mientras que a los 28 días, la despolarización es dosis-dependiente.

No se observó ningún efecto significativo sobre el potencial de membrana plasmática en células A-704 o SH-SY5Y expuestas durante 24 horas a las mismas concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  en frascos convencionales de cultivo o en contenedores herméticos (datos no mostrados).

#### 5 Ejemplo 5.4

*Análisis mediante citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial de cultivos in vitro después del tratamiento crónico con  $\text{Cl}_2\text{Cd}$*

10 El potencial de membrana mitocondrial, una función clave en el mantenimiento de la energía celular. Dicho potencial, se puede determinar mediante el mareaje de la suspensión de células A-704 (Fig. 9) y SH-SY5Y (Fig. 10) con el fluorocromo TMRM (tetrametil rhodamina metal ester), una molécula catiónica lipofílica que atraviesa fácilmente la membrana plasmática y se incorpora a la mitocondria en función de su potencial transmembrana, de forma que un aumento de la fluorescencia de TMRM evidencia una hiperpolarización de la membrana mitocondrial.

15 La Fig. 9 muestra que la exposición de las células A-704 al  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  durante 6 días no modifica el potencial de membrana mitocondrial, mientras que la exposición durante 18 días tiene un efecto bifásico, con una hiperpolarización a la dosis más baja ( $10^{-8}$  M) y una normalización a las dosis más altas ( $10^{-7}$  M y  $2 \times 10^{-7}$  M).

20 En las células SH-SY5Y, el efecto es distinto (Fig. 10). No hay efecto significativo a los 27 días de exposición y, por el contrario, a los 7 días, se observa un efecto bifásico similar al que ocurre en las células A-704 a tiempos más largos.

25 No se observó ningún efecto significativo sobre el potencial de membrana mitocondrial en células A-704 o SH-SY5Y expuestas durante 24 horas a las mismas concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  en frascos convencionales de cultivo o en contenedores herméticos (datos no mostrados).

30 Mediante estos ejemplos se demuestra que las bajas concentraciones aplicadas de forma sostenida a las dos líneas celulares no tienen ningún efecto en exposiciones de tipo agudo (24 horas) tanto en frascos convencionales (Falcon T25) como en contenedores herméticos (Petaka G2<sup>TM</sup>), por lo que se pueden considerar como concentraciones NOEL (No Observed Effect Level), sin efecto observado, en dichas condiciones. Sin embargo, en exposiciones prolongadas, de acuerdo con el método de la invención, estas concentraciones muestran efectos sobre diferentes parámetros funcionales celulares, especialmente en el contexto del estrés oxidativo, y muestran, además, comportamiento diferente, en algunos casos, entre las dos líneas celulares estudiadas, el neuroblastoma SH-SY5Y y el carcinoma renal A-704.

35

#### Bibliografía

40 1. **Pfaller W, Balls M, Clothier R, Coecke S, Dierickx P, Ekwall B, Hanley BA, Hartung T, Prieto P, Ryan MP, Schmuck G, Sladowski D, Vericat JA, Wendel A, Wolf A, Zimmer J.** Novel advanced *in vitro* methods for long-term toxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 45. *Altern Lab Anim.* 2001; 29(4):393-426.

45 2. **Prieto P.** Barriers, nephrotoxicology and chronic testing *in vitro*. *Altern Lab Anim.* 2002 Dec; 30 Suppl 2:101-106. Review. PubMed PMID: 12513658.

3. **Prieto P, Clemenson C, Meneguz A, Pfaller W, Sauer UG, Westmoreland C.** Subacute and subchronic toxicity. *Altern Lab Anim.* 2005; 33 Suppl 1:109-116.

50 4. **Prieto P, Baird AW, Blaauboer BJ, Castell Ripoll JV, Corvi R, Dekant W, Dietl P, Gennari A, Gribaldo L, Griffin JL, Hartung T, Heindel JJ, Hoet P, Jennings P, Marocchio L, Noraberg J, Pazos P, Westmoreland C, Wolf A, Wright J, Pfaller W.** The assessment of repeated dose toxicity *in vitro*: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Altern Lab Anim.* 2006; 34:315-341.

55 5. <http://www.cytomics.info/>

6. **Pazos P, Fortaner S, Prieto P.** Long-term *in vitro* toxicity models: comparisons between a flow-cell bioreactor, a static-cell bioreactor and static cell cultures. *Altern Lab Anim.* 2002; 30:515-523.

60 7. **G. Valet, A. Tárnok (2003)** Cytomics in predictive medicine. *Cytometry* 53B: 1-3.

8. **Callaghan R.C., O'Connor, J.E., Alvarez A.M. (1997)** "Microscopía Confocal y Estrés Oxidativo en Células". En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (Cascales, M., Ed.). *Real Academia de Farmacia*, Madrid, pp. 365-380.

65 9. **FL Kiechle and CA Holland-Staley (2003)** Genomics, transcriptomics, proteomics, and numbers. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127:1089-97.

10. A **Waller**, P **Simons**, ER **Prossnitz**, BS **Edwards**, and LA **Sklar** (2003). High throughput screening of G-protein coupled receptors via flow cytometry. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6:389-97.

5 11. **O'Connor**, J.E., **Callaghan**, R.C., **Escudero**, M., **Herrera**, G., **Martínez**, A., **Monteiro**, M.C., **Montolíu**, H. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life.* 2001; 51:231-239.

12. **Gennari** A, **Cortese** E, **Boveri** M, **Casado** J, **Prieto** P. Sensitive endpoints for evaluating cadmium-induced acute toxicity in LLC-PK1 cells. *Toxicology.* 2003; 183:211-220.

10 13. **Boveri** M, **Pazos** P, **Gennari** A, **Casado** J, **Hartung** T, **Prieto** P. Comparison of the sensitivity of different toxicological endpoints in Caco-2 cells after cadmium chloride treatment. *Arch Toxicol.* 2004; 78:201-206.

14. ECVAM Workshop Report 45 (2001) Novel advanced *in vitro* Methods for long-term toxicity testing. *ATLA* 29:393-426.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Método de ensayo *in vitro* para el estudio de los efectos del tratamiento crónico de sustancias sobre cultivos celulares que comprende las etapas de:

- a) Siembra de células en un contenedor hermético.
- b) Crecimiento del cultivo
- 10 c) Poner en contacto el cultivo celular con la/s sustancia/s de estudio durante un tiempo determinado.
- d) Extraer la suspensión celular del contenedor hermético y hacer alícuotas de la misma.
- 15 e) Añadir a las alícuotas del paso d) fluorocromos a las concentraciones óptimas.
- f) Incubar las alícuotas con los fluorocromos del paso e) en oscuridad.
- 20 g) Analizar las alícuotas del paso f) mediante monitorización *in situ* y posteriormente cuantificar mediante ensayos citométricos, los efectos del tratamiento crónico con las sustancias de estudio de los cultivos *in vitro*.

25 2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las sustancias utilizadas se seleccionan entre: tóxicos, fármacos, xenobióticos, contaminantes atmosféricos, cosméticos, sustancias líquidas o gaseosas, nanomateriales y moléculas biológicas.

30 3. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los cultivos celulares se seleccionan entre líneas celulares establecidas de origen humano o animal y cultivos primarios de origen humano y animal que pueden crecer en forma de monocapa o de suspensión celular.

4. Método según la reivindicación 3 **caracterizado** porque las líneas y cultivos celulares que crecen en monocapa lo hacen sobre la superficie apta para el cultivo de contenedores herméticos.

35 5. Método según la reivindicación 3 **caracterizado** porque las líneas y cultivos celulares que crecen en suspensión en los contenedores herméticos se mantienen de forma continua en agitación o rotación orbital.

40 6. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el tiempo que se mantiene en contacto la sustancia y el cultivo celular es preferentemente un mínimo de 72 horas.

7. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la extracción de la suspensión celular del paso d) si los cultivos celulares crecen en forma de monocapa comprende las etapas de:

- 45 7.1) Extraer de manera estéril el medio de cultivo del contenedor hermético y conservarlo en condiciones estériles.
- 7.2) Levantar las células de las paredes del contenedor hermético.
- 50 7.3) Reintroducir en el contenedor hermético el medio extraído en el paso 7.1) y resuspender las células en el mismo.

55 8. Método según la reivindicación 7 **caracterizado** porque para la realización del paso 7.2) se utilizan medios adecuados que se seleccionan entre: tripsina, soluciones que contienen enzimas proteolíticas, soluciones salinas libres de calcio u otros medios.

9. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la extracción de la suspensión celular del paso d) si los cultivos celulares crecen en suspensión comprende las etapas de:

- 60 9.1) Extraer de manera estéril el medio de cultivo junto con la suspensión celular del contenedor hermético y conservarlo en condiciones estériles.
- 9.2) Centrifugar la suspensión celular junto con el medio de cultivo del paso 9.1)
- 65 9.3) Desechar el medio de cultivo del paso 9.2) y resuspender en medio de cultivo estéril el agregado celular obtenido después de la centrifugación.

10. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los fluorocromos utilizados son cualquier molécula fluorescente capaz de ser medida y cuantificada mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, siendo preferentemente: IP, Mitox, H2DCF, DiBac y TMRM.

5 11. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la monitorización *in situ* realizada en el paso g) se realiza preferentemente mediante microscopía óptica o de fluorescencia.

12. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los ensayos citométricos se realizan preferentemente mediante citometría de flujo.

10 13. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los efectos del tratamiento crónico con sustancias que se analizan y cuantifican en el paso g) se seleccionan entre: características morfológicas de las células, formación de micronúcleos, supervivencia celular, muerte celular por apoptosis y/o necrosis, producción de daño oxidativo al DNA nuclear y mitocondrial, niveles intracelulares de ión calcio, potencial de membrana mitocondrial, cantidad de mitocondrias por célula, generación intracelular de ión superóxido, generación intracelular de peróxidos, niveles intracelulares de lípidos apolares, polares, fosfolípidos, lípidos oxidados y colesterol.

14. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la etapa b) puede llevarse a cabo con o sin, una fuente externa de CO<sub>2</sub>.

15 15. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la etapa b) puede llevarse a cabo en presencia o no, de humedad.

16. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el cultivo celular en contacto con la/s sustancia/s de estudio puede mantenerse en estado proliferante, diferenciado o en ambos.

17. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque se pueden co-cultivar al menos dos líneas celulares, en un mismo contenedor.

18. Método según la reivindicación 17 **caracterizado** porque las líneas que se pueden co-cultivar se seleccionan entre líneas celulares establecidas de origen humano o animal y cultivos primarios de origen humano y animal, que pueden crecer en forma de monocapa o de suspensión celular.

19. Método según la reivindicación 18 **caracterizado** porque las líneas y cultivos celulares que crecen en monocapa lo hacen sobre la superficie apta para el cultivo de contenedores herméticos.

20. Método según la reivindicación 18 **caracterizado** porque las líneas y cultivos celulares que crecen en suspensión en los contenedores herméticos se mantienen de forma continua en agitación o rotación orbital.

21. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los cultivos del paso b) pueden ser mantenidos en hibernación durante un periodo de hasta 3 meses.

22. Método según la reivindicación 21 **caracterizado** porque la hibernación se consigue preferentemente a una temperatura de entre 20-25°C.

23. Método según las reivindicaciones 21 y 22 **caracterizado** porque las células en hibernación pueden volver a fase de crecimiento modificando la temperatura de cultivo a 37°C.

24. Método según la reivindicación 21 **caracterizado** porque las células en hibernación pueden ser subcultivadas.

25. Kit de ensayo para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1 a 24 que comprende:

i) Un contenedor hermético para siembra y cultivo de células en su interior, que permite el contacto de dichas células con la sustancia cuyo efecto se pretende ensayar.

ii) Medios para introducir/extraer en condiciones estériles el medio de cultivo y/o las células del contenedor hermético.

iii) Medios para hacer alícuotas del medio y/o las células extraídas del contenedor hermético.

iv) Medios para añadir los fluorocromos a las alícuotas.

v) Incubación en oscuridad.

vi) Medios de monitorización *in situ* y posterior cuantificación mediante ensayos citométricos.

**Fig. 1**

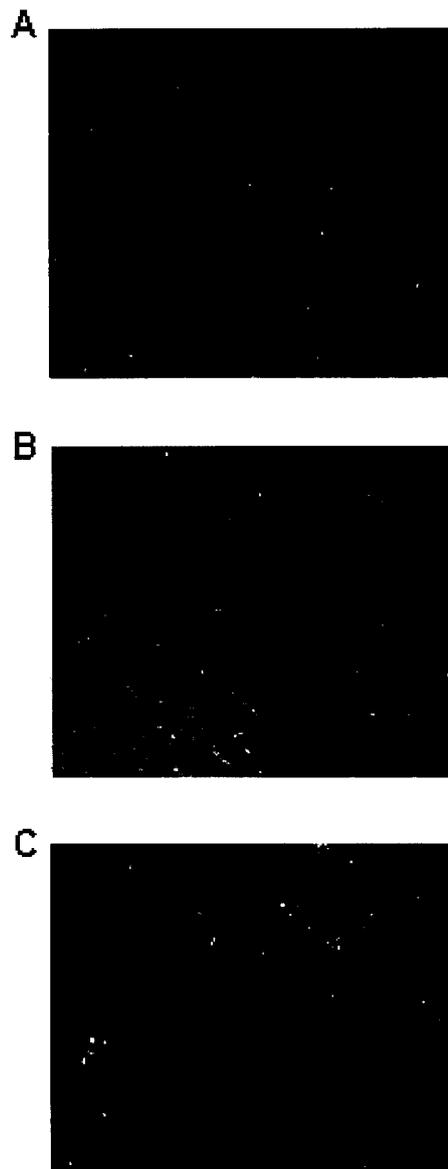


Fig. 2

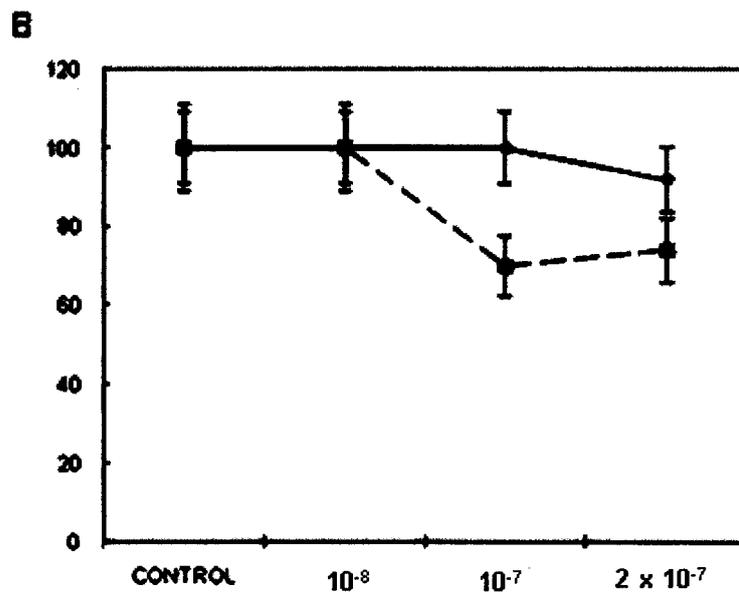
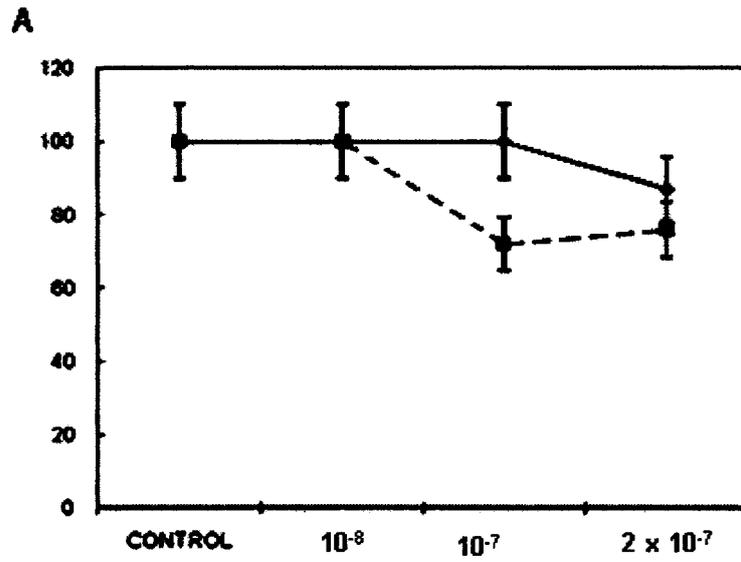
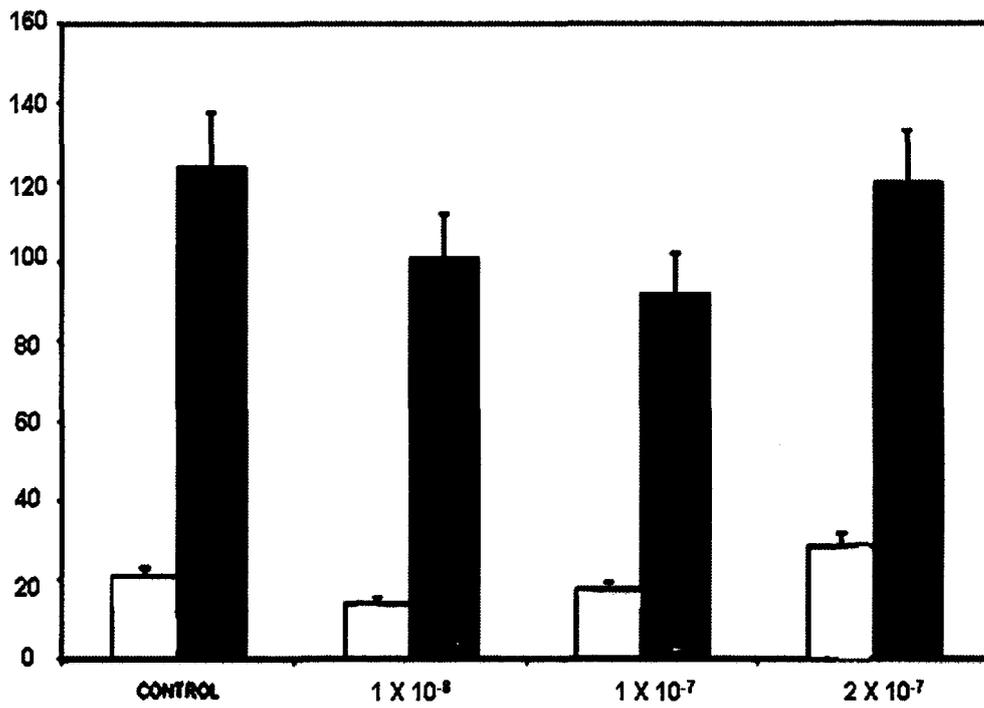


Fig. 3



**Fig. 4**

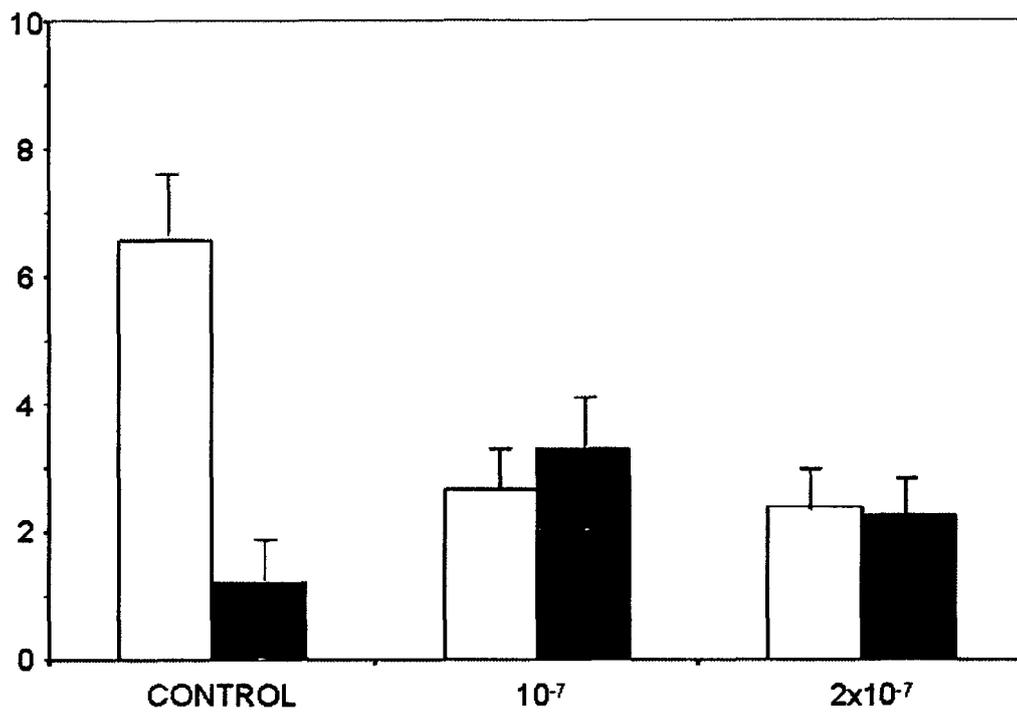
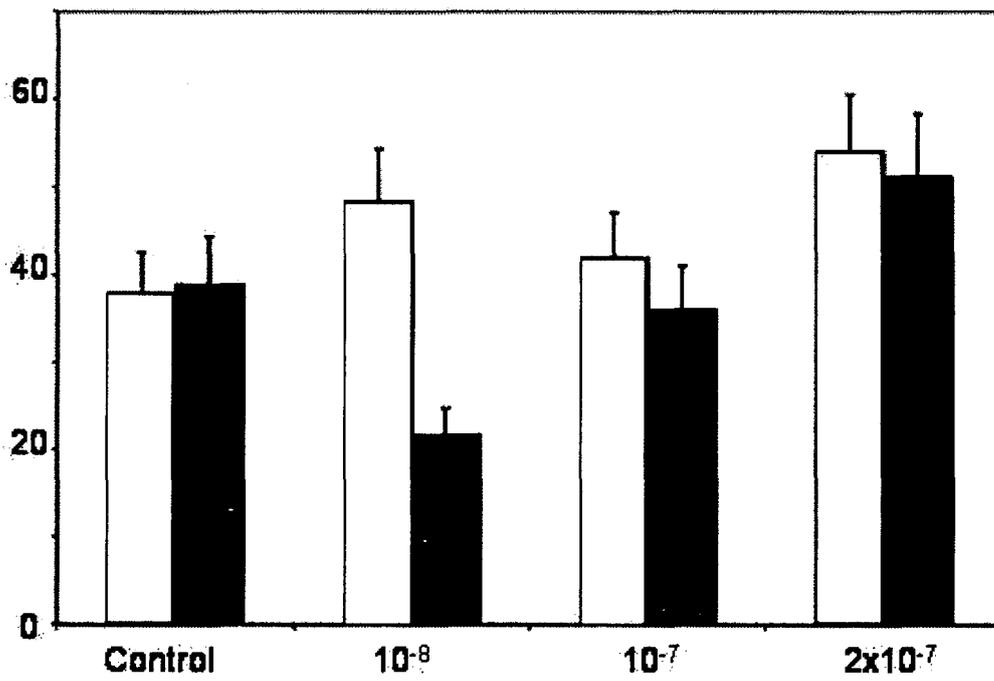


Fig. 5



**Fig. 6**

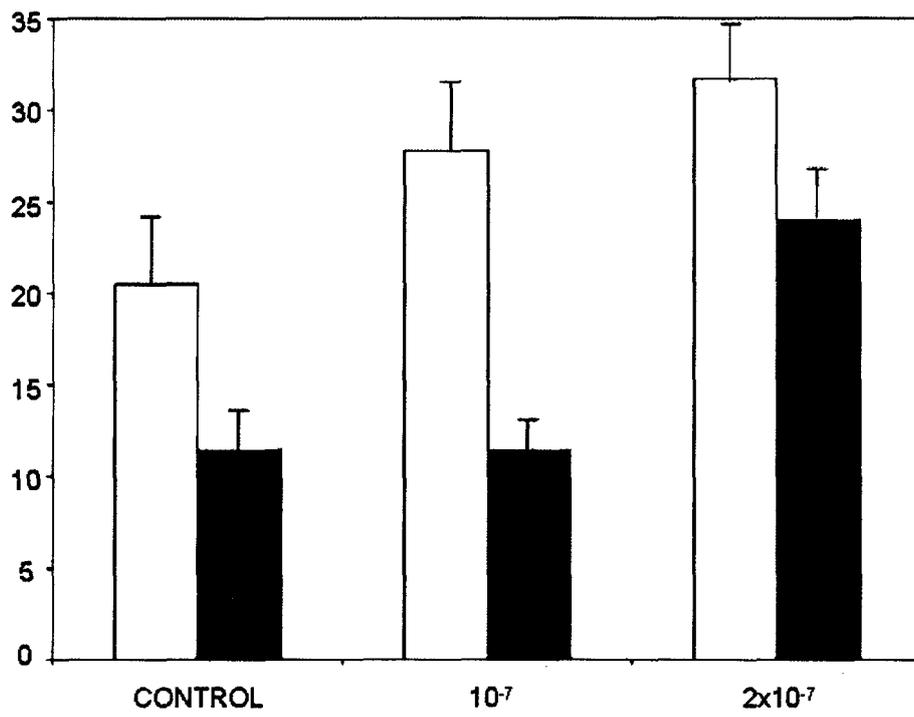
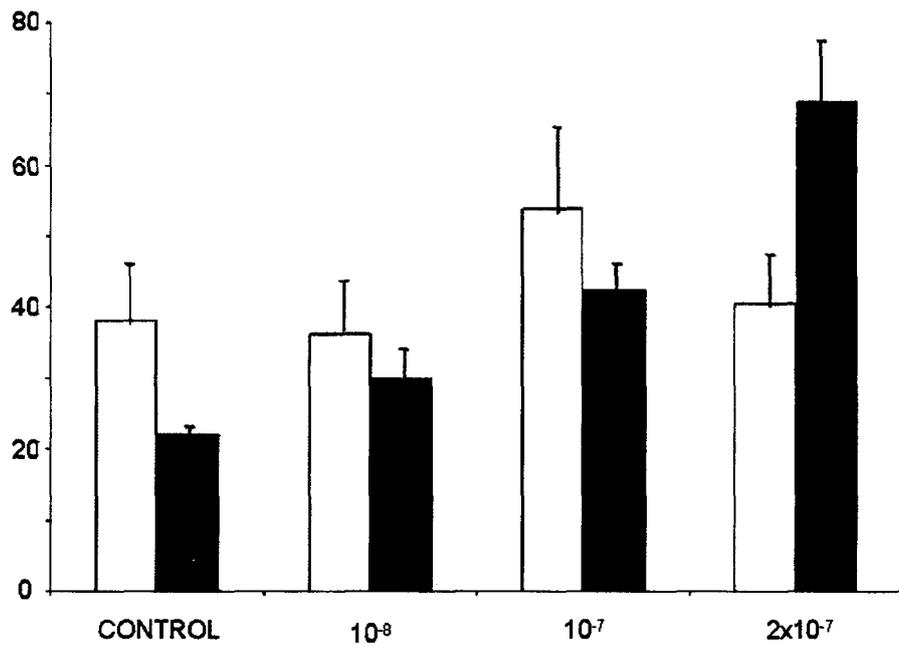
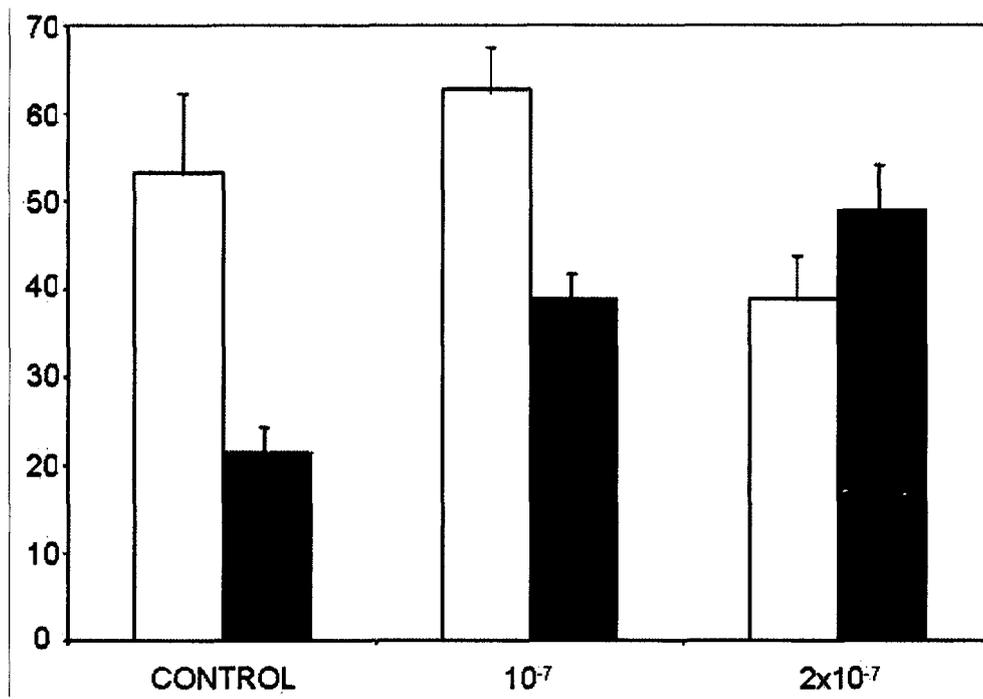


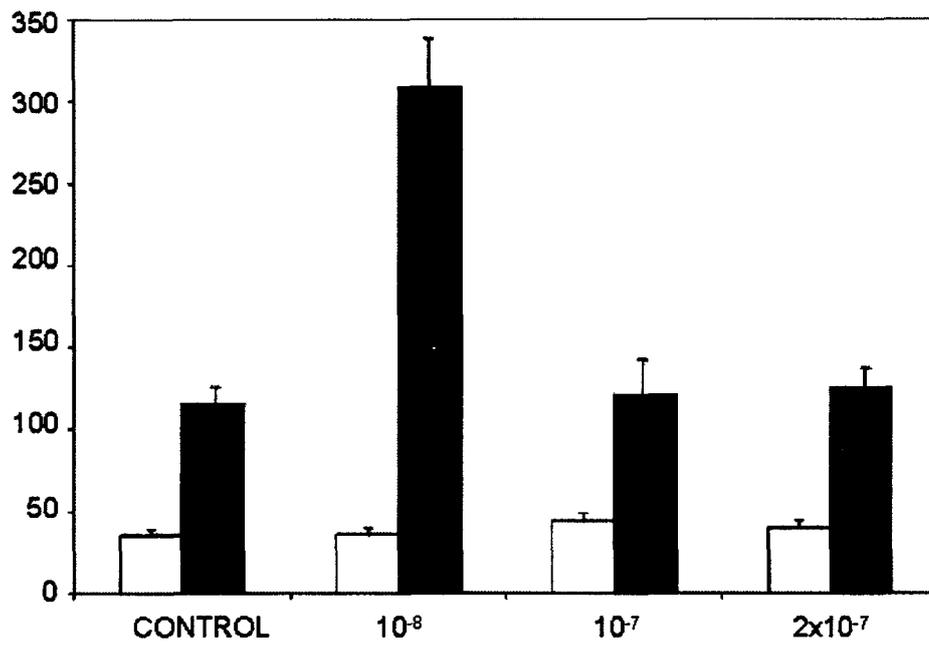
Fig. 7



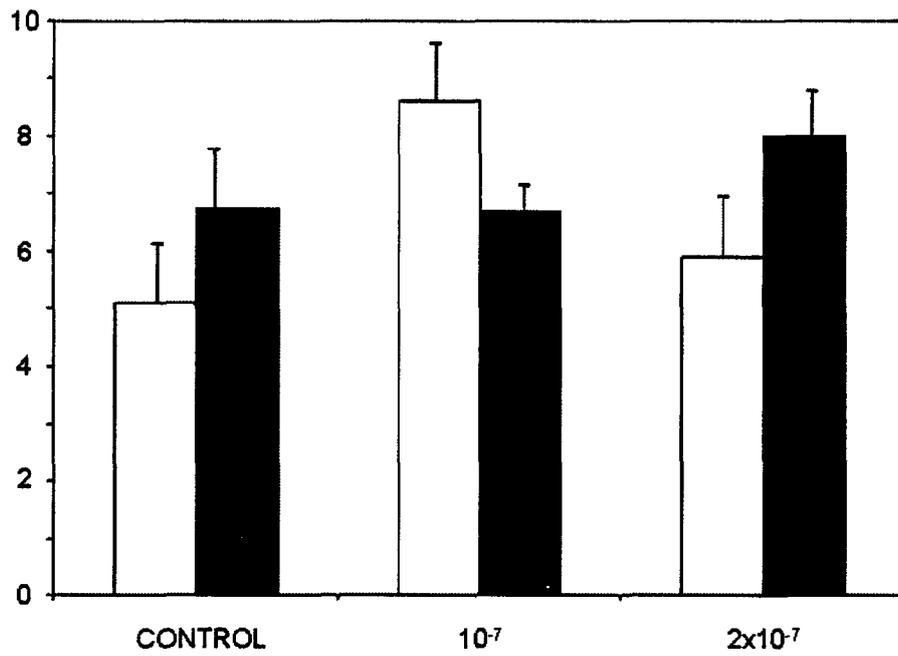
**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901192

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.05.2009

③② Fecha de prioridad: **00-00-0000**

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/18**(2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2006/094104 A2 (MOLECULAR PROBES INC.) 08.09.2006, todo el documento, en particular, página 8 – párrafo 0043; reivindicación 18.	1-25
A	GB 2345754 A (ZETATRONICS LIMITED) 19.07.2000, todo el documento.	1-25
A	2006 FENSKE, C. et al., Int. J. Hyg. Environ. Health., (2006), 209(3): 275-84.	1-25

#### 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: TODAS

Fecha de realización del informe  
12.11.2010

Examinador  
J. Vizan Arroyo

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

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

C12Q

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, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-25	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-25	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006/094104 A2 (MOLECULAR PROBES INC.)	08.09.2006
D02	GB 2345754 A (ZETATRONICS LIMITED)	19.07.2000
D03	Fenske, C. et al., Int. J. Hyg. Environ. Health., (2006), 209(3): 275-84.	2006

En D1-D2 se describen diferentes procedimientos in vitro para determinar la eficacia de compuestos antibacterianos. En D3 se comparan diferentes procedimientos biológicos de valoración de riesgos ecotoxicológicos.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención está relacionada con un método in vitro para el estudio de los efectos toxicológicos del tratamiento crónico de ciertas sustancias sobre cultivos celulares. Las sustancias consideradas comprenden tóxicos, fármacos, xenobióticos, contaminantes atmosféricos, cosméticos, sustancias líquidas o gaseosas, nanomateriales y moléculas biológicas.

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

**1.1. Reivindicación independiente 1**

El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método de ensayo in vitro para el estudio de los efectos del tratamiento crónico de sustancias sobre cultivos celulares caracterizado porque comprende: a) la siembra de células en un contenedor hermético, b) el crecimiento del cultivo, c) la puesta en contacto el cultivo celular con las sustancias de estudio durante un tiempo determinado,

d) la extracción de la suspensión celular del contenedor hermético y su división en alícuotas, e) Adición de fluorocromos a las alícuotas del paso anterior, f) Incubación en oscuridad de las alícuotas con los fluorocromos y su monitorización in situ. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D3, no se ha divulgado ningún procedimiento in vitro para el estudio de los efectos del tratamiento crónico de sustancias sobre cultivos celulares que comparta las mismas características técnicas del procedimiento de la solicitud. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia mediante la combinación de métodos descritos previamente. Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las dependientes 2-25 se considera también nuevo e inventivo.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-25 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.