

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 986**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
A61B 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07701967 .7**
96 Fecha de presentación: **08.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2115462**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE CRIBADO IN VIVO DE AGENTES TÓXICOS CARDIACOS USANDO TELEÓSTEOS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2011

73 Titular/es:
**CITY UNIVERSITY OF HONG KONG
TAT CHEE AVENUE
KOWLOON, HONG KONG, CN**

72 Inventor/es:
**CHENG, Shuk Han y
CHAN, Pokwok**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 986 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cribado in vivo de agentes tóxicos cardiacos usando teleosteos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de cribado de agentes para detectar cardiotoxicidad en base a las observaciones de la alteración de la frecuencia cardiaca y el ritmo cardiaco, usando embriones y larvas de teleosteos.

Antecedentes - Campo de la invención

10 La arritmia cardiaca, un grupo de afecciones en las que el corazón late demasiado rápido (taquiritmia), demasiado lento o de forma irregular (bradiritmia), es una emergencia médica potencialmente letal que causa paro cardiaco y muerte súbita. Las causas comunes para arritmia cardiaca tanto congénita como adquirida son perturbaciones del ritmo cardiaco genéticas e inducidas químicamente/por una enfermedad. Más de 50 compuestos terapéuticos han mostrado potencial para inducir una arritmia cardiaca inesperada y algunos de ellos fueron retirados del mercado. La arritmia cardiaca está considerada, actualmente, como un factor de riesgo significativo para predecir la seguridad en el ser humano de nuevos compuestos terapéuticos. Por lo tanto, las autoridades reguladoras de fármacos
15 actualmente están más preocupadas por el potencial arritmico de los compuestos terapéuticos y se han emitido consejos sobre regulación acerca de la evaluación del fomento de la arritmia.

Conocimientos previos y descripción de la técnica anterior

20 La base electrofisiológica celular de la arritmia cardiaca se debe al bloqueo de los canales iónicos, que da como resultado el retardo de la repolarización y la prolongación del intervalo QT, características de ECG con un intervalo más largo entre los puntos Q y T. Dado que éste es el objetivo de la mayoría de los fármacos no cardiacos que causan arritmia cardiaca, se presta especial atención al hERG (gen relacionado con *ether-a-go-go* humano) que codifica la subunidad α formadora de poros del canal de potasio rectificador retardado de activación rápida. El canal es responsable de la corriente repolarizadora de potasio que se distingue de otra corriente por una fuerte rectificación hacia el interior. La inhibición de este canal, mediante compuestos exógenos o debido a una mutación
25 genética, aumenta la duración de la repolarización del potencial de acción en miocitos cardiacos, dando como resultado arritmias cardiacas. No obstante, la arritmia cardiaca no se debe solamente al mal funcionamiento del hERG sino también de otros canales iónicos, tales como los canales de sodio y los canales de calcio. Por lo tanto, se hace hincapié en el cribado preclínico de nuevos compuestos terapéuticos con cualesquiera efectos tóxicos cardiacos inesperados mediante modelos experimentales altamente sensibles y específicos.

30 Tradicionalmente, la electrofisiología de fijación de voltaje en microáreas de membrana se contempla como el "procedimiento de referencia" para medir la actividad del canal iónico. La técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana permite monitorizar directamente y en tiempo real la actividad del canal iónico en la administración de compuestos de ensayo en modelo de célula completa. Sin embargo, es una metodología de bajo rendimiento y requiere operadores altamente especializados. Aunque recientemente se han desarrollado otras tecnologías de
35 cribado avanzadas para mejorar el grado de rendimiento, todas estas tecnologías se basan en modelos de cultivo celular *in vitro*. La desventaja de usar un modelo *in vitro* es que el complejo entorno fisiológico que se produce *in vivo* no puede reproducirse en un modelo en un sistema *in vitro*. Algunas cuestiones biológicas de la electrofisiología cardiaca simplemente no pueden abordarse mediante ensayos *in vitro*. En este caso, se han aplicado los modelos *in vivo*, incluyendo en cobaya, perro y primate. El ECG se registra continuamente en un intervalo de dosis en aumento
40 en un animal anestesiado para detectar la aparición de cualquier arritmia cardiaca. Además, estos modelos no se usan ampliamente debido a los dilemas éticos y la rentabilidad. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una nueva tecnología con un menor coste y una mayor eficacia.

45 El pez cebra ha surgido como modelo en estudios de biología del desarrollo, estudios toxicológicos así como estudios farmacéuticos. El ensayo biológico con pez cebra *in vivo* combina las ventajas de alto rendimiento, en comparación con ensayos *in vivo* en mamíferos, y alta relevancia, en comparación con ensayos *in vitro*. Recientemente, se han publicado 2 artículos que demuestran las similares respuestas fisiológicas del pez cebra a compuestos bien conocidos que inducen arritmia cardiaca en el ser humano. Además, el ortólogo de hERG se clonó y mostró una gran similitud en la secuencia de proteínas en la región del poro y la región de unión al nucleótido cíclico a la que se unen algunos compuestos con toxicidad cardiaca. Además, la mutación en zERG muestra un
50 fenotipo similar de arritmia cardiaca al del ser humano. Estos resultados sugieren que el pez cebra puede usarse como modelo para cribar compuestos con toxicidad cardiaca.

55 Se han desarrollado procedimientos para medir la función cardiaca en el pez cebra. Sin embargo, estos son habitualmente de bajo rendimiento, consumen mucho tiempo y requieren un trabajo intensivo. El procedimiento más sencillo es usar un cronómetro para contar el número de latidos del corazón por minuto con un microscopio óptico convencional o un estereomicroscopio. Se ha desarrollado un procedimiento de análisis de imágenes de una película digital del corazón. Se midió la intensidad de píxel promedio de una región particular del corazón. Se realizó la transformada rápida de Fourier de estos datos para determinar la frecuencia cardiaca. Además de la frecuencia cardiaca, se han desarrollado otros parámetros cardiacos, por ejemplo gasto cardiaco, hemodinámica y propiedades

eléctricas. El gasto cardiaco, un importante parámetro de la fisiología cardiaca, puede determinarse de forma no invasiva en embriones transparentes de pez cebra mediante el cálculo del volumen ventricular durante el ciclo cardiaco filmando los latidos del ventrículo. La fórmula de cálculo del volumen requiere la longitud de los ejes del ventrículo que puede obtenerse perfilando el ventrículo de forma manual o automática con ayuda de un programa informático. La hemodinámica, según se determina mediante la presión sanguínea, puede medirse usando un sistema de micropresión de tipo "servo-null". En el sistema, un capilar de vidrio lleno de solución de NaCl de alta concentración se inserta en los vasos sanguíneos de interés usando un micromanipulador. El cambio de presión en el vaso sanguíneo desplazará la interfaz entre el plasma y la solución de NaCl, dando como resultado el cambio de resistencia eléctrica del electrodo en el interior del capilar de vidrio. Recientemente, se ha desarrollado una metodología para medir propiedades eléctricas en embriones de pez cebra. En la metodología, embriones de 5 días de edad se montan sobre su orientación dorso-ventral y se colocan 2 electrodos usando un micromanipulador, uno sobre la superficie del cuerpo fuera del corazón y otro electrodo de referencia en la solución circundante. Sin embargo, estos procedimientos también requieren mucho tiempo y un trabajo intensivo, particularmente en las etapas de preparación de muestras, lo que les hace inadecuados para un estudio de alto rendimiento.

Schwerte Thorsten et al, ("Development of the sympatho-vagal balance in the cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) characterized by power spectrum and classical signal analysis" *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, no. 6, marzo de 2006 (03/2006), páginas 1093-1100, XP002557439 ISSN: 0022-0949) divulga un procedimiento de determinación de si un agente de ensayo causa cambios tanto en la frecuencia cardiaca absoluta (figura 2) como en la variabilidad de la frecuencia cardiaca (es decir el ritmo de la frecuencia cardiaca) (figura 5) que comprende las etapas: a) poner en contacto al pez cebra con un agente de ensayo; b) medir el ritmo cardiaco y su variabilidad grabando en video los corazones de pez cebra al microscopio y procesando las imágenes resultantes (p. 1094, col. 2). Sin embargo, este procedimiento se centra en el video del corazón en lugar de en el de la circulación de células sanguíneas. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar un procedimiento de cribado de agentes en busca de la capacidad de interferir en la frecuencia cardiaca y la regularidad del ritmo cardiaco con mayor precisión y menor complejidad.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un procedimiento que usa teleósteos como modelo para cribar un agente con cualquier efecto cardiotóxico, particularmente alteración de la frecuencia cardiaca y del ritmo cardiaco. Los teleósteos, embriones o larvas, se bañan en medio que contiene agentes de ensayo durante un periodo de tiempo particular. A continuación, los teleósteos se inmovilizan con agarosa, agar o metilcelulosa. La circulación de las células sanguíneas se graba en video en un microscopio equipado con una cámara digital conectada a dispositivos de grabación, tales como una grabadora de videocasete, videocámara digital u ordenador personal. A continuación, se analiza el video de la circulación sanguínea mediante un software de análisis de imágenes usando un procedimiento de análisis de imágenes de video, en el que las células sanguíneas en movimiento en cada fotograma de video se detectan y se cuantifican. Se obtienen una serie de puntos de datos de cada fotograma de video de una parte del video o de todo el video. A continuación se aplica el análisis espectral de potencia para analizar la serie de puntos de datos, mediante el cual se obtienen la frecuencia cardiaca y un parámetro cuantitativo del ritmo cardiaco. Los resultados experimentales de los inventores mostraron que la frecuencia cardiaca calculada mediante la presente invención es equivalente a la frecuencia cardiaca determinada mediante el examen directo del corazón. Además, los resultados de los inventores también mostraron que el parámetro cuantitativo del ritmo cardiaco, el índice de ritmicidad cardiaca calculado mediante la presente invención, presenta una correlación inversa con la regularidad del ritmo cardiaco.

La invención es un procedimiento de cribado de agentes con capacidad para alterar la frecuencia cardiaca y la regularidad del ritmo cardiaco, que comprende:

- a. Incubar un embrión o larva transparente de un teleósteo en un medio que contiene un agente de ensayo;
- b. Opcionalmente, inmovilizar dicho embrión o larva sobre una superficie;
- c. Grabar en video la circulación de células sanguíneas de dicho embrión o larva en un microscopio equipado con una cámara conectada a un dispositivo de grabación;
- d. Analizar el video con software de análisis de imágenes en el que las células sanguíneas en movimiento en cada fotograma de video son detectadas y cuantificadas, para obtener una serie de puntos de datos de cada fotograma de video de una parte del video o de todo el video;
- e. Aplicar análisis espectral de potencia para analizar la serie de puntos de datos, para obtener una frecuencia cardiaca y un índice de ritmicidad cardiaca.

En una realización de la invención, dicho embrión o larva es de pez cebra o medaka.

En otra realización, dicho embrión o larva en la etapa (a) se incuba durante al menos 4 horas.

En otra realización, la etapa (b) comprende la inmovilización de embriones o larvas de teleósteos en un medio de inmovilización seleccionado entre el grupo constituido por agarosa, agar y metilcelulosa.

En otra realización, la filmación de la circulación de células sanguíneas de la etapa (c) se realiza durante al menos 20 segundos,

5 En otra realización, la parte de la película de la etapa (d) comprende la parte final de la película.

En otra realización, la etapa (d) comprende un procedimiento de análisis de imágenes de video capaz de identificar células sanguíneas en movimiento en el video.

En otra realización, el procedimiento de análisis de video es capaz de cuantificar la velocidad de las células sanguíneas calculando la distancia que recorrieron las células sanguíneas durante el intervalo de tiempo del análisis.

10 En otra realización, la frecuencia cardiaca de la etapa (e) se obtiene calculando el intervalo de tiempo entre los dos valores máximos continuos de la velocidad de las células sanguíneas.

En otra realización, el índice de ritmicidad cardiaca de la etapa (e) se obtiene comparando los intervalos de tiempo determinados mediante análisis espectral de potencia.

15 En otra realización, la etapa (a) comprende la incubación de huevos fertilizados de teleósteos iniciada al menos a partir de 2 días después de la fertilización.

En otra realización, el procedimiento de análisis es capaz de calcular la distancia que recorrieron las células sanguíneas durante el intervalo de tiempo analizado y, de este modo, la velocidad de las células sanguíneas.

En otra realización, la etapa (d) comprende además un algoritmo para calcular la frecuencia cardiaca calculando el intervalo de tiempo entre la aparición de 2 velocidades máximas de las células sanguíneas.

20 En otra realización, la etapa (d) comprende además puntos de datos de análisis matemáticos de las células sanguíneas para obtener información de la frecuencia e información espectral de potencia.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un procedimiento que usa teleósteos para cribar un agente con cualquier efecto cardiotoxico, particularmente alteración de la frecuencia cardiaca y del ritmo cardiaco.

25 Los teleósteos pueden ser embriones o larvas de cualquier pez perteneciente a la subclase Teleostomi, preferentemente, por ejemplo pez cebra y medaka, dado que ofrecen ventajas de fertilización externa y transparencia respecto a otro modelo animal usado en ensayos de cardiotoxicidad.

30 La exposición de agentes a teleósteos puede iniciarse a partir del momento de la fertilización o iniciarse en un momento particular después de la fertilización. La duración de exposición puede abarcar desde el comienzo de exposición hasta el momento del examen o en una duración de tiempo de exposición seguida por un periodo de tiempo de recuperación durante el cual los teleósteos se bañan en un medio sin agente de ensayo. El agente puede disolverse en agua o medio usado para bañar teleósteos. Como alternativa, un agente insoluble en agua puede disolverse en DMSO a alta concentración y, durante la exposición, añadirse al medio de baño directamente.

35 Antes de grabar en video la circulación de células sanguíneas, los teleósteos se inmovilizan en una superficie, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio o una placa de Petri de plástico. El medio de inmovilización puede ser agarosa, agar o metilcelulosa. La concentración óptima de agarosa o agar usada es del 0,5% (p/v) o inferior. La concentración de metilcelulosa usada es del 2-4% (p/v). La orientación de los teleósteos debe ser en su posición lateral espontánea. Preferentemente, la circulación en la parte posterior de la cola de los teleósteos es ideal para el análisis de la cardiotoxicidad en la presente invención.

40 El sistema de captura de imágenes en video está constituido por un microscopio, estereomicroscopio o microscopio óptico convencional, con un objetivo de pocos aumentos (figura 1). El microscopio está conectado a la cámara, analógica o digital, conectada a dispositivos de grabación, tales como grabadora de videocasete, videocámara digital u ordenador personal con un capturador de fotogramas de video. El video grabado en el medio, por ejemplo una cinta de videocasete o cinta mini DV, o grabado en un ordenador personal se vuelve a convertir en un formato legible, tal como formato AVI o WMV, y se almacena en un ordenador personal para un análisis de imágenes de video adicional. La duración del video para cada muestra de teleósteo no debe ser inferior a 20 segundos.

45 El posterior análisis de imágenes de video se realiza mediante un nuevo algoritmo implementado en un software de diseño propio. En el algoritmo, un fotograma de video es capturado del archivo de video almacenado en el ordenador personal, en formato AVI o WMV y se sustrae inmediatamente con su fotograma de video consecutivo. La sustracción se realiza en valor de intensidad de píxel de una manera píxel por píxel. Cualquier movimiento producido entre 2 fotogramas de video consecutivos conducirá a la diferencia en la intensidad de píxel. Por lo tanto, la sustracción revelará células sanguíneas en movimiento en el video. Una muestra de un resultado de sustracción se

muestra en la figura 2. Dado que el intervalo de tiempo entre cada fotograma de video es constante y la cantidad de píxeles diferenciales está relacionada con la distancia recorrida por las células sanguíneas entre 2 fotogramas de video, la cantidad de píxeles diferenciales puede usarse para estimar la velocidad de las células sanguíneas. La representación gráfica de la cantidad de píxeles diferenciales, es decir píxeles con diferente intensidad de píxel con respecto al píxel correspondiente en el fotograma de video consecutivo, frente al tiempo en segundos muestra una curva en forma de onda con oscilación regular (figura 3), que sugiere la oscilación en la velocidad de las células sanguíneas.

El análisis de datos de la serie de la cantidad de píxeles diferenciales obtenidos a partir del análisis de imágenes de video se realiza mediante procedimientos implementados en el software de diseño propio. La serie de datos de la cantidad de píxeles diferenciales se analiza comprendiendo análisis espectral de potencia en los que la serie de píxeles diferenciales se descompone mediante la transformada discreta de Fourier. Se usa un algoritmo de transformada discreta de Fourier. El espectro de potencia se obtiene mediante autocorrelación de la serie de Fourier y se representa gráficamente frente a los valores de frecuencia (figura 4). Se calcula el valor de potencia total del espectro. El máximo más alto con el valor de frecuencia más bajo (p_{max}) se define como el componente de frecuencia básica de la señal de entrada. El valor de frecuencia es equivalente a la frecuencia cardiaca. La proporción del valor máximo más alto con respecto al valor de potencia total se presenta como el índice de ritmicidad cardiaca. El principio del cálculo es que cuando la entrada emite señales con frecuencias que varían alrededor del componente de frecuencia básica, el máximo del componente de frecuencia básica en su espectro de potencia será menor con componentes de frecuencia más altos a su alrededor. Por lo tanto, la proporción de potencia del componente de frecuencia básica con respecto a la potencia total disminuye.

La realización se ensaya en embriones de tipo silvestre a 52 horas después de la fertilización. Se toman videos de la circulación en el corazón y en la cola para el análisis. La frecuencia cardiaca se determina a partir del recuento visual directo del número de latidos del corazón en 1 minuto. Además, la frecuencia cardiaca se calcula mediante la multiplicación del componente de frecuencia básica en el espectro de potencia por 60. La frecuencia cardiaca calculada se correlaciona con la frecuencia cardiaca determinada mediante el examen directo del corazón (figura 5). Además, el ritmo cardiaco se determina como la desviación típica del intervalo de tiempo de los latidos del corazón. Si el latido del corazón es irregular, la desviación típica del intervalo de tiempo de los latidos del corazón aumentará. El índice de ritmicidad cardiaca se calcula como la proporción del valor de potencia del valor de frecuencia básica con respecto al valor de potencia total de todo el espectro. El índice de ritmicidad cardiaca presenta una correlación inversa con la desviación típica del intervalo de tiempo de los latidos del corazón determinado mediante examen directo del corazón (figura 6), lo que sugiere que cuanto mayor sea el índice de ritmicidad, más regular será el ritmo cardiaco.

Ejemplo

Este ejemplo ilustra el uso de la presente invención para determinar la frecuencia cardiaca y el índice de ritmicidad cardiaca en larvas de pez cebra expuestas al fármaco inductor de arritmia cardiaca humana bien conocido, haloperidol. El haloperidol es un derivado de butirofenona con propiedades antipsicóticas. La arritmia cardiaca se ha relacionado con el uso oral de haloperidol y el mecanismo de la arritmia inducida por haloperidol implicaba el bloqueo del canal hERG.

Se preparó una solución madre de haloperidol disolviéndolo en DMSO a una concentración final de 2 mM. Los huevos de pez cebra se recogen y se colocan en medio para huevos (NaCl 19,3 mM, KCl 0,23 mM, MgSO₄ 0,13 mM 7H₂O, Ca(NO₃)₂ 0,2 mM, Hepes 1,67 mM (pH 7,2) a 28,5°C durante 4 horas antes de almacenar para viabilidad. A continuación se incuban embriones sanos a 28,5°C hasta 48 horas después de la fertilización. Se añadieron seis µl de solución madre a 6 ml de medio para huevos que contenía 20 embriones sanos a las 48 horas después de la fertilización. La concentración final de haloperidol es de 2 µM y la concentración final de DMSO era del 0,1% a la cual no se observó ningún efecto en pez cebra. Después de 4 horas de incubación, se examina la circulación sanguínea del pez cebra y se graba en video en un estereomicroscopio equipado con una cámara CCD conectada a una videocámara digital mediante un cable de S-video. El video se almacena en una cinta mini DV y se transfiere de vuelta a un ordenador personal mediante la conexión de i-Link entre la videocámara digital y el ordenador. El videoclip se almacena en un ordenador personal en el formato AVI. El análisis de imágenes y el análisis de datos se realizan mediante nuestro software de diseño propio con los algoritmos de análisis de imágenes y análisis de datos implementados.

Después del tratamiento con haloperidol, la frecuencia cardiaca se reduce significativamente (figura 7), similar a los datos publicados. Además de la frecuencia cardiaca, también analizamos la ritmicidad de los latidos del corazón después del tratamiento con haloperidol, lo que no se ha publicado en ningún artículo que evalúe la función cardiaca en embriones de pez cebra. La desviación típica del intervalo de tiempo tomado entre cada latido del corazón determinado mediante examen directo del corazón aumenta (figura 8). Al mismo tiempo, los índices de ritmicidad cardiaca en embriones tratados disminuyen (figura 8).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Diagrama esquemático del sistema de formación de imágenes.

- Figura 2 Ejemplo de resultado de sustracción de imágenes.
- 5 Figura 3 Representación gráfica de píxeles diferenciales para una duración de 4 segundos.
- Figura 4 Diagrama esquemático que ilustra la identificación del componente de frecuencia básica y su valor de potencia máxima, y el cálculo de la potencia total.
- 10 Figura 5 Correlación de la frecuencia cardiaca determinada a partir de la circulación en el corazón y en la cola mediante análisis espectral de potencia.
- Figura 6 Correlación del ritmo cardiaco y el índice de ritmicidad determinada mediante análisis espectral de potencia.
- 15 Figura 7 Comparación de alteración de la frecuencia cardiaca inducida por haloperidol determinada mediante examen directo del corazón y el análisis espectral de potencia. El asterisco indica la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de control y el grupo de haloperidol ($p < 0,05$).
- 20 Figura 8 Comparación de la alteración de la ritmicidad cardiaca inducida por haloperidol determinada mediante examen directo del corazón y el análisis espectral de potencia. El asterisco indica la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de control y el grupo de haloperidol ($p < 0,05$) mientras que el doble asterisco indica la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de control y el grupo de haloperidol ($p < 0,01$).
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cribado de agentes con capacidad para alterar la frecuencia cardiaca y la regularidad del ritmo cardiaco, que comprende:
- 5 a. Incubar un embrión o larva transparente de un teleosteo en un medio que contiene un agente de ensayo;
- b. Opcionalmente, inmovilizar dicho embrión o larva sobre una superficie;
- 10 c. Grabar en video la circulación de células sanguíneas de dicho embrión o larva en un microscopio equipado con una cámara conectada a un dispositivo de grabación;
- d. Analizar el video con software de análisis de imágenes en el que las células sanguíneas en movimiento en cada fotograma de video son detectadas y cuantificadas, para obtener una serie de puntos de datos de cada fotograma de video de una parte del video o de todo el video;
- 15 e. Aplicar análisis espectral de potencia para analizar la serie de puntos de datos, para obtener una frecuencia cardiaca y un índice de ritmicidad cardiaca.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho embrión o larva es de pez cebra o de medaka.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2 en el que la etapa (a) comprende la incubación de huevos fertilizados de teleosteos iniciada al menos a partir de 2 días después de la fertilización.
- 20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho embrión o larva en la etapa (a) se incuba durante al menos 4 horas.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (b) comprende la inmovilización de embriones o larvas de teleosteos en un medio de inmovilización seleccionado entre el grupo que consiste en agarosa, agar y metilcelulosa.
- 25 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la filmación de la circulación de células sanguíneas de la etapa (c) se realiza durante al menos 20 segundos.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la parte de la película de la etapa (d) comprende la parte final de la película.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el procedimiento de análisis de video es capaz de cuantificar la velocidad de las células sanguíneas calculando la distancia que recorrieron las células sanguíneas durante el intervalo de tiempo analizado.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la frecuencia cardiaca de la etapa (e) se obtiene calculando el intervalo de tiempo entre los dos valores máximos continuos de la velocidad de las células sanguíneas.
- 35 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el índice de ritmicidad cardiaca de la etapa (e) se obtiene comparando los intervalos de tiempo determinados mediante análisis espectral de potencia.

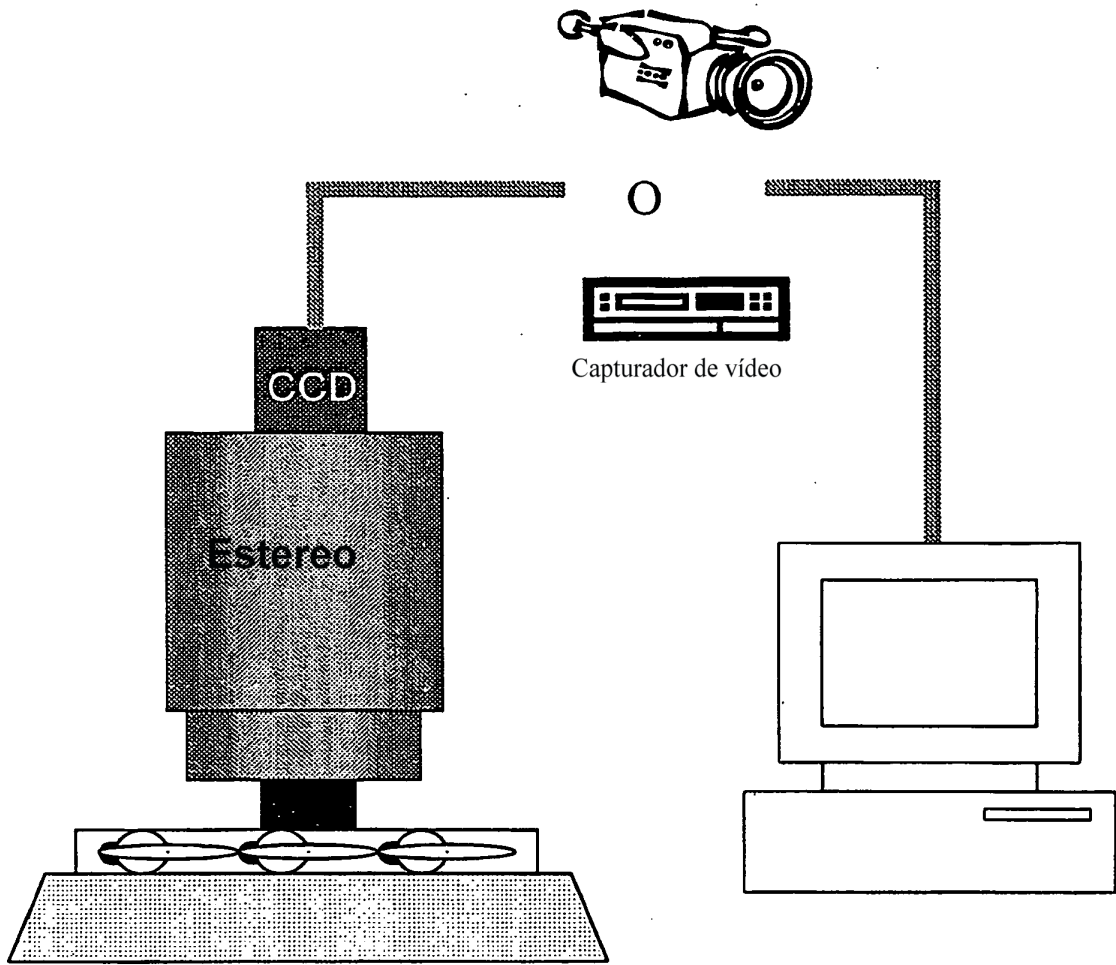


Figura 1.

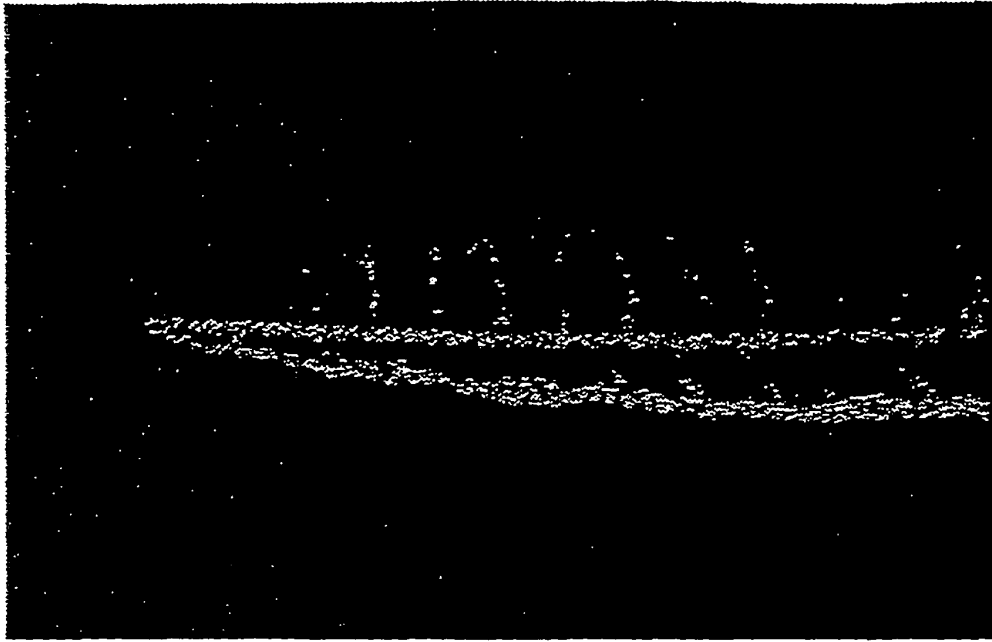


Figura 2.

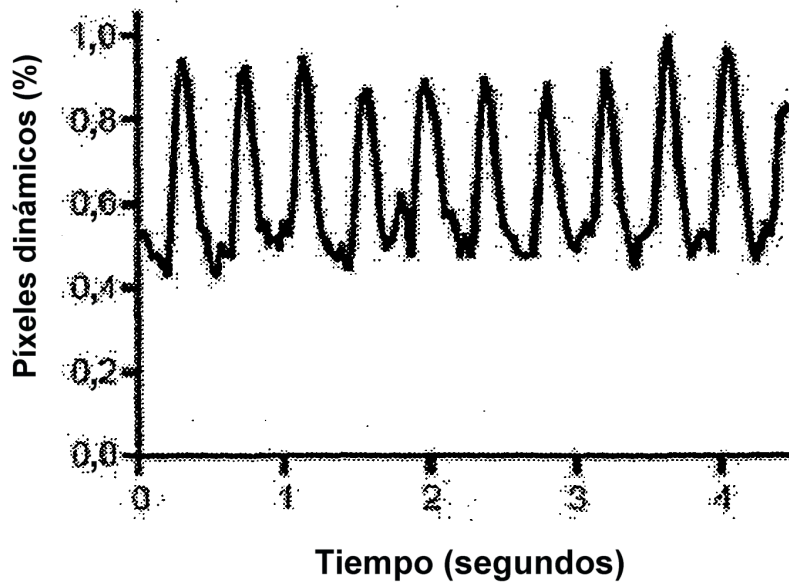


Figura 3

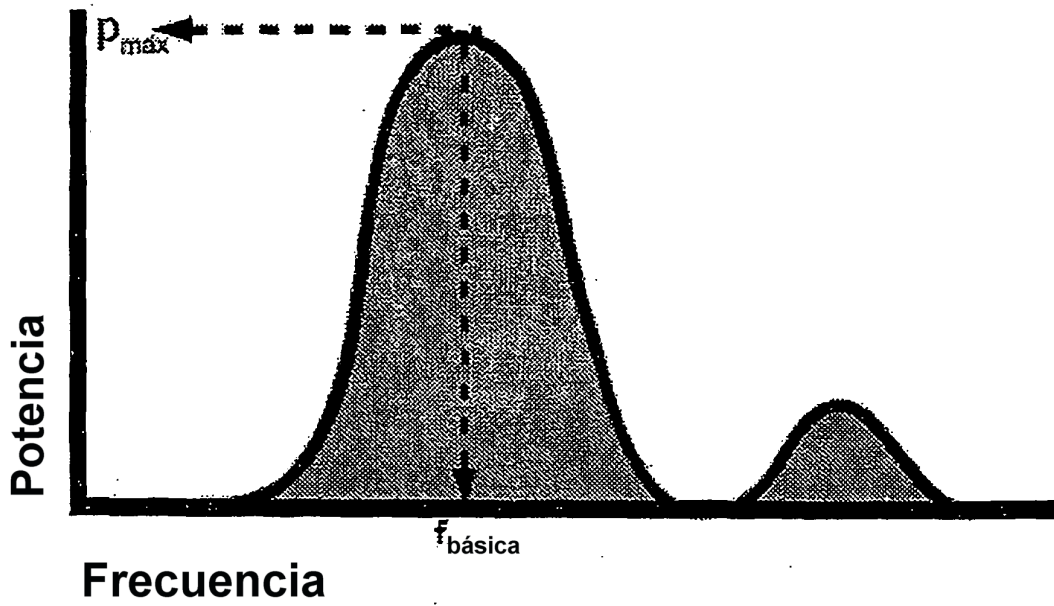


Figura 4.

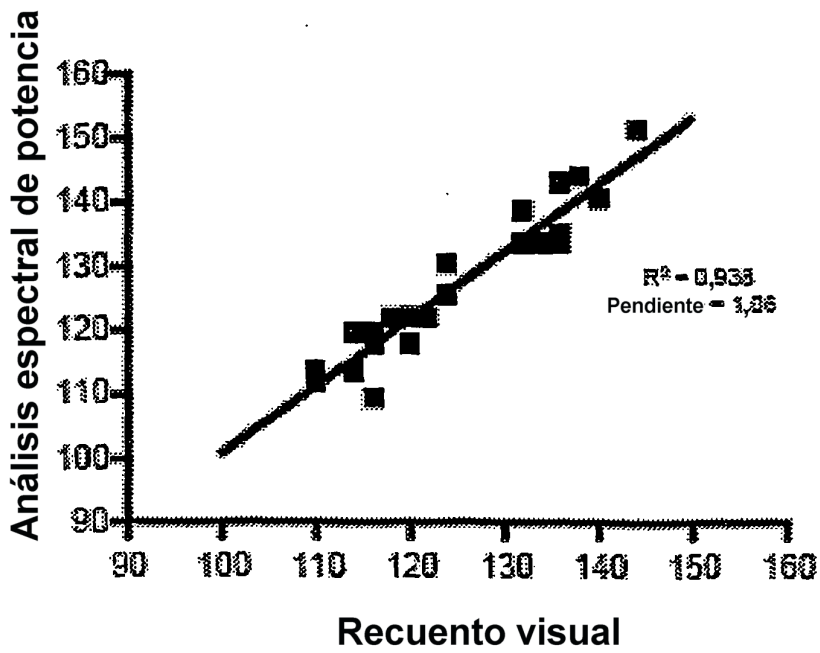


Figura 5.

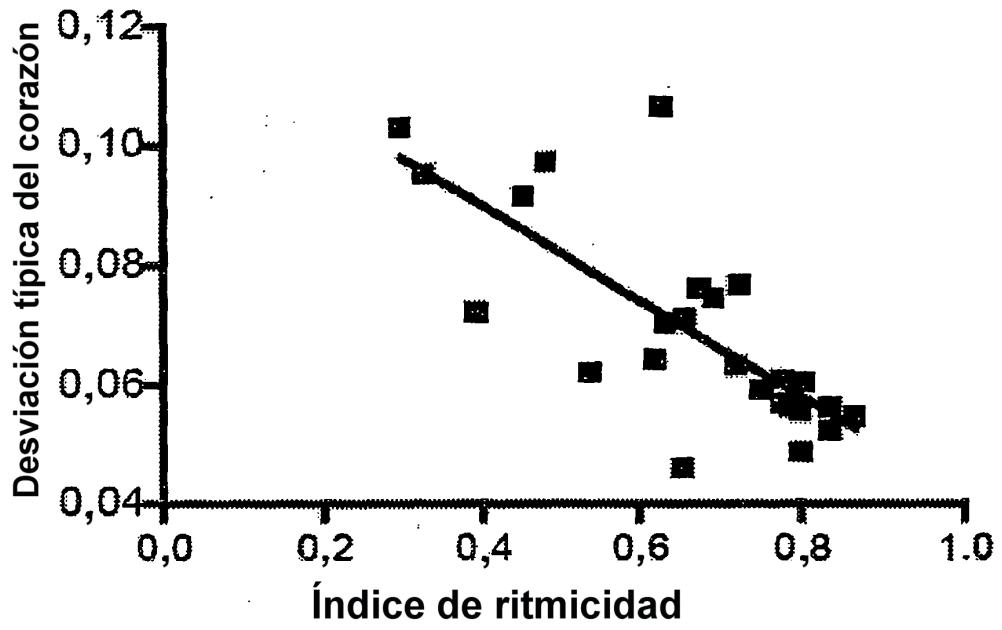


Figura 6.

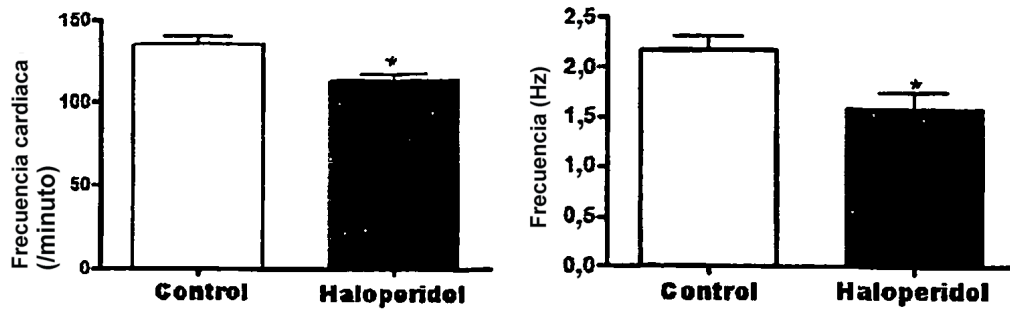


Figura 7.

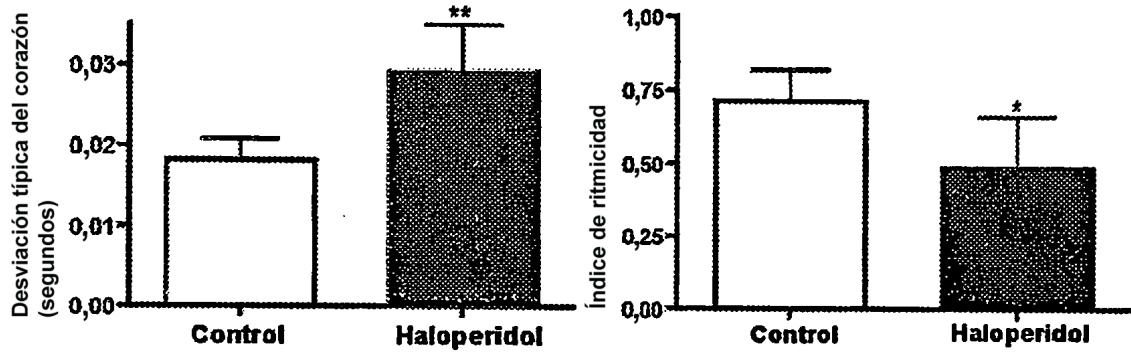


Figura 8.